



HAL
open science

Contrôle épigénétique de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse cardiaque induit par les cellules myéloïdes.

Julie Rondeaux

► **To cite this version:**

Julie Rondeaux. Contrôle épigénétique de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse cardiaque induit par les cellules myéloïdes.. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université; 169313840, 2021. Français. NNT : 2021NORMR054 . tel-03657053

HAL Id: tel-03657053

<https://theses.hal.science/tel-03657053>

Submitted on 2 May 2022

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.

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Contrôle épigénétique de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse cardiaque induit par les cellules myéloïdes

Présentée et soutenue par
Julie RONDEAUX

Thèse soutenue publiquement le 08/04/2021
devant le jury composé de

Mme Caroline CONTE	MAITRE DE CONFERENCE HDR Université de Toulouse 3 Paul SABATIER	Rapporteur de jury
M. Stéphane GERMAIN	DIRECTEUR DE RECHERCHE Collège de France	Rapporteur de jury
M. Clément COCHAIN	CHARGE DE RECHERCHE Université de Würzburg (Allemagne)	Membre de jury
Mme Isabelle DUBUS	PROFESSEUR DES UNIVERSITE Université de Rouen Normandie	Membre de jury
M. Sylvain FRAINEAU	MAITRE DE CONFERENCE Université de Rouen Normandie	Membre de jury
Mme Ebba BRAKENHIELM	DIRECTEUR DE RECHERCHE Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par Ebba BRAKENHIELM, Laboratoire Endothélium, Valvulopathies et Insuffisance cardiaque.

Contrôle épigénétique de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse cardiaque induit par les cellules myéloïdes

La régulation épigénétique de la méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27) a été récemment mise en évidence comme une étape clé de la polarisation en macrophages alternatifs de type M2, essentiels pour la réparation cardiaque après un infarctus du myocarde (IDM).

Nous avons émis l'hypothèse que l'enzyme épigénétique EZH2, responsable de la méthylation de H3K27, pourrait agir comme un point de contrôle épigénétique au cours de ce processus. Nous démontrons pour la première fois une localisation cytoplasmique ectopique et potentiellement inactive de l'enzyme épigénétique EZH2, lors de la différenciation des monocytes en macrophages M2 *in vitro* ainsi que dans les macrophages M2 *in vivo* au cours d'une inflammation cardiaque post-IDM. De plus, nous montrons que l'inhibition pharmacologique d'EZH2, avec le GSK-343, résout la méthylation de H3K27 au niveau du promoteur des gènes bivalents, améliorant ainsi leur expression pour promouvoir les fonctions de réparation des monocytes humains. Conformément à cet effet protecteur, le traitement avec le GSK-343 accélère la résolution inflammatoire cardiaque empêchant l'expansion de la zone lésée et le dysfonctionnement cardiaque post-IDM *in vivo*.

En conclusion, notre étude révèle que la modulation épigénétique des cellules immunitaires infiltrant le cœur peut être prometteuse pour limiter le remodelage cardiaque indésirable post-IDM.

Mots clés : inflammation cardiaque, EZH2, monocytes, gènes bivalents, infarctus du myocarde, macrophages M2.

Laboratoire :

UMR Inserm U1096 - Endothélium, Valvulopathies et Insuffisance cardiaque (EnVI)

22 Boulevard Gambetta

76183 Rouen cedex 1

Epigenetic control of myeloid cells-induced cardiac angiogenesis and lymphangiogenesis

Epigenetic regulation of histone H3 lysine 27 (H3K27) methylation has recently emerged as a key step during alternative M2-like macrophage polarization, essential for cardiac repair after Myocardial Infarction (MI).

We hypothesized that the epigenetic enzyme EZH2, responsible for H3K27 methylation, could act as an epigenetic checkpoint regulator during this process. We demonstrate for the first-time that EZH2 ectopically localizes to the cytoplasm, where it may be inactive, during monocytes differentiation into M2 macrophages *in vitro* as well as in M2 polarized macrophages *in vivo* during cardiac inflammation post-MI. Moreover, we show that pharmacological EZH2 inhibition, with GSK-343, resolves H3K27 methylation at the promoter of bivalent genes, thus enhancing their expression to promote human monocyte repair functions. In line with this protective effect, GSK-343 treatment accelerated cardiac inflammatory resolution preventing infarct expansion and subsequent cardiac dysfunction post-MI *in vivo*.

In conclusion, our study reveals that epigenetic modulation of cardiac-infiltrating immune cells may hold promise to limit adverse cardiac remodeling post-MI.

Key words: cardiac inflammation, EZH2, monocytes, bivalent genes, myocardial infarction, M2 macrophages.

Institute:

UMR Inserm U1096 - Endothélium, Valvulopathies et Insuffisance cardiaque (EnVI)

22 Boulevard Gambetta

76183 Rouen cedex 1

Remerciements

Ce travail de recherche a été réalisé au sein de l'Unité INSERM 1096 EnVI « Endothélium, Valvulopathies et Insuffisance cardiaque » dirigée par le Pr. Vincent Richard. Je tiens tout d'abord à remercier les institutions ayant rendu possible la réalisation de ce travail : Normandie Université, l'École Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé et Environnement ainsi que l'INSERM, pour le financement de ce travail de thèse.

Je remercie le **Pr. Vincent Richard** de m'avoir accueilli au sein du laboratoire. Merci de m'avoir donné l'opportunité de présenter mes travaux lors de congrès internationaux et nationaux.

Je souhaite également remercier ma directrice de thèse, le **Dr. Ebba Brakenhielm** d'avoir accepté de diriger cette thèse et de m'avoir permis de travailler avec mon co-encadrant le **Dr. Sylvain Fraineau**.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au **Dr. Caroline Conte** et au **Pr. Stéphane Germain**, d'avoir accepté d'apporter leur expertise à mon travail et d'apporter leur expertise. C'est un honneur pour moi de vous avoir en tant que rapporteurs.

Je remercie également le **Pr. Isabelle Dubus** et le **Dr. Clément Cochain** d'évaluer mon travail et d'avoir accepté de siéger dans mon jury de thèse en tant qu'examineurs.

Merci au **Dr. Marc Isabelle** et au **Dr. Paule Séité** d'avoir suivi l'évolution de ce travail au travers de leur participation à mes comités de suivi individuel de thèse. Merci pour vos conseils avisés et votre gentillesse.

Je remercie le **Pr. Eric Durand**, **Mme Delphine Béziau-Gasnier** pour leur aide précieuse pour l'inclusion des échantillons humains. Ce travail d'inclusion n'aurait pas été possible sans l'implication sans relâche de **Mme Claire Vezier** et **Mme Zina Badji**, merci de votre gentillesse, c'était un plaisir de vous rendre visite à chaque fois.

Un grand merci à l'ensemble des chercheurs de l'U1096 : le **Pr. Paul Mulder**, le **Dr. Antoine Ouvrad-Pascaud**, le **Pr. Jérémy Bellien**, le **Pr. Dominique Guerrot**, le **Dr. Julien Wils**....Merci pour votre gentillesse et votre disponibilité.

Mr Paulus, je te remercie pour ta bonne humeur et ta bienveillance. Merci pour tes visites « petit-déjeuner » des samedis et dimanches de travail.

Remerciements

A mes collègues de l'unité EnVi

Sylvanie, merci pour tous ces moments partagés, merci pour ta gentillesse, ton écoute et ta disponibilité. Tu es toujours prête à filer un « petit » coup de main, qui souvent avec moi se terminait en journée de travail, mais toujours dans la bonne humeur et avec le sourire. Sans bien sûr oublier nos petits moments yaourt à fredonner en BM.

Ma chère **Anaïs**, le calme et la sérénité. Merci pour tous tes conseils précieux. Je suis ravie d'avoir partagé mes premières heures de manips au labo avec toi et presque aussi mes dernières. Merci vivement de m'avoir apporté ton aide, je suis ravie de t'avoir « embêté » si souvent, et d'avoir pu partager ces moments avec toi. Et promis j'essaie de dire moins de gros mots.

Ma petite **Marine**, c'est un plaisir de te connaître. Merci d'avoir veillé à ce que je prenne au moins le temps de boire mon café du midi. Je te souhaite bonne chance pour la suite.

Khédi, merci pour ton aide administrative tout au long de ma thèse. Je suis ravie que ton investissement dans ton travail ait été reconnu à sa juste valeur.

Saïda, c'était une tristesse de perdre une collègue comme toi lors de mon départ en thèse, alors quel bonheur d'avoir pu te retrouver au laboratoire. Je te souhaite le meilleur pour la suite.

Manon, merci pour ta bonne humeur et ton soutien, qui m'ont tant aidé en fin de thèse. Je te souhaite la concrétisation de tes projets professionnels et surtout personnels.

A mes anciens collègues qui sont maintenant bien plus...

Antoine et Shirley, merci à vous deux pour tous ces moments partagés, pour tous ces fous rires, pour nos manips à six mains. Antoine merci pour ces cafés debriefs, qui m'ont bien souvent permis de tenir le coup. Et merci à vous deux pour nos rendez-vous mensuels qui faisaient tellement de bien au moral. Cette expérience n'aurait jamais été la même sans vous.

Mes chouquettes, **Camille et Sylvia**, merci merci merci, d'être devenues bien plus que des collègues. Quel bonheur d'avoir partagé la paillasse avec vous.

Remerciements

« Radio Biology Innovations Transfer to Clinic and Hospital ».

Merci la Team, sans vous ces dernières années n'auraient pas été les mêmes. Vous êtes mes plus belles rencontres.

Ma petite **Marianne**, merci d'avoir partagé tous ces moments, au labo et en dehors. Merci pour ta gentillesse et ton écoute. Mais surtout merci pour ton grain de folie qui te rend adorable. Je te souhaite pleins de belle chose avec Doudou et que le vent te mène là où tu le souhaites.

Mr Perzouille, merci d'avoir supporté toutes ces heures en salle de culture avec moi, d'avoir rendu ces journées moins longues et en revisitant avec un certain talent des musiques d'une autre époque 😊. Merci, d'avoir su me reconforter dans les moments de guerre avec mes cellules et de m'avoir donné le petit coup de pouce qui donne le courage de repartir.

Ma chère **Bérénice**, je ne trouve pas les mots pour te remercier de tous ces moments passés ensemble. J'ai adoré nos moments au bureau, et à la paillasse, ou autour d'une lasagne. Merci de m'avoir soutenu même dans les moments les plus compliqués. Je te souhaite beaucoup de bonheurs et de réussite ma Béré. Merci pour tout. **Baba**, le petit dernier de la Team, merci de ta bonne humeur et ta gentillesse, bienvenu dans la Team.

Ma petite **Déborah**, merci pour ta spontanéité, merci d'avoir toujours un petit truc à rajouter, nous valant souvent de bons fous rires. Bien évidemment, au labo tu as été une partenaire formidable, merci pour ton implication et ton professionnalisme. Merci d'avoir supporté avec moi les arrivées à 5h à l'animalerie et les départs à 23h. D'un point de vue personnel, je ne pourrais jamais te remercier assez pour tout ce que tu as fait pour moi, merci mille de t'être occupé de moi et de m'avoir permis de tenir le coup, surtout dans cette ligne droite. Il va sans dire que tu as tout en toi pour faire des choses formidables, alors GO !!!!

A mes collègues doctorants

Matthieu L., Merci pour ta spontanéité, qui ne manque jamais de nous surprendre 😊.
Matthieu S., merci pour ta gentillesse, bon courage pour la fin de thèse. Je te souhaite le meilleur pour la suite. **Hind, Coraline**, bon courage pour la suite de votre thèse.

Marion et Justine, même si vous n'êtes pas de l'unité EnVI, c'est tout comme ! C'est tout naturellement que je vous écris un petit mot, merci pour les soirées détentes et les pique-niques sur les quais qui permettent de souffler un peu. Bon courage à vous deux pour la fin !

Remerciements

A mes petits stagiaires

Junior et Scully ce fut un plaisir de vous avoir sous mon aile. Je vous souhaite de vous souhaiter le meilleur pour la suite.

Naturellement la dernière partie de mes remerciements est dédiée à mes proches qui ont toujours été présents, dans les bons comme dans les mauvais moments. Merci de m'avoir écouté pendant 3 ans vous parler de cellules, de souris, et autres chinoïseries pour vous.

Mon cher Georges, merci de m'avoir poussé au-delà de ma zone de confort et donné la force d'entreprendre ce projet. Je te remercie de savoir me forcer à être raisonnable. Ton soutien inconditionnel et ton amitié ont une valeur inestimable à mes yeux.

Anne Marie, je vous remercie d'avoir toujours cru en moi.

À **Yohan**, pour tous ces moments que nous avons passés, pour ton soutien. Merci pour tout, tout simplement.

Papa, Maman, je vous remercie de m'avoir permis d'en arriver jusqu'ici. La route fut sinueuse et semée d'embûches, mais m'y voilà. Sans votre soutien, rien de tout ceci n'aurait été possible.

Les frangins et Juliette merci d'avoir cédé à tous mes caprices les week-ends à la maison, sans ces craquages et ces moments de folie, la vie serait nettement plus morose. Erwan, à toi de jouer !

*Bien évidemment, le mot de la fin de ces remerciements, est pour le **Dr. Sylvain Fraineau**.*

Je tiens à te remercier de m'avoir pris sous ton aile. Un immense merci pour tes précieux conseils scientifiques prodigués tout au long de ma thèse et pour ton soutien. Quel bonheur de travailler avec un chef passionné qui enfle la blouse avec plaisir pour passer des journées entières à la paillasse à mes côtés. Merci d'avoir élaboré, nos plans de bataille (nous remercions au passage le tableau qui a bien servi), pour faire toujours plus. Plus personnellement, je te remercie pour ta bonne humeur, ta gentillesse et ta bienveillance. Tu es une personne formidable, et surtout, inoubliable, merci pour tout.

Table des matières

Index des figures	13
Index des Tableaux.....	16
Abréviations	17
Introduction.....	25
Chapitre 1 : Rôle physiopathologique des monocytes/macrophages	27
1 Découverte des leucocytes, monocytes et des macrophages	27
2 Hétérogénéité monocyttaire	31
2.1 Caractérisation de monocytes circulants humains	31
2.1.1 Monocytes classiques	32
2.1.2 Monocytes non classiques	34
2.1.3 Monocytes intermédiaires.....	34
2.2 Caractérisation de monocytes circulants murins.....	37
2.2.1 Monocytes classiques ou « pro-inflammatoires ».....	37
2.2.2 Monocytes non classiques ou « résidents »	38
2.3 Monocytes comme précurseurs des macrophages tissulaires	38
3 Trafic monocyttaire de la moelle osseuse aux tissus cibles	41
3.1 Recrutement des monocytes de la moelle osseuse vers le sang.....	41
3.2 Recrutement tissulaire des monocytes circulants	43
4 Diversité des macrophages	46
4.1 Différence monocytes/ macrophages.....	46
4.2 Hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle des macrophages.....	47
4.2.1 Classification en fonction de l'état d'activation des macrophages	49
4.2.1.1 Activation classique : macrophages M1.....	50
4.2.1.2 Activation alternative : macrophages M2	50
4.2.2 Classification en fonction de l'activité homéostatique	52
4.2.3 Expression différentielle de marqueurs spécifiques.....	52
4.2.4 Macrophages M4 et plasticité phénotypique.....	52
4.2.4.1 Macrophages M4.....	52
4.2.4.2 Plasticité phénotypique des macrophages	53

Table des matières

4.3	Macrophages résidents et macrophages dérivés des monocytes dans le cœur .	54
4.3.1	Macrophages dans le cœur sain	54
4.3.1.1	Origine des macrophages résidents	54
4.3.1.2	Rôles des macrophages résidents	55
4.3.1.3	Phénotype des macrophages résidents cardiaques	56
4.3.2	Dans le cœur vieillissant	57
4.4	Epigénétique dans la polarisation et la différenciation cellulaire	58
Chapitre 2 : Implication des monocytes/macrophages dans la réparation cardiaque après l'IDM		59
1	L'IDM : définition et données épidémiologiques	59
1.1	Maladies cardio-vasculaires	59
1.2	L'IDM	60
1.3	La prise en charge à la phase aiguë de l'IDM	62
2	Réparation cardiaque post-IDM	63
2.1	Nécrose ou apoptose post-ischémique	63
2.2	Réponse immunitaire post-IDM	64
2.2.1	La réponse immunitaire post-IDM	64
2.2.1.1	La phase inflammatoire	65
2.2.1.2	Phase proliférative/de résolution	68
2.2.1.3	Phase de maturation	69
2.2.2	Les acteurs cellulaires de la réponse immune post-IDM	70
2.2.2.1	Cellules immunitaires résidentes cardiaques	70
2.2.2.2	Processus dynamique de recrutement des cellules inflammatoires post-IDM	71
2.2.2.3	Les cellules de l'immunité innée	72
2.2.2.4	Les cellules de l'immunité adaptative	85
2.2.3	Déterminants moléculaires de la réponse inflammatoire	90
2.2.3.1	Les cytokines pro-inflammatoires	91
2.2.3.2	Les cytokines anti-inflammatoires	99
2.2.3.3	Les chimiokines	107

Table des matières

2.2.3.4	Les cytokines sont-elles de bonnes cibles thérapeutiques ?	109
2.2.4	Importance de la cinétique de recrutement des monocytes macrophages post-IDM.....	110
2.2.5	Résolution de l'inflammation et cicatrisation.....	110
2.2.5.1	Résolution de l'inflammation : transition de la phase inflammatoire à la cicatrisation	111
2.2.5.2	Cicatrisation physiologique de la lésion post-IDM : rôle des principaux acteurs cellulaires.....	111
2.2.5.3	Dernière phase de réparation : Maturation du collagène et implication des myofibroblastes	112
2.3	Remodelage et régénération cardiaque	114
2.3.1	Remodelage cardiaque délétère post-IDM.....	114
2.3.2	Remodelage cardiaque et modification de la morphologie du cœur.....	115
2.3.3	Remodelage cardiaque, fibrose et hypertrophie des cardiomyocytes ...	115
2.4	Cibler les populations de monocytes/macrophages : potentiel thérapeutique pour une meilleure réparation cardiaque.....	116
2.4.1	Echec des thérapies anti-inflammatoires et pro-angiogéniques.....	116
2.4.1.1	Intérêts de l'angiogenèse thérapeutique.....	116
2.4.1.2	Intérêts des thérapies anti-inflammatoires	117
2.4.2	Intérêt de moduler le phénotype des cellules inflammatoires : promouvoir la résolution de l'inflammation par thérapie cellulaire utilisant les macrophages	117
Chapitre 3 : Mécanismes épigénétiques de régulation de la fonction et de la polarisation des macrophages		119
1	Généralités	119
1.1	Définition et concept d'épigénétique	119
1.2	La chromatine, support de l'information génétique.....	120
1.2.1	Composition et structure de la chromatine.....	120
1.2.2	Structure de la chromatine et activité transcriptionnelle	121
2	Modifications épigénétiques et enzymes épigénétiques	122
2.1	Les principales modifications épigénétiques	122
2.2	La méthylation de l'ADN.....	123

Table des matières

2.2.1	Les méthyltransférases de l'ADN sont responsables de la mise en place de méthylation de l'ADN	124
2.2.2	La génération de profils de méthylation aberrants génère de nombreuses pathologies.....	126
2.2.3	La déméthylation active de l'ADN fait intervenir différentes familles d'enzymes.....	127
2.3	Modifications Post-traductionnelles des histones.....	129
2.3.1	Structure des histones et code des histones	129
2.3.2	Méthylation des queues des histones et enzymes de modification des histones	133
2.3.2.1	La méthylation des histones concerne les résidus lysine et arginine .	133
2.3.2.2	Les méthylations des histones sont catalysées par des enzymes spécifiques.....	133
2.3.2.3	Les déméthylations des histones sont catalysées par des enzymes antagonistes des HMTs	134
2.3.2.4	H3K4me3 et H3K27me3	135
3	Régulation épigénétique de la transcription des gènes : cas Particuliers de H3K4me3 et H3K27me3	136
3.1	Concept de gènes bivalents	136
3.1.1	Degrés de transcription d'un gène et méthylation des résidus lysines....	136
3.1.2	H3K4me3/H3K27me3 et discrimination des gènes transcriptionnellement actifs ou non.....	136
3.1.3	Concomitance des marques : gènes bivalents.....	137
3.1.4	Mécanismes de méthylation et déméthylation de H3K4 et H3K27	138
3.1.5	Equilibre H3K4me3 et H3K27me3 et engagement dans une lignée cellulaire	139
3.2	EZH2 et le complexe PRC2.....	141
3.2.1	Protéines du Groupe Polycomb (PcG)	141
3.2.1.1	Découverte et fonction des PcG.....	141
3.2.1.2	Fonctionnement général des complexes PRCs et répression génique	141
3.2.2	PcG chez les mammifères	141

Table des matières

3.2.3	PRCs, modifications épigénétiques et répression transcriptionnelle.....	142
3.2.4	Polycomb Repressive Complexe 1 (PRC1)	143
3.2.5	Polycomb Repressive Complexe 2 (PRC2)	145
3.2.5.1	Fonctions du complexe PRC2	145
3.2.5.2	Composition du complexe PRC2	145
3.2.5.3	Partenaires et cofacteurs de PRC2	146
3.2.5.4	Structure du complexe PRC2	147
3.2.5.5	Importance de la sous unité EZH2 pour la mise en place de H3K27me3 : PRC2-Ezh1 et PRC2-Ezh2	150
3.2.6	Mécanismes de recrutement des PRCs à la chromatine	151
3.2.7	Mécanismes de la régulation négative de la transcription par les PRCs ..	152
4	PRC2, EZH2 et engagement dans une voie de différenciation cellulaire.....	154
4.1	PRC2 et différenciation des cellules souches embryonnaires	154
4.2	PRC2, EZH2 et développement cardiaque	155
4.2.1	Méthylation des histones et différenciation vasculaire	155
4.2.2	EZH2 et différenciation cardiaque	156
4.3	EZH2, pathologies cardiovasculaires et régénération cardiaque.....	158
4.4	Dérégulation de EZH2 et activité oncogénique	160
4.5	Découverte des inhibiteurs de EZH2	161
4.5.1	Les inhibiteurs non-ciblés	161
4.5.2	Les inhibiteurs directs de petites molécules.....	162
4.5.3	Peptide synthétique inhibiteur : SAH-EZH2	163
5	EZH2 et régulation épigénétique de la polarisation en M2	164
5.1	Différenciation des monocytes en macrophages	164
5.2	Expression génique différentielle : monocytes versus macrophages.....	164
5.3	Gènes bivalents dans les monocytes humains.....	165
5.4	Activation et polarisation des macrophages : implication de H3K27me3 et EZH2	166
	Objectifs de l'étude	171
	Résultats	175
	Article de thèse	177

Table des matières

Articles de collaboration	251
Article de collaboration n°1.....	253
Article de collaboration n°2.....	271
Discussion et perspectives	291
Bibliographie	307
Ouvrages.....	307
Sites internet	307
Articles et revues.....	309
Annexes	347
Annexe 1 : Curriculum vitae	347
Annexe 2 : Articles de collaboration	351

Index des figures

<i>Figure 1 : Séparation des cellules</i>	29
<i>Figure 2 : Les différentes populations de monocytes circulant chez l'Homme et chez la souris</i>	31
<i>Figure 3 : Les sous populations monocytaires en fonction de l'expression du CD14 et du CD16</i>	35
<i>Figure 4 : Origine des macrophages tissulaires chez la souris</i>	39
<i>Figure 5 : Mobilisation des monocytes de la moelle osseuse vers le sang périphérique</i>	42
<i>Figure 6 : Recrutement tissulaire des monocytes circulants</i>	44
<i>Figure 7 : Diversité des macrophages et de leur signalisation</i>	47
<i>Figure 8 : Activation des macrophages classiques M1 et alternatifs M2</i>	49
<i>Figure 9 : Inducteurs, marqueurs de surface et fonctions des phénotypes de macrophages</i> ..	51
<i>Figure 10 : Mécanisme de polarisation des macrophages post-IDM</i>	53
<i>Figure 11 : Origine des macrophages cardiaques résidents</i>	55
<i>Figure 12 : Principaux facteurs régulant l'hématopoïèse</i>	58
<i>Figure 13 : Schéma d'illustration des vaisseaux du cœur</i>	60
<i>Figure 14 : Base biologique de la réparation cardiaque post-IDM : de l'inflammation à la fibrose</i>	64
<i>Figure 15 : Signalisation TLRs et NLRs</i>	67
<i>Figure 16 : Phases inflammatoires post-IDM</i>	69
<i>Figure 17a : Cinétique de recrutement des monocytes circulants en condition pathologique</i> .	70
<i>Figure 19 : L'extravasation des neutrophiles, dans le myocarde Post-IDM, dépend de l'activation des interactions adhésives entre les leucocytes et les cellules endothéliales</i>	74
<i>Figure 20 : Cellules NK et mémoire spécifique à l'antigène</i>	76
<i>Figure 21 : Influence des mastocytes sur les différents compartiments du tissu digestif</i>	81
<i>Figure 22 : Effets de médiateurs mastocytaires au cours de l'IDM</i>	82
<i>Figure 23 : Chymases et remodelage cardiaque</i>	83
<i>Figure 24 : Extravasation des monocytes</i>	84
<i>Figure 25 : Régulation des lymphocytes T par CD28 et CTLA-4</i>	85

Index des figures

<i>Figure 26 : IDM et implication des cellules inflammatoires</i>	90
<i>Figure 27 : IDM et rôle de l'IL-1</i>	92
<i>Figure 28 : IDM et rôle de l'IL-6</i>	98
<i>Figure 29 : Rôle de l'IL-10 dans la régulation de la signalisation cardiaque innée en conditions de stress (IL-10^{-/-} ou I/R)</i>	101
<i>Figure 30 : Fonction de l'IL-4</i>	102
<i>Figure 31 : Les membres de la superfamille TGF-β agissent par l'activation de voies de signalisation dépendantes et indépendantes de Smad</i>	104
<i>Figure 32 : Les multiples actions cellulaires du TGF-β dans le myocarde post-IDM</i>	107
<i>Figure 33 : Implication de CCL2 post-IDM</i>	108
<i>Figure 34 : Physiopathologie de la cicatrisation post-IDM</i>	112
<i>Figure 35 : Rôle des cellules immunitaires et des fibroblastes post-IDM</i>	113
<i>Figure 36 : Les différentes phases de la réponse inflammatoire post-IDM</i>	115
<i>Figure 37 : principales modifications épigénétiques</i>	122
<i>Figure 38 : les Dnmts chez les mammifères</i>	124
<i>Figure 39 : mécanisme de méthylation de l'ADN</i>	125
<i>Figure 40 : Mécanismes actifs de méthylation et de déméthylation de l'ADN</i>	127
<i>Figure 41 : Structure d'un nucléosome</i>	129
<i>Figure 42 : Répartition de plusieurs modifications épigénétiques sur les extrémités N- et C-terminales des histones constituant le nucléosome</i>	130
<i>Figure 43 : L'accessibilité transcriptionnelle de la chromatine est régie par des enzymes spécifiques</i>	131
<i>Figure 44 : Modifications post-traductionnelles de la queue des histones</i>	132
<i>Figure 45 : Méthylation et déméthylation des résidus lysine</i>	133
<i>Figure 46 : Méthylation et déméthylation des histones</i>	134
<i>Figure 47 : Promoteurs des gènes bivalents et concomitance des modifications épigénétiques</i>	137
<i>Figure 48 : Régulation de l'expression génique par les enzymes épigénétiques</i>	140
<i>Figure 49 : Complexes polycombs humains et régulation de la triméthylation de H3H27 et l'ubiquitination de H2AK119</i>	142
<i>Figure 50 : Composition des complexes PRC1 chez les mammifères</i>	143

Index des figures

<i>Figure 51 : Complexe PRC1</i>	144
<i>Figure 52 : Composition des complexes PRC2 chez les mammifères</i>	145
<i>Figure 53 : Représentation schématique des domaines structuraux de EZH2, EED et SUZ12</i>	147
<i>Figure 54: Structure de EZH2</i>	148
<i>Figure 55 : Structure du complexe PRC2 [Ezh2-Eed-Suz12 (VEFS)]</i>	148
<i>Figure 56 : Complexe PRC2</i>	149
<i>Figure 57 : Mécanisme de recrutement des PRCs à la chromatine</i>	151
<i>Figure 58 : Mécanisme de régulation négative de la transcription</i>	152
<i>Figure 59 : Phénotype des mutants Ezh2^{NK} ayant atteint l'âge adulte</i>	156
<i>Figure 60 : caractérisation du phénotype cardiaque des souris Ezh2-cKO</i>	157
<i>Figure 61 : Paysage épigénétique au cours du développement et de la maturation cardiaque</i>	158
<i>Figure 62 : Modifications épigénétiques post-natales dans les cardiomyocytes et prolifération</i>	159
<i>Figure 63 : Amélioration de la vasculogenèse par activation épigénétique des voies de signalisation pro-angiogéniques dans les progéniteurs endothéliaux humains</i>	160
<i>Figure 64 : Processus de différenciation et polarisation en macrophages M1 et M2</i>	164
<i>Figure 65 : Distribution des modifications H3K4me3 et H3K27me3 au niveau des promoteurs de gènes inactifs, actifs et bivalents</i>	165
<i>Figure 66 : Implication dans les fonctions biologiques des gènes bivalents présents dans les monocytes humains</i>	166
<i>Figure 67 : Régulation épigénétique de la polarisation en macrophage M2</i>	167
<i>Figure 68 : Contrôle épigénétique de l'activation alternative des macrophages (M2)</i>	168
<i>Figure 69 : inhibition de EZH2 et de l'inflammation médiée par Socs3</i>	169
<i>Figure 70 : Amélioration de la réparation cardiaque post-IDM par la thérapie pharmacoépigénétique d'inhibition de EZH2</i>	171
<i>Figure 70 : Expression cardiaque du Vegfa post-IDM</i>	293
<i>Figure 71 : Ezh2 et régulation de l'activation des macrophages/de la microglie et de l'inflammation auto-immune.</i>	302
<i>Figure 72 : EZH2 et RA objectifs de travail</i>	303
<i>Figure 73 : Transition métabolique cardiaque et développement de l'IC</i>	305

Index des Tableaux

<i>Tableau 1 : Composants des milieux de séparation par gradient de densité</i>	<i>29</i>
<i>Tableau 2 : Classification des monocytes humains et murins</i>	<i>36</i>
<i>Tableau 3 : DAMPS et PRRs</i>	<i>66</i>
<i>Tableau 4 : Principaux types de PRRs</i>	<i>67</i>
<i>Tableau 5 : Role du TNF α.....</i>	<i>97</i>
<i>Tableau 6 : Modification épigénétiques et transcription</i>	<i>136</i>
<i>Tableau 7 : Classification des KMTs</i>	<i>138</i>
<i>Tableau 8 : Classification des KDMs</i>	<i>139</i>
<i>Tableau 9 : Domaines structuraux de EZH2</i>	<i>147</i>
<i>Tableau 10 : Inhibiteurs du complexe PRC2</i>	<i>162</i>

Abréviations

A

α -SMA : alpha-Smooth Muscle Actin

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

Aebp2 : Adipocyte enhancer binding protein 2

AKT : Protéine Kinase B (PKB)

APC : Antigen-Presenting Cell

ARN : Acide RiboNucléique

ARNpolIII : ARN polymérase II

AT : angiotensine

AV : Auriculo-Ventriculaire

B

Baff-R : B cell-activating factor Receptor

BAM : β -Barrel Assembly Machinery

BER : Base Excision Repair

BMP : Bone Morphogenetic Protein

C

CCL : C-C motif chemokine Ligand

CCR2: C-C chemokine Receptor type 2

CCS : Carcinome CorticoSurrénalien

CD : Cluster de Différenciation

cDC : Cellules Dendritiques conventionnelles

CH3 : groupement méthyl

CHAER : Cardiac Hypertrophy Associated Epigenetics Regulator

ChIP : Chromatine ImmunoPrecipitation, ImmunoPrécipitation de la Chromatine

Abréviations

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

CMHII : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II

CSs : Cellules Souches

CT : cardiotrophine

CTMC : Connective Tissue Mast Cells (mastocytes séreux)

Cx : connexine

CXC : Cysteine rich domain

CX3CR1 : CX3C chemokine Receptor 1

CXCL : Chemokine (C-X-C motif) ligand

CytoF : Cytometry by Time Of Flight

D

DAMPs : Damaged Associated Molecular Patterns Signals ou motifs moléculaires associés au danger)

DBD : DNA Binding Domains

Dnmts : DNA methyl transferases (méthyltransférases de l'ADN)

DOT1 : Disruptor Of Telomeric silencing-1

E

EBD : EED Binding Domain

ECFCs : Endothelial Colony-Forming Cells

EDTA : ÉthylèneDiamineTétraAcétique

EED : Embryonic Ectoderm Development

ELR : glutamate – leucine – arginine

Er α : récepteur aux œstrogènes

ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase

ES : Souches Embryonnaires

ESL-1 : E-selectin ligand-1

Abréviations

EZH2 : Enhancer of Zest Homologue 2

F

FT : Facteur de Transcription

G

Gr1 : GRanulocyte antigen-1

GDF : Growth Differentiation Factor

GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

H

H3K4me : méthylation de la lysine 4 de l'histone H3

H3K9me : méthylation de la lysine 9 de l'histone H3

H3K27me : méthylation de la lysine 27 de l'histone H3

H3K36me : méthylation de la lysine 36 de l'histone H3

H3K79me : méthylation de la lysine 79 de l'histone H3

HDM : Histones DÉMéthylase

HLA-DR : Human Leukocyte Antigen – DR isotype

HMGB : High Mobility Group Box

HMT : Histones MéthylTransférase

HOTAIR : HOx Transcript Antisense RNA

HP : HématoPoïèse

I

IC : Insuffisance Cardiaque

ICAM1 : Intercellular Adhesion Molecule 1

ICF : Immunodeficiency, Centroméric instability and Fascial anomalies

IDM : Infarctus Du Myocarde

Abréviations

IFN- γ : InterFéroN-gamma

IL : Interleukine

iNOS : Nitric Oxide Synthase, inducible

IP : Intra-Péritonéale

IR : Ischémie Reperfusion

IRAK : Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase

IV : Intra -Veineuse

J

JAK : Janus Kinase

JARID : Jumonji AT-Rich Interactive Domain

JMJD3 : Jumonji domain-containing protein D3

K

KDMs : lysines déméthylases

KMTs : lysines méthyltransférases

KO : Knock-Out

L

LAP : Latency Associated Peptide

LFA-1 : Lymphocyte function-associated antigen 1

LIF : Leukemia Inhibitor Factor

LIMK1 : LIM domain kinase-1

lnc RNA : long ARNs non codant

LOX : Lysyls OXYdases

LPS : LipoPpolySsaccharide

LSD : Lysine-Specific histone Demethylase

LTBP : Latent TGF- β Binding Protein

Abréviations

(Ly)-6C : Lymphocyte antigen

M

M2 : macrophages de type M2

Mac-1 : Macrophage-1 antigen

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MBPs : Methyl-CpG Binding Proteins

MMC : Mucosal Mast Cells (mastocytes muqueux)

MCP1 : Monocyte Chemoattractant Protein 1

M-CSF : Macrophage-Colony Stimulating Factor

MCSS : Motif Connecting SANT1 and SANT2

me1 : monométhylation

me2 : diméthylation

me3 : triméthylation

MEC : Matrice ExtraCellulaire

MERTK : Myeloid-Epithelial-Reproductive Tyrosine Kinase

MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

MLL : Mixed Lineage Leukemia

MMC : Mucosal Mast Cells

MMP : MétalloProtéases Matricielles

MRC1 : Mannose Receptor C-Type 1

MTF2 : Metal response element binding Transcription Factor 2

MYD88 : Myeloid differentiation primary response 88

N

NALP3 : NACHT, LRR and PYD domains containing protein

NF-kB : Nuclear Factor-kappa B

NK : Natural Killers

Abréviations

NKG : Natural Killer Group

NLRP3 : Nucleotide-Binding Oligomerization Domain, Leucine Rich Repeat And Pyrin Domain Containing 3

NLS : Nuclear Localization Sequence

O

OMS : Organisation mondiale de la Santé

P

PAMPs : Pathogen Associated Molecular Patterns

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cell

PCL1 : PolyComb-Like 1 protein

PCNA : Proliferative Cell Nuclear Antigène

PcG : Groupe Polycomb

PHF1 : PHD Finger protein 1

PKMT : Protein lysine méthyltransférases

PRMTs : Protein arginine méthyltransférases

PMC : Progéniteur Myéloïde Commun

PR-DUB : Polycomb Repressive DeUBiquitinase

PRC : Polycomb Repressor Complex

PRE : PcG Response Element

PRMT : Protein arginine methyltransferase

PRR : Pathogen Recognition Receptors

PSGL1 : P-selectin glycoprotein ligand-1

R

RA : Rétrécissement Aortique calcifié

RAWUL : Ring finger And WD40 Ubiquitin Like

Abréviations

Rbbp4/7 : Retiniblastoma binding proteins 4 and 7

RCPG : Récepteurs à sept segments transmembranaires Couplés aux Protéines G

RIPseq : RNA Immune-Precipitation-sequencing

ROR α : Retinoic acid related Orphan nuclear Receptor α

ROS : Reactive Oxygen Species

S

SAH : S-Adénosyl-l-Homocystéine hydrolase

SAL : SET Activation Loop

SAM : S-AdenosylMethionine

SBD : SANT1L Binding Domain

SCF : Stem Cell Factor

SDS : Sulfate Dextran Sodique

SET : Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax

SRM : Stimulation-Responsive Motif

STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription

SUV39H1 : Suppressor Of Variegation 3-9 Homolog 1

SUZ12 : Suppressor of Zeste 12 Homolog

T

TAC : Trans Aortic Constriction

TAN : Tumor Associated Neutrophiles

TCR : T Cell Receptor

TET : Ten-Eleven-Translocation

TGF- β : Transforming Growth Factor-bêta

TGFR : récepteur membranaire du TGF- β

TIMP : Tissue Inhibitors of Matrix metalloProteinases

TLR4 : Toll-Like Receptors 4

Abréviations

TNF : Tumor Necrosis Factor

TRAIL : Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand

Tregs : cellules T régulatrices

TSP-1 : Thrombospondin-1

TSS : site d'initiation de la transcription

TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling

U

UTX : Ubiquitously Transcribed Tetratricopeptide Repeat X

V

VCAM1 : Vascular Cell Adhesion Molecule 1

VEFS : VRN2-EMF2-FIS2-SU(Z)12

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VG : Ventricule Gauche

Chiffres

5hmC : 5-hydroxymethyl-cytosine

5mC : 5-methyl-cytosine

Introduction

Chapitre 1 : Rôle physiopathologique des monocytes/macrophages

L'inflammation cardiaque, ainsi que l'œdème et la fibrose, sont des caractéristiques communes à ces nombreuses maladies cardiovasculaires. La recherche au cours des 20 dernières années a démontré que les cellules immunitaires jouent un rôle essentiel dans la réparation et le remodelage cardiaque dans les maladies ischémiques, avec des impacts bénéfiques ou délétères en fonction de la caractéristique de l'infiltrat cellulaire. Récemment, le potentiel thérapeutique de l'immunomodulation dans les maladies cardiovasculaires a été mis en évidence avec la découverte des effets bénéfiques d'un traitement anti-inflammatoire ciblant l'interleukine (IL)-1 β [1]. Au cours de cette thèse, nous avons évalué des approches innovantes ciblant l'inflammation cardiaque. Ce premier chapitre sera dédié à une présentation générale et brève des cellules immunitaires, suivie par une caractérisation plus en profondeur des deux populations des cellules myéloïdes, les monocytes et macrophages, qui sont au cœur de cette thèse.

1 Découverte des leucocytes, monocytes et des macrophages

Les leucocytes ont été identifiés pour la première fois en 1843 grâce aux travaux simultanés de Gabriel Andral et de William Addison. Ils ont observé des altérations des leucocytes au cours de diverses pathologies. Ainsi, l'impact potentiel de ces nouvelles cellules suscita un intérêt sur leur fonctionnement.

A la fin du XIX^{ème} siècle, l'approche scientifique de la vaccination par Louis Pasteur permet de définir l'immunologie comme la science de la défense de l'organisme contre des agressions externes de l'hôte. Ce sont ensuite les découvertes de Elie Metchnikoff sur la capacité de leucocytes à ingérer des corps étrangers ou des cellules exogènes, soit la capacité de phagocytose, qui établissent les bases de notre compréhension de l'immunité cellulaire, complétant ainsi l'immunité humorale décrite parallèlement par Paul Ehrlich. Ces découvertes sur l'immunité cellulaire et humorale furent récompensées par le prix Nobel de médecine et physiologie de 1908. Depuis, l'immunologie a été partagée en deux branches et a évolué en immunologie non-spécifique ou innée et l'immunologie spécifique ou adaptative.

1. Découverte des leucocytes, monocytes et des macrophages

Depuis leur découverte par Gabriel Andral et William Addison, de nombreuses études ont tenté de purifier les leucocytes circulants. Les premières méthodes utilisées consistaient en l'hémolyse des érythrocytes soit par des acides soit par la saponine. La fraction cellulaire récupérée a permis de débiter les investigations biochimiques sur les leucocytes. Le rendement étant faible et la fraction cellulaire étant contaminée par les érythrocytes, les études suivantes ont utilisé le principe de sédimentation différentielle des cellules pour séparer les leucocytes des érythrocytes (Westergren, Wintrobe 1935). Ce principe fut utilisé en 1937 par Fleischmann et Larizza qui obtinrent 2 phases distinctes après centrifugation en cylindre en verre de sang total dilué dans du citrate. Les érythrocytes se retrouvent dans la phase inférieure quand le plasma est retrouvé dans la phase supérieure (*Figure 1*). Ces deux phases sont séparées par un anneau qui contient les leucocytes. Le rendement étant toujours faible et la contamination par les érythrocytes toujours présente, les méthodes de sédimentation par densité ont été développées à partir de 1947 par Vallée, Hughes et Gibson [2].

Dès 1949, dans le but d'obtenir une sédimentation plus rapide pour l'isolement des cellules polymorphonucléaires (granulocytes), des expérimentations consistant à ajouter au sang total un agent permettant l'agrégation des érythrocytes tel que du fibrinogène et de l'héparine ont été réalisées. Elles ont permis de maintenir les leucocytes dans la phase du plasma avec une sédimentation des érythrocytes au bout d'une heure. Les leucocytes sont ensuite séparés du plasma par adhérence sur lame [3]. Cette technique a évolué vers une séparation rapide des leucocytes purs avec l'association à partir de 1955 de la phyto-hemagglutinine au dextran ou au fibrinogène permettant ainsi la sédimentation et l'agglutination des érythrocytes après centrifugation à 200G ce qui a diminué la contamination par les globules rouges (Skoog and Beck 1955).

Ce sont ensuite les travaux menés par Arne Bøyum en 1964 qui ont mis au point les différents types de séparation par gradient de densité permettant d'obtenir une fraction contenant les cellules mononuclées du sang ou PBMC (pour Peripheral Blood Mononuclear Cell) (*Tableau 1*) comprenant les cellules lymphoïdes d'une part, et les cellules myéloïdes d'autre part, dont les monocytes et les cellules dendritiques.

1. Découverte des leucocytes, monocytes et des macrophages

Composant du milieu de sélection	Temps nécessaire de séparation	Rendement/contamination
Ficoll (densité 1.09) + ÉthylèneDiamineTétraAcétique (EDTA) Sang récupéré dans un anticoagulant (héparine)	40 minutes maximum	De 50 à 60% de leucocytes très peu de globules rouges contaminants
Isopaque + Dextran	entre 10 et 60 minutes	De 30 à 50% de leucocytes
Isopaque + Ficoll		De 40 à 60 % en leucocytes
EDTA + Dextran	entre 20 et 60 minutes	De 60 à 80% de leucocytes

Tableau 1 : Composants des milieux de séparation par gradient de densité

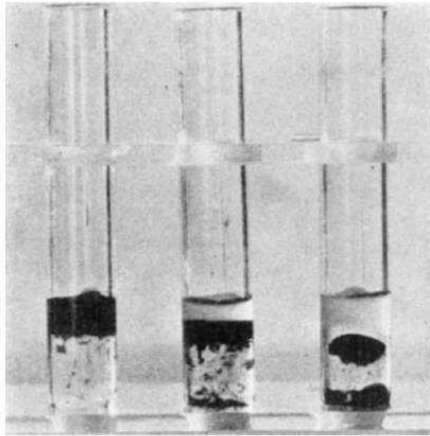


Figure 1 : Séparation des cellules

Boyum et al., 1964, Boyum et al., 1974 [4, 5]

Mélange "Isopaque" (33¼ pour cent) et la méthylcellulose (1-2 : pour cent). Gravité spécifique 1-09. Situation après 1, 15 et 30 min.

L'obtention de cette population de PBMC était la condition *sine qua none* à l'analyse plus poussée des constituants des leucocytes, notamment les monocytes. Dès 1958, Wachtein développe une technique nommée « non-specific esterase » qui permet la reconnaissance des monocytes par l'élimination des lymphocytes déposés sur une lame et l'hydrolyse de l' α naphthyl-butyrates par les monocytes formant ainsi un précipité rouge [6]. Ainsi, c'est la capacité d'adhérence au verre et de phagocytose qui a permis dans un premier temps de sélectionner au sein des leucocytes les monocytes aussi appelés phagocytes mononuclés [7, 8]. Suite à cette possibilité de purification des monocytes et au constat de leur implication dans le développement de certaines pathologies, de nombreuses études ont été menées dans le but de comprendre leurs fonctions et leurs rôles en conditions physiologiques et pathologiques.

1. Découverte des leucocytes, monocytes et des macrophages

Néanmoins, ces méthodes ne permettent pas l'obtention d'une population pure et posent également un problème de reproductibilité rendant difficile l'obtention d'une fraction semblable d'une étude à l'autre et donc une classification fonctionnelle. C'est l'essor de la cytométrie en flux avec des anticorps monoclonaux permettant de marquer différents types cellules qui a permis à Todd et collaborateurs [9] d'identifier un marqueur commun aux cellules constituant la fraction adhérente précédemment décrite. Ce marqueur commun est la molécule de surface Cluster de Différenciation (CD)14. Il s'agit du récepteur du LipoPolySaccharide (LPS) bactérien.

Aujourd'hui, les monocytes sont connus comme des leucocytes circulants, précurseurs de plusieurs populations de cellules dendritiques et de macrophages tissulaires. Ils sont considérés comme des acteurs clés dans la mise en place des réponses immunitaires innées tant en condition physiologiques que pathologiques.

2 Hétérogénéité monocyttaire

2.1 Caractérisation de monocytes circulants humains

Les premières études sur les monocytes reposant sur des techniques de centrifugation et d'élutriation ont permis de mettre en évidence une hétérogénéité morphologique (taille, densité, granulosité et morphologie nucléaire) des monocytes distinguant dès lors deux populations distinctes.

Fin des années 1980, les études montrant que les populations monocytaires diffèrent phénotypiquement et fonctionnellement se multiplient. Les études de Figdor et collaborateurs décrivent notamment deux sous types de monocytes dans le sang humain qui se différencient par leur morphologie, leur fréquence ainsi que leur profil d'expression des antigènes de surface CD14 (co-récepteur au LPS) et CD16 (Récepteur au fragment Fc γ III/ récepteur d'IgG à faible affinité) [10]. Passlick et collaborateurs [11] ajoutent que 5 à 10% des monocytes CD14⁺ expriment également le CD16. Ainsi initialement deux populations majeures de monocytes sont donc décrites: *i*) les cellules CD14⁺⁺CD16^{neg} ou monocytes classiques et *ii*) les cellules CD14⁺CD16⁺⁺ ou monocytes non classiques [11]. Plus récemment, une troisième population est décrite chez l'homme : les monocytes intermédiaires CD14⁺⁺CD16⁺ [12]. Ces derniers, bien que CD16 positif comme les monocytes non classiques, diffèrent sur le plan phénotypique et fonctionnel [13-15].

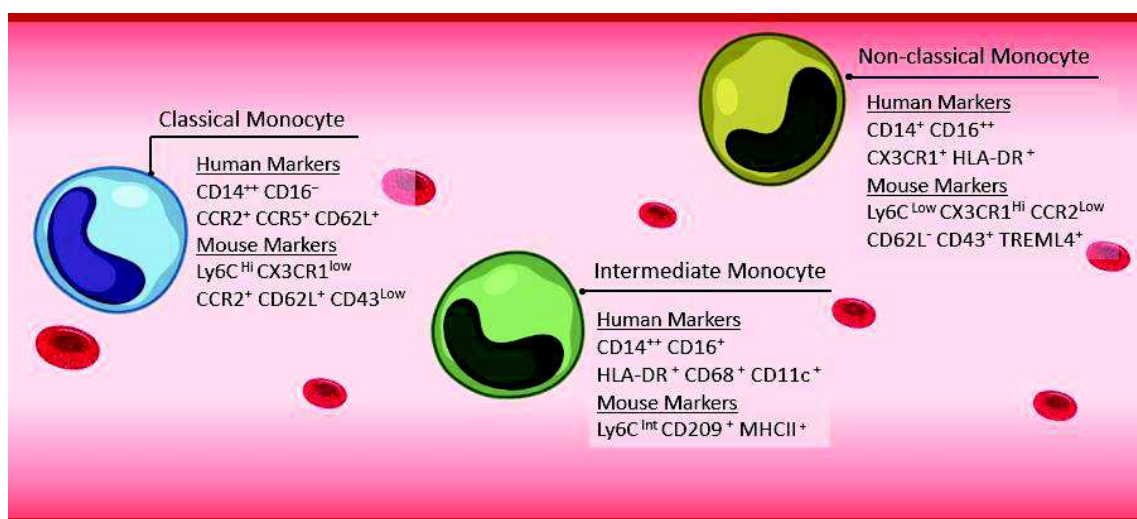


Figure 2 : Les différentes populations de monocytes circulants chez l'Homme et chez la souris (d'après Biocompare)

Les monocytes sont des cellules circulantes qui constituent entre 2 à 5% des leucocytes humains ($2 \cdot 10^5$ à 10^6 monocytes/ml) et entre 2 à 8% des leucocytes chez la souris ($5 \cdot 10^4$ à 10^5 monocytes/ml). En conditions physiologiques, ils effectuent un rôle de surveillance, notamment antimicrobien, au sein de la circulation sanguine. Ils possèdent un grand nombre de récepteurs capables de reconnaître les molécules considérées comme étrangères qu'elles soient exogènes (Pathogen Associated Molecular Patterns ou PAMPs) ou endogènes (débris cellulaires, Damage Associated Molecular Pattern ou DAMPs). Lorsqu'elles sont stimulées par la détection de PAMPs ou DAMPs, ces cellules effectrices du système immunitaire inné peuvent alors agir en sécrétant des cytokines immunomodulants mais également capter des débris cellulaires ou des molécules toxiques. En effet, les monocytes effectuent la clairance de microorganismes dans le cas d'une infection systémique, par exemple la bactérie *Lystéria Monocytogenes*, de par leurs TLR membranaires et de par leur activité bactéricide via la production de ROS et l'action d'enzymes protéolytiques lysosomales [16, 17]. De même, la clairance de débris apoptotiques de cellules endogènes endommagées par les monocytes matures a été mise en évidence par l'équipe du Dr. Peng [18]. Par ailleurs, les monocytes jouent un rôle de défense contre les pathogènes par leur capacité à effectuer la présentation antigénique, néanmoins de façon moins efficace que les cellules dendritiques. Les monocytes possèdent une grande diversité et une plasticité fonctionnelle, et de nombreuses études *in vivo* et *in vitro*, tant chez l'homme que chez la souris, ont essayé d'associer des fonctions spécifiques aux différentes sous-populations de monocytes. Il semble que les phénotypes et les fonctions des monocytes soient dépendants des stimuli rencontrés dans l'environnement, et que ces cellules ont un remarquable répertoire d'activité.

2.1.1 Monocytes classiques

Les monocytes classiques $CD14^{++}CD16^{neg}$ constituent la population majoritaire (85-90%) de monocytes circulants [19]. Au niveau phénotypique, ils sont caractérisés par un profile : Human Leukocyte Antigen – DR isotype (HLA-DR)⁺ /C-C chemokine Receptor type 2 (CCR2)^{high} /CX3C chemokine Receptor 1 (CX3CR1)^{dim} /CD62L^{high} et présentent une forte homologie avec les monocytes murins caractérisés par : GRanulocyte antigen-1 (Gr1)^{high} (Lymphocyte antigen (Ly)-6C^{high}) (présentés ultérieurement partie 2.2) (Figure 2).

Les monocytes classiques sont impliqués dans la réaction inflammatoire et associés à des fonctions pro-inflammatoires avec une forte capacité de phagocytose et un niveau élevé de production de dérivés actifs de l'oxygène (Reactive Oxygen Species ou ROS).

In vitro une supplémentation en LPS entraîne une forte activation des monocytes classiques via le récepteur Toll-Like Receptor (TLR)-4, entraînant une production d'interleukines (IL) : IL-6, IL-8, et IL-10. L'activation de ces monocytes entraîne également la production des chimiokines « C-C motif chemokine Ligand » (CCL)-5, CCL2 et CCL3 ainsi qu'une production modérée de Tumor Necrosis Factor (TNF)- α [15, 19].

Les analyses transcriptomiques menées par plusieurs équipes confirment les propriétés pro-inflammatoires des monocytes classiques en mettant en évidence une expression accrue de certains gènes dans cette population par rapport aux autres types de monocytes, notamment les médiateurs de l'inflammation qui font partie des gènes les plus exprimés dans les monocytes classiques [15, 20].

Des analyses par micro-array (puces à ARN) ont également permis d'analyser les gènes préférentiellement exprimés par ces monocytes classiques. Par exemple, les gènes impliqués dans la réponse anti-microbienne sont plus exprimés par les monocytes classiques comparativement aux non classiques et intermédiaires. Ces analyses confirment également une expression préférentielle de CD14, CCR2 et du récepteur au Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) par les monocytes classiques [21, 22].

De telles analyses transcriptomiques, comparant des centaines de gènes simultanément entre plusieurs populations cellulaires, permettent également d'étudier leur proximité ontogénique. Les études de Cross et collaborateurs évoquent une proximité plus forte entre les monocytes classiques et les monocytes intermédiaires avec les monocytes non classiques [19].

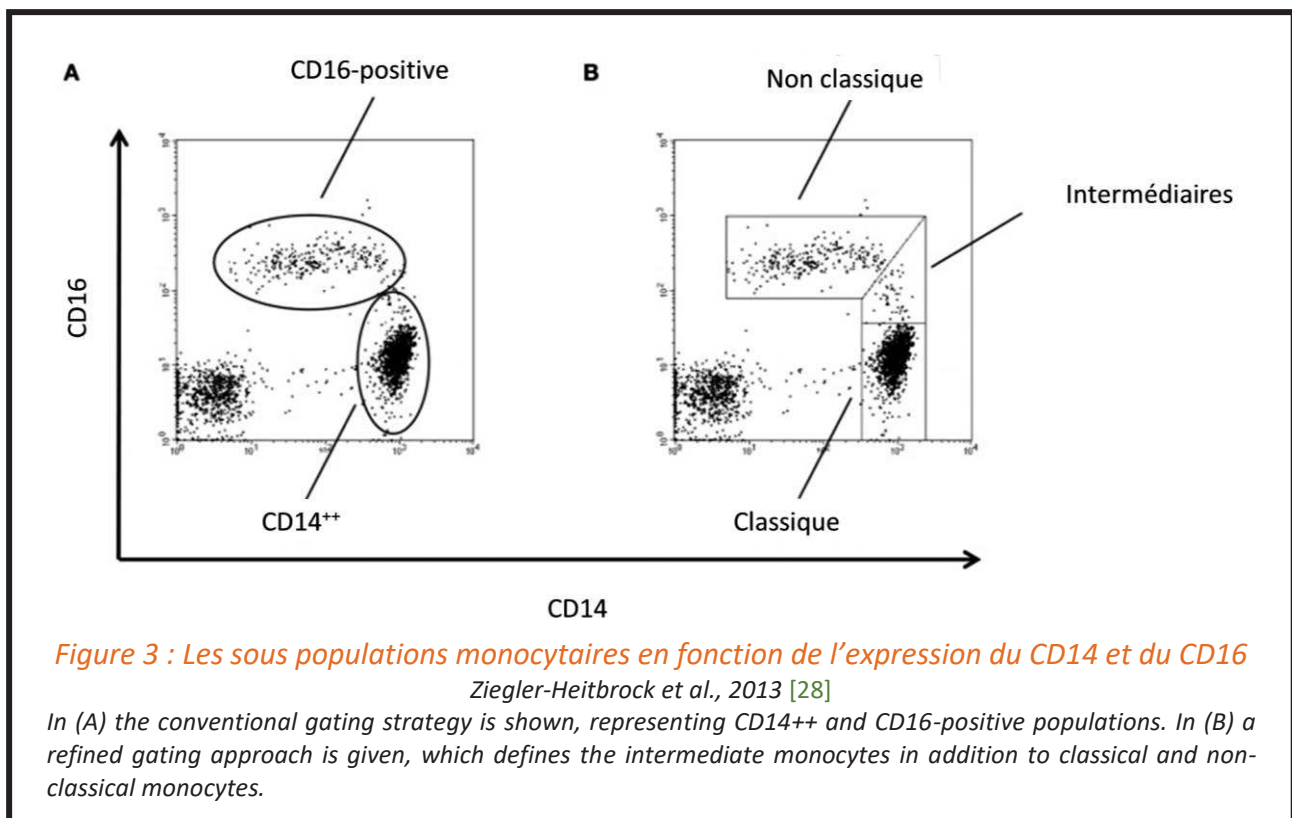
Au niveau fonctionnel, les monocytes classiques se distinguent également par leur faible capacité de présentation antigénique comparativement aux autres sous-types de monocytes [19, 23, 24].

2.1.2 Monocytes non classiques

Les monocytes non classiques CD14⁺CD16⁺⁺ se distinguent par l'expression plus faible du CD14 et du CCR2, mais plus forte du CD16, en comparaison des monocytes classiques. Différent des monocytes classiques, les cellules non-classiques n'ont pas d'activité de phagocytose (*Figure 2 et 3*). Par ailleurs, la supplémentation en LPS *in vitro* n'entraîne ni la sécrétion d'IL-10, ni du TNF α et ni de l'IL-1 β . De façon intéressante, leur faible production d'IL-1 β est liée non pas à un défaut d'activation d'expression d'IL-1 β , mais à une dégradation plus rapide de son l'ARNm, associée à une plus forte expression dans des monocytes non-classiques d'une protéine chaperonne le heat shock protein (Hsp)-27 [25].

2.1.3 Monocytes intermédiaires

Les monocytes intermédiaires CD14⁺⁺CD16⁺ [12], expriment les Fc récepteurs CD64 et CD32 (*Figure 2 et 3*). *In vitro* une supplémentation en LPS entraîne la sécrétion de TNF α et de l'IL-1 β , comme chez des monocytes classiques. D'autre part, les monocytes intermédiaires possèdent également une activité de phagocytose, leur conférant ainsi un fort potentiel pro-inflammatoire [26]. Ces cellules expriment des taux plus faibles du CCR2, mais plus forts du CCR5, par rapport aux monocytes classiques [27]. Cependant, il reste à déterminer si les monocytes intermédiaires ont un rôle biologique distinct ou si cette population ne représente qu'une forme intermédiaire entre les monocytes classiques et non-classiques. Il semble néanmoins que leur taux est sélectivement augmenté dans certaines maladies auto-immunes, suggérant des activités spécifiques immunomodulatoires à cette sous population monocyttaire.



Depuis la proposition en 2008 de la classification des monocytes circulants en ces trois sous-populations, l'essor des techniques de tri cellulaire par cytométrie en flux a permis l'analyse récente, par Thomas et collaborateurs, de 36 marqueurs sur des PBMC par la technique de Cytometry by Time Of Flight (CyTOF), combinant cytométrie de flux et spectroscopie de masse, afin d'identifier chez l'Homme 47 nouveaux marqueurs spécifiques des trois sous-populations de monocytes [29]. Ainsi, les quatre marqueurs CCR2, CD36, CD11c, et HLA-DR permettraient, en plus de CD14 et CD16, de mieux discriminer les différentes sous-populations de monocytes. Les monocytes classiques étant caractérisés par une expression forte du CD11c et faible de HLA-DR (CD11c^{low} HLA-DR^{low}), les monocytes non classiques par une expression faible de CCR2 et CD36 (CCR2^{low} et CD36^{low}), et finalement une expression forte des quatre marqueurs caractériserait les monocytes intermédiaires. Il faut cependant noter que CD14 et CD16 restaient de manière très marquée les molécules dont l'expression discriminait le mieux les sous-populations (Figure 3).

Sous population monocytaire	Marqueurs	Récepteurs aux chimiokines	Fonction
Humain			
Classiques	CD14 ⁺⁺ CD16 ^{neg}	CCR2 ^{hi} CX3CR1 ^{low}	Proche des Ly6C ^{hi}
Intermédiaires	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺ [12]	CCR2 ^{low} CX3CR1 ^{hi}	Pro-inflammatoire
Non classiques	CD14 ⁺ CD16 ⁺	CCR2 ^{low} CX3CR1 ^{hi}	Patrouilleur /Rôle antiviral
Souris			
Ly6C^{hi} pro-inflammatoires	CD11b ⁺ CD115 ⁺ Ly6C ^{hi}	CCR2 ^{hi} CX3CR1 ^{low}	Pro-inflammatoires Rôle antimicrobien
Ly6C^{low} Immunomodulateurs	CD11b ⁺ CD115 ⁺ Ly6C ^{low}	CCR2 ^{low} CX3CR1 ^{hi}	Patrouilleur Réponses primaires Réparation tissulaire

Tableau 2 : Classification des monocytes humains et murins

En effet, les profils d'expression de CCR2 et de CD36 étaient largement superposables à celui de CD14, réduisant donc leur intérêt dans des analyses discriminatives.

Cette hétérogénéité monocytaire initialement décrite chez l'Homme s'avère être une caractéristique conservée chez les mammifères (cochons, rats, souris, vaches). Ainsi, chez les souris, qui constituent un de nos modèles expérimentaux privilégiés en laboratoire, nous retrouvons plusieurs sous populations de monocytes [30-32] (*Tableau 2*).

L'expression des récepteurs aux chimiokines principalement utilisée pour discriminer les différentes sous populations monocytaires dans les modèles murins sont également applicables chez l'Homme. En effet, l'expression relative des molécules de surface CCR2 et CX3CR1 permet de distinguer une population de monocytes CX3CR1^{low}CCR2^{high}, rapidement recrutée dans les tissus en situation inflammatoire, et une population de monocytes CX3CR1^{high}CCR2^{low}, migrant dans les tissus en l'absence d'inflammation. (*Tableau 2*).

Néanmoins, la classification des monocytes présents dans les PBMC humains selon le profil CD14/CD16 permet d'exclure les cellules dendritiques qui n'expriment pas le CD14. Dans les études fonctionnelles où sont purifiés des PBMC sur la base de l'expression du CD64 [33] ou des récepteurs aux chimiokines [34], il est donc possible que des cellules dendritiques contaminent les échantillons et faussent donc l'interprétation des analyses fonctionnelles des sous-populations de monocytes.

2.2 Caractérisation de monocytes circulants murins

L'équipe du Dr Geissman a contribué à la caractérisation initiale des sous types monocytaires retrouvés chez la souris, avec la première description *in vivo*, en 2003, de deux populations de monocytes distinctes possédant des propriétés migratoires différentes [34].

Les monocytes murins se distinguent des autres leucocytes murins par l'expression du récepteur au M-CSF (le CD115) et de l'intégrine CD11b.

Comme précédemment décrit chez l'homme il est possible de classier les différentes populations monocytaires par leur expression différentielle des récepteurs aux chimiokines. Chez la souris, ce sont les récepteurs CX3CR1 et CCR2 qui sont couramment utilisés pour la classification (*Figure 2, Tableau 2*).

De même, il est possible de séparer les deux populations monocytaires selon l'expression de Ly-6C ou de Gr1. Gr1 est un antigène de différenciation myéloïde, cet épitope est présenté par deux molécules : *i)* Ly-6G porté par les granulocytes et *ii)* Ly-6C porté majoritairement par les monocytes et dans une moindre mesure par les neutrophiles dans la moelle osseuse [35].

Ainsi, nous retrouvons comme précédemment une population de monocytes dits classiques ou inflammatoires Ly6C^{high}, et de monocytes non classiques, Ly6C^{low} (*Figure 2, Tableau 2*).

2.2.1 Monocytes classiques ou « pro-inflammatoires »

En conditions homéostatiques, entre 50% et 60% des monocytes circulants chez la souris appartiennent à la sous population des monocytes dits « classiques », correspondant à 2 à 5% des tous les leucocytes circulants [16]. Ils sont caractérisés par une forte expression du Ly-6C associée à une forte expression de CCR2 et une faible expression de CX3CR1. La forte expression de CCR2 s'accompagne de l'expression du CD62L (CD62-ligand ou L-selectine), les deux impliqués dans le recrutement des monocytes au sein des tissus inflammés. Les études de Kurihara et collaborateurs montrent qu'une déficience en CCR2 s'accompagne d'un recrutement diminué des monocytes vers des sites lésés ou inflammés [36, 37]. Ces monocytes classiques Ly-6C^{high} CCR2^{high} CX3CR1^{low} CD62L⁺ possèdent une demi-vie courte dans la circulation, et sont préférentiellement recrutés au sein des tissus/sites

inflammés où ils sont les précurseurs des macrophages tissulaires ou cellules dendritiques [16]. De plus, leur capacité de production de TNF α et de ROS confère à ces monocytes un fort potentiel pro-inflammatoire.

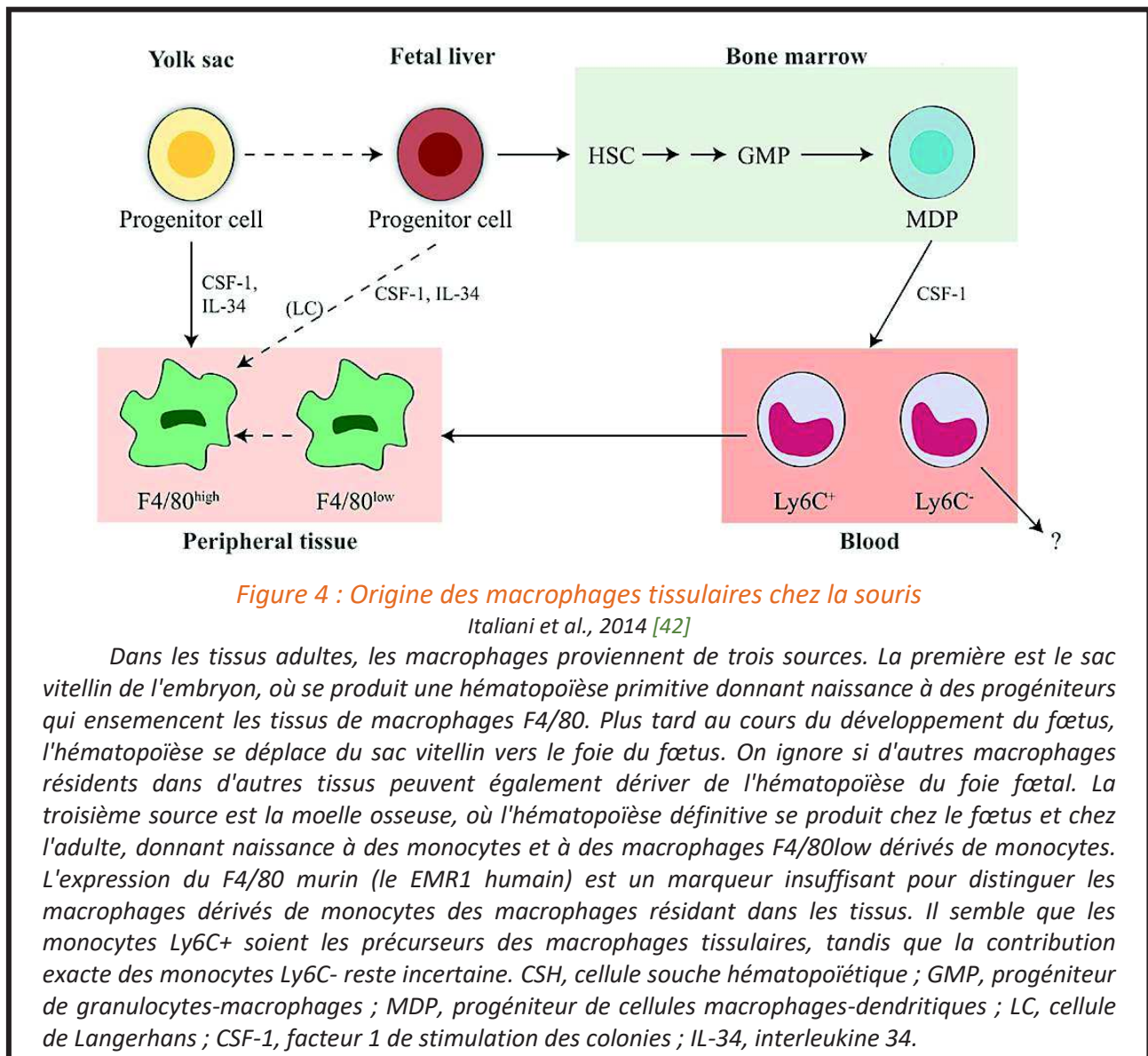
2.2.2 Monocytes non classiques ou « résidents »

La seconde population monocyttaire correspond à des monocytes présentant une faible expression du Ly-6C associée à une faible expression de CCR2 et une forte expression de CX3CR1. Ces monocytes qui n'expriment pas le CD62-L sont moins efficacement recrutés sur les sites inflammatoires. En effet, ces monocytes Ly-6C^{low} CCR2^{low} CX3CR1^{high} CD62L⁻, dits monocytes non-classiques, possèdent une demi-vie plus longue dans la circulation et sont les précurseurs tissulaires des macrophages résidents et des cellules dendritiques en conditions homéostatiques. Cette classification chez la souris reste actuellement inchangée depuis 1995 [32, 38-40].

Les différentes sous populations monocytaires chez l'Homme comme chez la souris exercent donc des fonctions spécifiques aux pathogènes rencontrés.

2.3 Monocytes comme précurseurs des macrophages tissulaires

Outre leurs fonctions effectrices dans le sang, les monocytes constituent un réservoir circulant de cellules précurseurs de phagocytes mononuclés tissulaires (macrophages et cellules dendritiques) en conditions physiologiques et pathologiques. En effet, les monocytes constituent l'un des composants du système des phagocytes mononuclées, ils se développent dans la moelle osseuse adulte lors du processus d'hématopoïèse à partir d'un progéniteur myéloïde commun (PMC) qu'ils partagent avec les macrophages et les Cellules Dendritiques conventionnelles (cDC) [41] (Figure 4). Après leur différenciation initiale, les monocytes sont libérés dans la circulation sanguine. Historiquement, ce stade circulatoire des monocytes représente un lien direct entre les précurseurs myéloïdes de la moelle osseuse et les macrophages différenciés ou les cDC retrouvées dans les tissus (Figure 4).



Comme décrit préalablement, la durée de vie des monocytes dans la circulation sanguine est variable en fonction du sous type considéré. En effet, en utilisant une approche de marquage de traçage radioactif, Patel et collaborateurs ont constaté que les monocytes classiques humains ont une demi-vie d'environ 1 jour dans la circulation, ces cellules pénètrent ensuite rapidement dans les tissus, meurent ou mûrissent en monocytes non classiques, qui possèdent eux une demi-vie plus prolongée d'environ 7 jours. Chez la souris la demi-vie des monocytes circulants est estimée à 1 jour.

Aujourd'hui, nous savons que dans la plupart des tissus, la majorité des macrophages résidents ont une origine embryonnaire, tandis que les cDCs proviennent de précurseurs distincts de la moelle osseuse [43, 44]. Par conséquent, les monocytes sont libérés de leur image exclusive de cellules immatures précurseurs de macrophages ou de cDCs. Néanmoins, les monocytes circulants jouent un rôle important pour l'homéostasie des macrophages tissulaires, et ils restent capables de donner naissance aux macrophages tissulaires en conditions physiologiques, pour assurer le renouvellement des macrophages résidents, et en conditions inflammatoires pour produire des macrophages capables de répondre rapidement aux agressions tissulaires en effectuant notamment la phagocytose des débris cellulaires, des cellules mortes et des agents pathogènes. Ces monocytes recrutés pendant l'inflammation donnent naissance à des cellules dérivées de monocytes qui sont souvent fonctionnellement distinctes des macrophages et des cDCs résidents.

Les monocytes circulants constituent donc une « brigade de secours », mobilisable rapidement et en grand nombre vers les sites d'inflammation. La grande plasticité des monocytes leur permet d'autre part d'assurer des activités pro-inflammatoires ou de résolution de l'inflammation, sous l'influence d'indices micro-environnementaux faisant des monocytes des cibles thérapeutiques intéressantes dans le cas de pathologies inflammatoires aiguës ou chroniques.

3 Trafic monocyttaire de la moelle osseuse aux tissus cibles

Les récepteurs aux chimiokines CCR2 et CX3CR1, présents à la surface des monocytes, sont impliqués dans le trafic monocyttaire. En effet, le recrutement vers le sang des monocytes dérivés de la moelle osseuse est régulé par chimiotactisme impliquant principalement les récepteurs CCR2 et CXCR4. Les monocytes circulants peuvent ensuite soit être mobilisés vers des sites de stockage, tel que la rate, ou infiltrer des tissus où ils se différencient en différents types de cellules dendritiques ou de macrophages. Ce recrutement tissulaire fait également intervenir le récepteur CX3CR1. Les monocytes circulants sont mobiles et capables de se déplacer le long des parois des vaisseaux sanguins et d'adhérer à leur surface, via des molécules d'adhésion comme le CD62L/L-selectin. Ainsi, au niveau des foyers inflammatoires, la réponse aux stimuli chimiotactiques entraîne la diapédèse active des monocytes à travers la paroi des vaisseaux [45]. Une fois dans les tissus, les monocytes peuvent se transformer en macrophages qui ont une plus grande capacité phagocytaire et une teneur accrue en enzymes hydrolytiques.

3.1 Recrutement des monocytes de la moelle osseuse vers le sang

Le récepteur CCR2 et ses ligands CCL2 (Monocyte Chemoattractant Protein 1 / MCP1) et CCL7 (MCP3) sont impliqués dans le recrutement des monocytes vers la circulation sanguine. CCR2 étant exprimé plus particulièrement par les monocytes Ly6C^{high} est nécessaire à l'égression de ces monocytes. En effet, des expériences chez des souris *Ccr2*^{-/-} mettent en évidence une forte diminution de cette population monocyttaire dans la circulation sanguine sans altération du taux de monocytes Ly6C^{low} [46]. De même, une diminution de recrutement mobilisation monocyttaire d'environ 50% est observée après infection à *Listeria Monocytogenes* dans un modèle murin de délétion de *Ccl2* et *Ccl7*, démontrant l'importance physiopathologique de cette voie de signalisation pour la régulation du trafic monocyttaire (Figure 5).

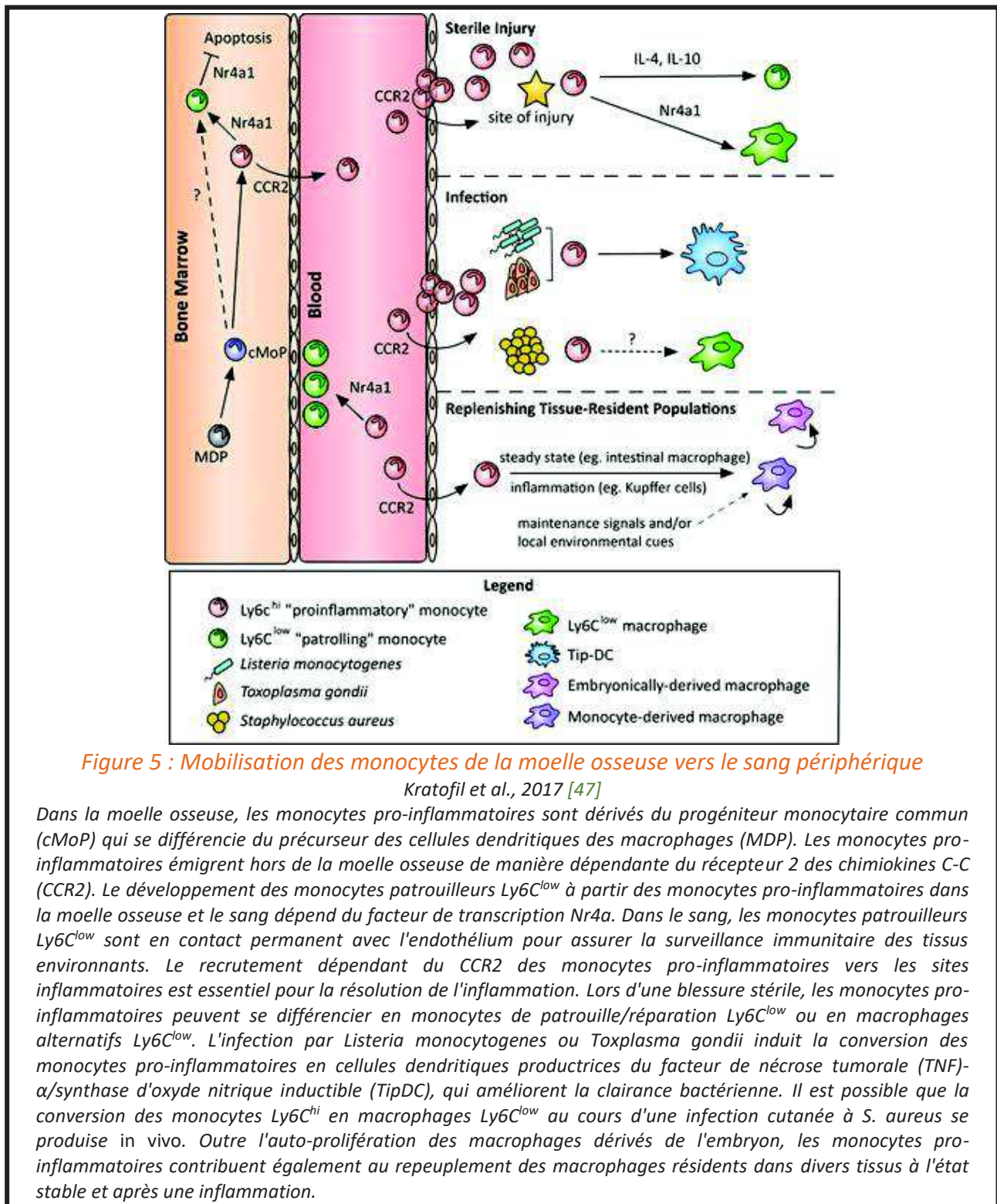


Figure 5 : Mobilisation des monocytes de la moelle osseuse vers le sang périphérique

Kratofil et al., 2017 [47]

Dans la moelle osseuse, les monocytes pro-inflammatoires sont dérivés du progéniteur monocyttaire commun (cMoP) qui se différencie du précurseur des cellules dendritiques des macrophages (MDP). Les monocytes pro-inflammatoires émigrent hors de la moelle osseuse de manière dépendante du récepteur 2 des chimiokines C-C (CCR2). Le développement des monocytes patrouilleurs $Ly6C^{low}$ à partir des monocytes pro-inflammatoires dans la moelle osseuse et le sang dépend du facteur de transcription Nr4a. Dans le sang, les monocytes patrouilleurs $Ly6C^{low}$ sont en contact permanent avec l'endothélium pour assurer la surveillance immunitaire des tissus environnants. Le recrutement dépendant du CCR2 des monocytes pro-inflammatoires vers les sites inflammatoires est essentiel pour la résolution de l'inflammation. Lors d'une blessure stérile, les monocytes pro-inflammatoires peuvent se différencier en monocytes de patrouille/réparation $Ly6C^{low}$ ou en macrophages alternatifs $Ly6C^{low}$. L'infection par *Listeria monocytogenes* ou *Toxoplasma gondii* induit la conversion des monocytes pro-inflammatoires en cellules dendritiques productrices du facteur de nécrose tumorale (TNF)- α /synthase d'oxyde nitrique inductible (TipDC), qui améliorent la clairance bactérienne. Il est possible que la conversion des monocytes $Ly6C^{hi}$ en macrophages $Ly6C^{low}$ au cours d'une infection cutanée à *S. aureus* se produise in vivo. Outre l'auto-prolifération des macrophages dérivés de l'embryon, les monocytes pro-inflammatoires contribuent également au repeuplement des macrophages résidents dans divers tissus à l'état stable et après une inflammation.

En tout temps, il est nécessaire de recruter des monocytes vers la circulation, que ce soit en conditions physiologiques ou en cas d'inflammation, de façon à assurer une veille immunitaire et la disponibilité des monocytes pour repeupler les tissus notamment en macrophages. Néanmoins, bien que les modalités de recrutement dans la circulation des

monocytes Ly-6C^{high} faisant intervenir le CCR2 semblent claires (une augmentation plasmatique de CCL2 est observée en conditions inflammatoires), il demeure un doute sur celles permettant le recrutement à partir de la moelle des monocytes Ly-6C^{low} (exprimant faiblement le CCR2). Ces monocytes non-classiques circulants semblent provenir des monocytes Ly-6C^{high} ayant perdu l'expression du Gr1 soit en retournant dans la moelle soit dans la circulation sanguine (*Figure 5*).

L'implication de CCR2 dans le recrutement des monocytes Ly6C^{high} sur les sites « d'agression/de lésion » a fait l'objet de nombreuses études et semble dépendre de la nature de l'agression et de tissu concerné. De fait, si le recrutement de cette sous population semble être dépendant de Ccr2 dans un modèle murin d'infarctus du myocarde (IDM) ou d'infection péritonéale à *Toxoplasma Gondii*, sa migration dans la rate après infection à *Listeria Monocytogenes* est dépendant de Cx3cr1 (*Figure 5*).

3.2 Recrutement tissulaire des monocytes circulants

Le recrutement des monocytes circulants dans des tissus spécifiques, que ce soit en conditions physiologiques ou en cas d'inflammation, fait intervenir principalement la chimiokine CX3CL1 (fractalkine) et son récepteur CX3CR1 présent à la surface des monocytes, notamment la sous population non classique. La libération du CX3CL1 au niveau de l'endothélium des tissus nécessitant un apport en monocytes va ainsi permettre d'attirer les monocytes circulants au niveau des sites/tissus concernés (*Figure 5 et 6*). CX3CR1 est un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé aux protéines G. Il est exprimé par les monocytes, mais n'est pas exclusif aux monocytes, à titre d'exemple il est aussi exprimé à la surface de certains lymphocytes T et de certains sous types de cellules dendritiques [48-54]. La fractalkine est à ce jour le seul ligand connu de CX3CR1. La fractalkine est retrouvée sous deux formes dans l'organisme : liée à la membrane ou soluble. La forme soluble possède une activité chimio-attractante. Cette forme soluble provient du clivage par des MétalloProtéinases Matricielles (MMP) de la forme ancrée à la membrane cellulaire [53, 55]. Ainsi, la forme soluble de fractalkine diffuse dans le sang et les tissus à partir du site « d'émission » endothéliale, pour former un gradient de concentration guidant les monocytes jusqu'à la zone nécessitant l'apport en monocytes. La forme ancrée à la

3. Trafic monocytaire de la moelle osseuse aux tissus cibles

membrane de fractalkine permet, quant à elle, la capture initiale et l'adhésion ferme des monocytes sur l'endothélium activé lors du processus d'extravasation [56] (Figure 6).

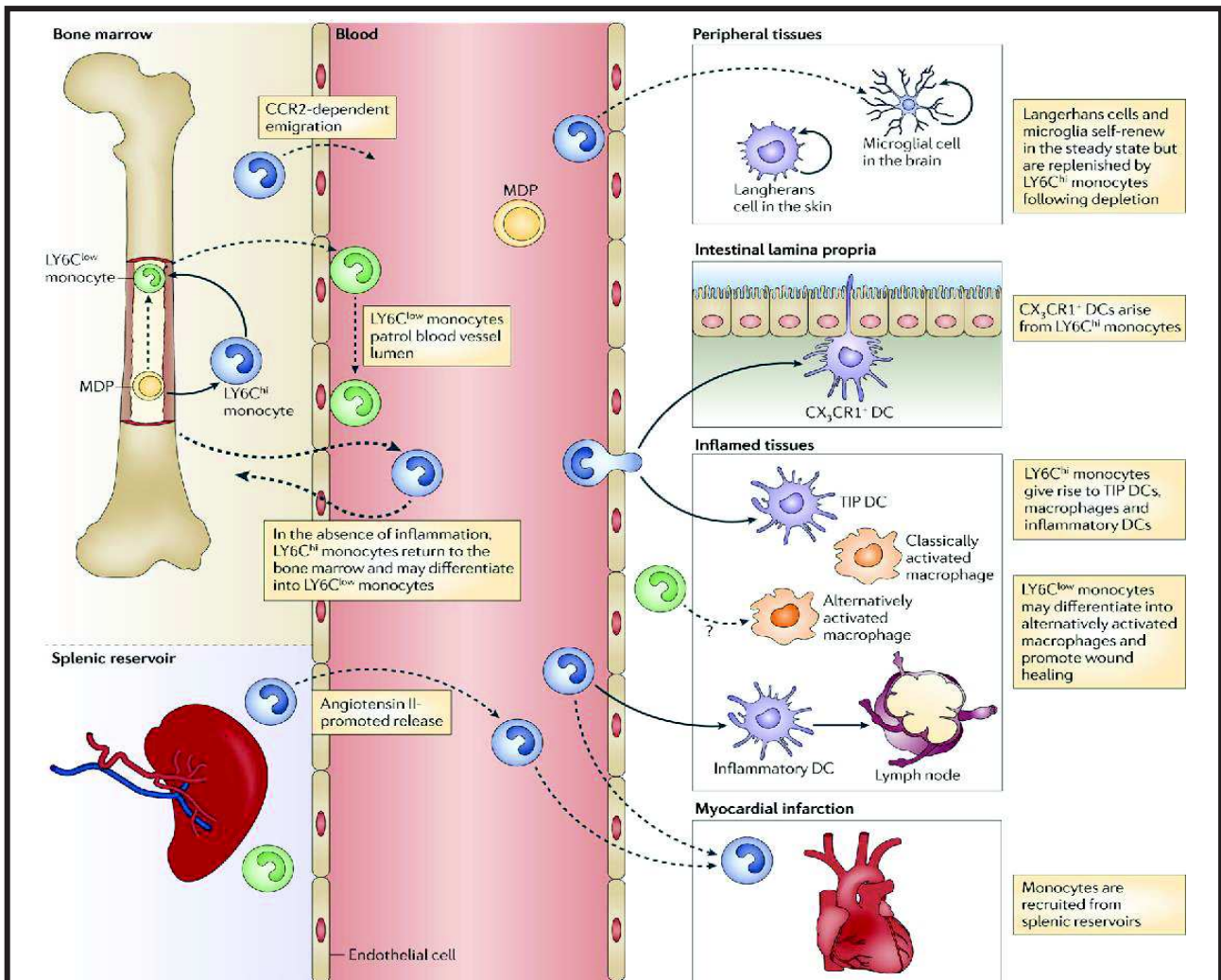


Figure 6 : Recrutement tissulaire des monocytes circulants

Shi et al., 2011 [57]

Les précurseurs de macrophages et de cellules dendritiques (MDP) dans la moelle osseuse donnent naissance aux monocytes LY6C^{hi}, qui peuvent servir d'intermédiaires pour la génération de monocytes LY6C^{low}. Les monocytes LY6C^{hi} sortent de la moelle osseuse d'une manière dépendante du récepteur CC-chemokine 2 (CCR2) et sont recrutés dans les tissus enflammés. Là, ils peuvent se différencier en cellules dendritiques productrices de TNF et exprimant la Nitric Oxide Synthase, inducible (iNOS) (TIP DCs), en macrophages inflammatoires ou en DCs inflammatoires, dont certains peuvent ensuite migrer vers les ganglions lymphatiques de drainage. Les monocytes LY6C^{low} patrouillent la lumière des vaisseaux sanguins en s'associant à l'endothélium vasculaire. Les monocytes LY6C^{low} sont également recrutés sur les sites d'inflammation et contribuent probablement à la cicatrisation des plaies en se différenciant en macrophages alternativement activés. Dans certaines conditions expérimentales, les monocytes LY6C^{hi} peuvent donner naissance à des cellules de Langerhans dans la peau, à la microglie dans le système nerveux central, et à des phagocytes mononucléés CX3C-chemokine receptor 1 (CX3CR1)⁺ dans la lamina propria intestinale.. En absence d'inflammation, certains monocytes LY6C^{hi} circulants retournent à la moelle osseuse. La rate fonctionne comme un réservoir de monocytes en dehors de la moelle osseuse. Après un infarctus du myocarde, les monocytes sont libérés des réservoirs spléniques, et les monocytes LY6C^{hi} sont sélectivement recrutés dans le cœur lésé.

La fractalkine joue également un rôle dans la survie cellulaire des monocytes infiltrant un tissu. Suite au recrutement tissulaire, les monocytes se différencient selon deux voies distinctes : vers les cellules dendritiques ou les macrophages. Cette dernière population fera l'objet de la suite de ce chapitre (*Figure 6*).

4 Diversité des macrophages

4.1 Différence monocytes/ macrophages

Les macrophages se distinguent des monocytes par leur plus grande taille et le développement de leur appareil vacuolaire (vésicules d'endocytose, endosome, lysosomes et phagosomes). Les principales propriétés des macrophages sont : *i)* leur grande mobilité, *ii)* leur pouvoir de phagocytose, *iii)* leur capacité sécrétoire importante (facteurs du complément, cytokines, facteurs hématopoïétiques, prostaglandines ou encore radicaux libres).

Les marqueurs de surface, utilisables notamment pour les techniques de cytométrie en flux, permettent également de distinguer les monocytes des macrophages. Les monocytes sont (F4/80/CMHII/CD11c)^{Low}, tandis que les macrophages sont (F4/80/CMHII/CD11c)^{high/intermediate} [58]. Le CD64 et le Myeloid-Epithelial-Reproductive Tyrosine Kinase (MERTK) peuvent également distinguer les monocytes cardiaques des macrophages cardiaques, les macrophages exprimant à la fois le CD64 et la MERTK et les monocytes exprimant le CD64 et non la MERTK [59, 60].

L'expression des molécules HLA (Complexe Majeur d'Histocompatibilité, CMH) de classe II à leur surface cellulaire permet aux macrophages de présenter des antigènes dégradés et d'initier la réponse immunitaire acquise des lymphocytes T, même si les macrophages sont considérés comme de moins compétentes cellules présentatrices d'antigènes par rapport aux cellules dendritiques qui elles sont capables également de présenter des antigènes via le CMH I.

4.2 Hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle des macrophages

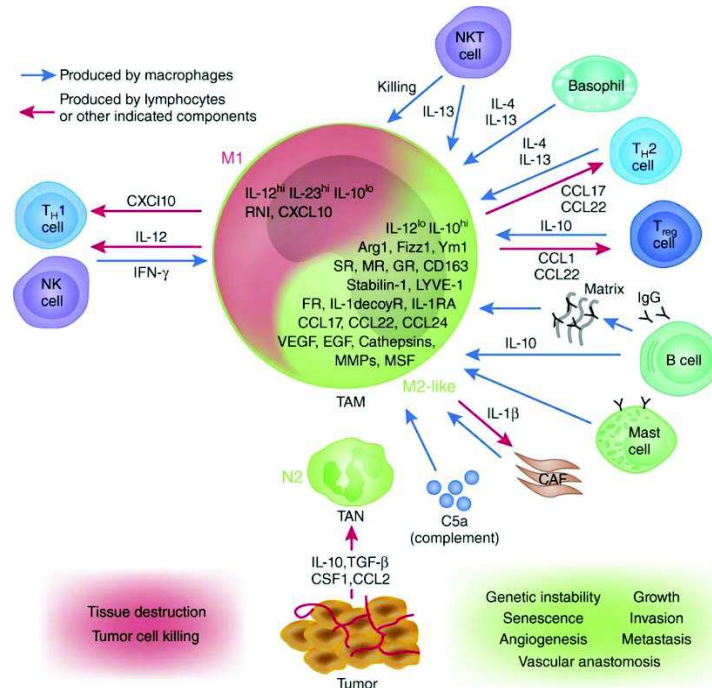


Figure 7 : Diversité des macrophages et de leur signalisation

Biswas and Mantovani, 2010 [61]

La polarisation en macrophages M1 et l'interaction avec les Th1 et les NK est indiquée en rouge. La polarisation en M2 et l'interaction lymphocytaire est indiquée en vert. Les gènes spécifiques de chaque sous type de macrophages sont indiqués en noir. Les flèches bleues, indiquent la production de cytokines par les macrophages et les flèches rouges indiquent les productions des cellules lymphoïdes. TAN : Tumor Associated Neutrophiles

Les macrophages assurent le soutien de l'homéostasie tissulaire en conditions physiologiques et en situations inflammatoires [62]. D'autre part, ils sont impliqués dans la défense de l'hôte contre les microorganismes, mais également dans la régulation métabolique glycolytique, lipidique, ainsi que des acides aminés et le fer. De plus, les macrophages interviennent dans le remodelage et la réparation des tissus lésés via leur sécrétion des facteurs de croissance et des cytokines.

Ces cellules sont capables d'assurer cette multitude de fonctions grâce à leur degré élevé d'hétérogénéité phénotypique. Cette dernière a été mise en évidence par les études sur les anticorps monoclonaux (Figure 7). L'hétérogénéité morphologique des macrophages selon les organes est le reflet d'une spécialisation fonctionnelle dépendante de leur environnement en lien avec leurs interactions avec les autres types cellulaires et avec la matrice extra-cellulaire. Ils posséderont par conséquent des capacités différentes de reconnaissance de pathogènes, de productions de cytokines, de chimiokines, de

phagocytose etc... (*Figure 7*). Les macrophages sont doués d'une grande plasticité et d'une grande adaptabilité tant *in vitro* qu'*in vivo* qui leur permet de répondre de façon efficace aux stimuli présents dans leur microenvironnement tissulaire se traduisant par cette grande diversité phénotypique (*Figure 7*). De nombreuses études rendent actuellement compte de la diversité phénotypique et fonctionnelle des macrophages donnant lieu à plusieurs classifications (*Figure 8*).

De plus, les macrophages présentent des caractéristiques spécifiques des organes ou tissus. Par exemple, les macrophages de la peau participent à la régulation du volume extra cellulaire et à la régulation de la pression artérielle [63]. Dans les tissus adipeux, les macrophages génèrent des catécholamines pour soutenir la thermogénèse adaptative et promouvoir la résistance à l'insuline (mécanismes de répression dépendants de récepteurs nucléaires) [64, 65]. Les macrophages péritonéaux orchestrent la migration des cellules B productrices d'immunoglobuline, où ils jouent un rôle clé dans la réponse rapide aux agents pathogènes [66]. Les macrophages sont également impliqués dans l'élimination des érythrocytes et le recyclage du fer dans le foie, le développement normal du cerveau, et le contrôle hématopoïétique dans la moelle osseuse et la rate [67-69].

Outre ce rôle dans le maintien de l'homéostasie tissulaire, les macrophages sont indispensables à la réponse immunitaire mise en place après toute lésion tissulaire telles que celles observées après l'IDM avec ou sans reperfusion.

Comme évoqué précédemment pour les monocytes, les macrophages ont également fait l'objet de nombreuses approches pour identifier des cellules et des sous types cellulaires.

Les techniques d'immunohistochimie, d'immunoblotting, ou d'immunofluorescence couramment utilisées dans les expériences utilisent des marqueurs uniques.

Un élément intéressant est le fait que le marqueur utilisé pour identifier le type cellulaire a lui-même des fonctions biologiques qui lui sont propres. Par exemple, le marqueur des macrophages le plus couramment utilisé, F4/80, possède des propriétés pro-

inflammatoires et peut induire des cellules T régulatrices spécifiques à l'antigène (Tregs) [70].

Les stratégies de cytométrie de flux permettent maintenant de déterminer les sous-populations de monocytes et de macrophages sur la base de l'expression de marqueurs caractéristiques.

Le Site web de la communauté des macrophages (www.macrophages.com) [71] et le projet de génome immunologique (www.immgen.org) fournissent une excellente base de données sur les ressources de recherche sur les macrophages.

4.2.1 Classification en fonction de l'état d'activation des macrophages

Habituellement, les macrophages sont séparés en fonction de leur état d'activation classique ou alternative distinguant ainsi les macrophages M1 « classiques » et les macrophages M2 « alternatifs » [72]. Les sous-types de macrophages sont ensuite divisés sur la base des stimuli *in vitro* auxquels ils sont exposés.

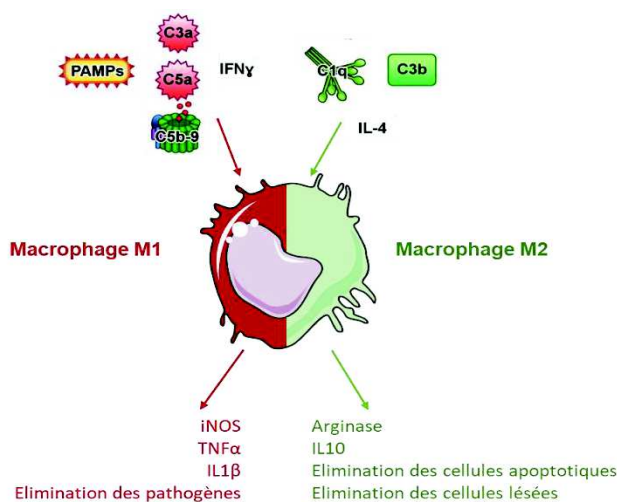


Figure 8 : Activation des macrophages classiques M1 et alternatifs M2
Bohlsou et al., 2014 [73]

En culture, les macrophages M1 sont induits par l'IFN γ ou les PAMPs et sont caractérisés par l'expression de iNOS et de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α et l'IL-1 β . Les macrophages M2 sont induits par l'IL-4 et caractérisés par la production d'arginase et de cytokines anti-inflammatoires comme IL-10. Les composants du complément C3a, C5a et C5b-9 modulent la production de cytokines dans les macrophages vers un phénotype inflammatoire (M1-like). Les cellules apoptotiques et les cibles opsonisées avec les composants du complément C1q ou C3b augmentent la clairance et modulent la production de cytokines dans les macrophages les orientant vers un phénotype anti-inflammatoire et résolutif (M2-like) pouvant bloquer la signalisation pro-inflammatoire médiée par les PAMPs. Ainsi, le complément joue un double rôle dans l'activation et la polarisation des macrophages en fonction de la cible.

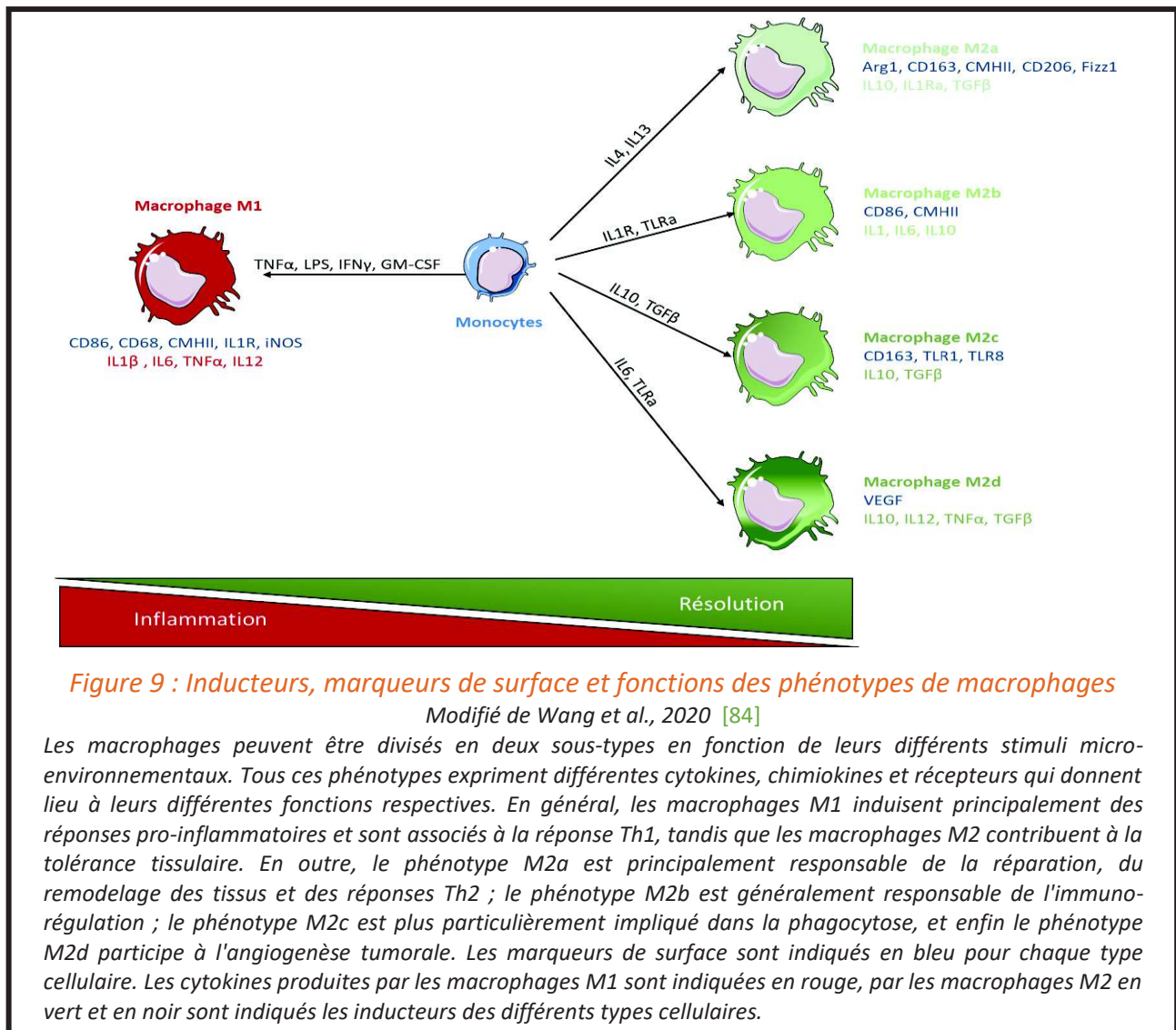
4.2.1.1 Activation classique : macrophages M1

Les macrophages dit « classiques » ou M1 sont induits par des cytokines de type Th1, telles que l'Interféron-gamma (IFN- γ), le TNF α et l'IL-1 β . Les macrophages M1 sont subdivisés en M1a lorsqu'ils sont stimulés *in vitro* par des ligands des TLRs, tel que le LPS, et en M1b s'ils sont stimulés par la High Mobility Group Box (HMGB)1 [74].

Les macrophages M1 participent à l'immunité innée, notamment par leur production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α , l'IL-6, l'IL-1 β et l'IL-12 (Figure 8) [75], qui augmentent la réponse immunitaire contre les microorganismes (Figure 8). Le métabolisme de macrophages M1 est caractérisé par une activité glycolytique élevée, associée à leur capacité anti-microbienne de « burst » oxidative, mais également un glutaminolyse augmenté [76].

4.2.1.2 Activation alternative : macrophages M2

Une seconde population de macrophages a été mise évidence pour la première fois *in vitro*, en 1992 par Stein et collaborateurs [77]. Ces macrophages induits par des cytokines Th2, tel que l'IL-4, entraînent l'expression du récepteur au mannose (MR, CD206 ou Mannose Receptor C-Type 1 / MRC1) à la surface des macrophages. Le CD206/MRC1 permet notamment la détection à la surface de microorganismes des protéoglycans contenant du mannose. Ce récepteur pourrait également être impliqué dans la cross-communication entre les macrophages et d'autres cellules immunitaires exprimant le CD44 [78]. Aujourd'hui ces macrophages sont qualifiés de macrophages « alternatifs » ou M2 et peuvent également être induits par l'IL-13, l'IL-10 et le Transforming Growth Factor bêta (TGF- β) seul ou en combinaison (Figure 8). Les macrophages M2 ont un métabolisme cellulaire orienté plutôt vers la β -oxydation des lipides, importés via le CD36, ce qui rend les cellules moins pro-oxydantes et donc potentiellement plus viables au long terme [76]. La glutaminolyse est également augmentée, par rapport à des macrophages non-polarisés, ce qui contribue à une stimulation de la voie métabolique de l'hexosamine. En fonction des signaux inducteurs, il est possible d'identifier au moins 3 sous types de macrophages M2 : M2a, M2b et M2c. Le phénotype M2a est activé par l'IL-4 et l'IL-13, tandis que la combinaison de l'IL-1 β et du LPS entraîne l'activation des M2b. Les M2c peuvent être induits par la stimulation avec l'IL-10, le TGF- β ou encore des glucocorticoïdes [75, 79-83] (Figure 9).



Les macrophages M2a et M2c sont responsables de la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative coordonnée, alors que les M2b sont anti-inflammatoires [74, 85].

Les macrophages M2 modulent la réponse inflammatoire via la sécrétion de facteurs anti-inflammatoires tels que l'IL-10 et l'antagoniste du récepteur à l'IL-1β (IL-1RA) (Figure 9) [83]. Ils contribuent ainsi à la résolution de l'inflammation. Ils sont également capables d'épurer, par phagocytose, les débris et les cellules apoptotiques, dont les M1 [86].

Ces macrophages M2 « alternatifs » produisent des protéines impliquées dans la synthèse de la Matrice Extra Cellulaire (MEC), dont la fibronectine, suggérant leur rôle dans le remodelage et la réparation tissulaire [87]. De même, certaines études dont celles de Jetten et collaborateurs ont permis de prétendre l'implication de ces macrophages dans les

processus angiogéniques notamment via la production du Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-A [88].

Enfin, dans le contexte pathologique de l'athérosclérose les macrophages M2 pourraient avoir un effet protecteur, en libérant du TGF- β et IL-18, inhibant ainsi le recrutement des cellules inflammatoires au sein de la lésion. Ils jouent également un rôle important dans la régulation du contenu en collagène de la plaque et donc sa stabilité.

4.2.2 Classification en fonction de l'activité homéostatique

Une autre classification a été proposée par Mosser et collaborateurs, sur la base des principales activités homéostatiques des macrophages. Selon cette classification, les macrophages M1 sont les cellules impliquées dans la défense de l'hôte, tandis que les macrophages M2a sont impliqués dans la réparation tissulaire, et finalement les macrophages M2b/c sont des régulateurs de l'immunité [83].

Notons également que les monocytes/macrophages différenciés, respectivement, en présence de GM-CSF ou de Macrophage-Colony Stimulating Factor (M-CSF), démontrent des propriétés fonctionnelles similaires au phénotype M1 et M2 [89].

4.2.3 Expression différentielle de marqueurs spécifiques

L'expression différentielle de marqueurs spécifiques permet également de distinguer ces différents sous-types de macrophages. Les macrophages M1 sont classiquement caractérisés par l'expression de Ccl2/MCP-1. Les macrophages M2 sont caractérisés par une forte expression à leur surface du CD206 (MRC1) et d'autres récepteurs « scavenger », ainsi que par la production d'IL-1RA et d'IL-10 et plusieurs chimiokines [79].

4.2.4 Macrophages M4 et plasticité phénotypique

4.2.4.1 *Macrophages M4*

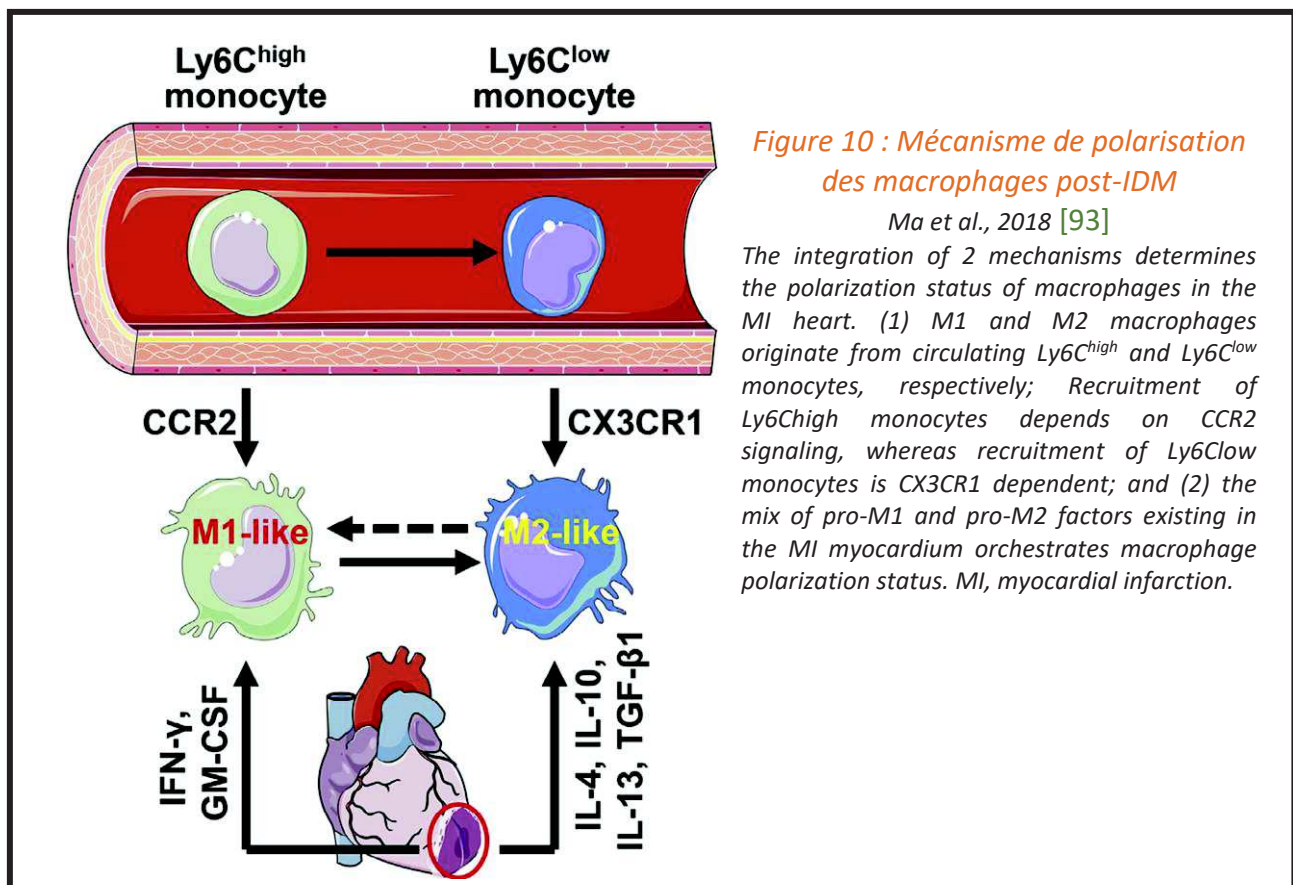
Plus récemment, un phénotype de macrophage M4 a été proposé pour les monocytes différenciés en présence de la cytokine CXCL4/ Platelet factor 4 [90]. Cette chimiokine, produite principalement par les plaquettes activées, signale *via* une variante du récepteur

CXCR3 exprimé par certains monocytes, les neutrophiles et les fibroblastes. Les macrophages M4 seront caractérisés par l'expression de TNF α , IL-6, et des MMP-7 et -12, ainsi que par la perte d'expression de CD136 et CD206.

4.2.4.2 Plasticité phénotypique des macrophages

Il semblerait que les différents phénotypes de macrophages peuvent se convertir mutuellement *in vitro*, par exemple, les macrophages M1 pourraient passer à l'état M2 par stimulation avec des facteurs pro-M2 (Figure 10) [91].

Ce concept de plasticité a été investigué dans un modèle d'athérosclérose expérimentale chez la souris [92]. Dans cette étude, les auteurs observent que les macrophages M2 prédominent dans les lésions précoces alors que les lésions avancées sont riches en macrophages M1, ils démontrent *in vitro* le renversement complet de phénotype en réponse à l'addition séquentielle d'IFN γ et d'IL-4.



4.3 Macrophages résidents et macrophages dérivés des monocytes dans le cœur

En conditions physiologiques, les macrophages sont retrouvés dans tous les tissus du corps. Il est possible de distinguer deux catégories de macrophages : les macrophages résidents et les macrophages provenant des monocytes circulants (cellules dérivées des monocytes).

Ces macrophages résidents peuvent être renouvelés par différenciation des monocytes circulants mais sont principalement mobilisés dans les tissus lésés en condition pathologique et/ou en cas d'inflammation.

En conditions physiologiques, les macrophages présents dans les tissus sont principalement des macrophages résidents d'origine embryonnaire. Les macrophages résidents persistent de l'embryogenèse à l'âge adulte et s'appuient peu sur l'infiltration de monocytes pour leur renouvellement [43, 44] à l'exception des macrophages de la peau qui dépendent de l'entrée des monocytes pour maintenir leur nombre [94, 95].

En conditions homéostatiques, les macrophages résidents exercent un rôle dans la maintenance de l'homéostasie cellulaire. Ils interviennent notamment dans la défense contre les infections et l'élimination des cellules sénescents ou endommagées.

4.3.1 Macrophages dans le cœur sain

4.3.1.1 *Origine des macrophages résidents*

Le dogme antérieur selon lequel les macrophages sont exclusivement dérivés de monocytes circulants générés par la moelle osseuse et la rate a été contesté [7].

Au cours de la dernière décennie, un nombre croissant d'études a démontré que les macrophages résidents dans les tissus du cerveau, de la rate, du foie, des poumons, de la moelle osseuse, des reins, du pancréas, du péritoine et du cœur sont établis avant la naissance, persistent tout au long de la vie et se renouvellent localement [96, 97].

À titre d'exemple, dans le cœur à l'état d'équilibre, les macrophages résidents chez la souris représenteraient environ 5 à 10 % des cellules non myocytaires [98, 99]. Dans le cœur, les macrophages résidents adoptent une forme fusiforme et se mêlent étroitement aux cardiomyocytes, aux cellules endothéliales et aux fibroblastes [98]. Les études de

cartographie du devenir génétique et de traçage des lignées révèlent que la grande majorité des macrophages cardiaques résidents provient du sac vitellin embryonnaire et des progéniteurs fœtaux du foie. Le renouvellement par prolifération locale a lieu à raison d'une fois par mois. En termes de sous-populations, les macrophages résidents CCR2⁺ sont reconstitués par le recrutement de monocytes sanguins ainsi que par prolifération locale, alors que les macrophages résidents CCR2⁻ sont exclusivement repeuplés par prolifération locale (*Figure 11*) [59, 100].

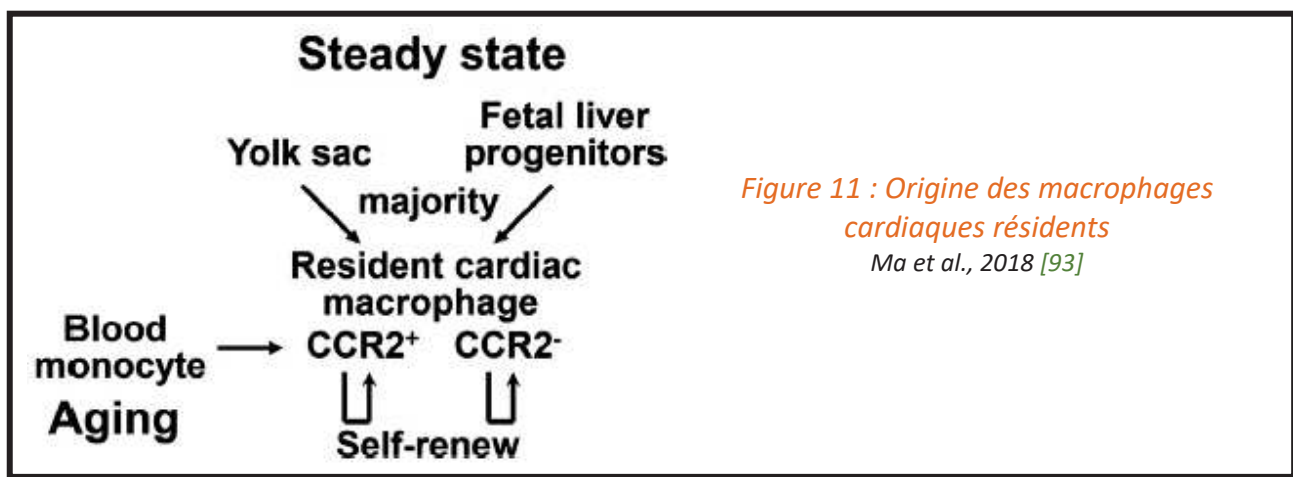


Figure 11 : Origine des macrophages cardiaques résidents
Ma et al., 2018 [93]

4.3.1.2 Rôles des macrophages résidents

Les macrophages résidents cardiaques ressemblent beaucoup aux macrophages M2 « alternatifs » et par conséquent expriment une multitude de marqueurs caractéristiques de ces derniers [101, 102].

Ceci n'est pas surprenant si l'on considère l'implication des macrophages M2 dans la reconstruction des tissus après une blessure dans le but de rétablir l'homéostasie tissulaire. Des études utilisant des bactéries fluorescentes ont permis de mettre en évidence la phagocytose de cellules mourantes par les macrophages résidents [98].

Outre ces activités immunomodulatrices et de réparation tissulaires, des études récentes ont révélé un rôle des macrophages résidents dans la conduction électrique du cœur. En effet, Nahrendorf et collaborateurs ont démontré l'abondance des macrophages résidents au niveau du nœud auriculo-ventriculaire (AV) dans le cœur sain de souris. Ces macrophages sont capables d'accélérer la repolarisation des cardiomyocytes en intervenant via les jonctions lacunaires (*gap junctions*) contenant de la connexine (Cx) 43. En effet, dans cette

étude, la suppression de la Cx43 dans les macrophages retarde la conduction AV, et la délétion des macrophages induit un blocage de l'AV [103].

L'implication des macrophages résidents dans la conduction myocardique, fait d'eux une nouvelle cible thérapeutique pour le traitement des arythmies cardiaques.

Néanmoins, cette étude, menée en conditions physiologiques, ne révèle pas si les macrophages sont impliqués dans la génération d'arythmies après une lésion et si les macrophages aident à réguler la contraction des cardiomyocytes dans des conditions physiologiques.

4.3.1.3 *Phénotype des macrophages résidents cardiaques*

À l'état d'équilibre, les macrophages cardiaques résidents sont d'origine hétérogène. Différents laboratoires ont identifié des sous-populations de macrophages résidents cardiaques en utilisant différents marqueurs.

Quatre populations peuvent être décrites sur la base des niveaux d'expression du Ly6C, du CMHII et de CCR2 [74]. La majorité de ces macrophages résidents appartient à la population Ly6C⁻/CCR2⁻, qui provient du sac vitellin. Cette population contient les deux sous-types CMHII^{high} et CMHII^{low}. La troisième population correspond aux macrophages Ly6C⁺/CCR2⁻, et la quatrième aux macrophages Ly6C⁺/CCR2⁺. Ces deux dernières populations, correspondant à la minorité des macrophages résidents, représentent les macrophages issus de l'hématopoïèse [59, 74, 100].

La compréhension des rôles exacts de ces sous types de macrophages résidents est encore incomplète. Quelques grandes lignes fonctionnelles les distinguent. Parmi celles-ci : une meilleure présentation d'antigènes par les macrophages cardiaques pour les Ly6C⁻/CCR2⁻/CMHII^{high}, et une capacité de phagocytose plus importante pour les Ly6C⁻/CCR2⁻/CMHII^{low}. Finalement, les macrophages CCR2⁺ expriment fortement les gènes associés à l'inflammasome comme le Nucleotide-Binding Oligomerization Domain, Leucine Rich Repeat And Pyrin Domain Containing 3 (NLRP3), ce qui implique un rôle pro-inflammatoire pour ce sous-type [59].

De même, les macrophages cardiaques résidents peuvent également être divisés en 4 populations sur la base de l'expression de CX3CR1 et du CMHII : CX3CR1⁻/CMHII⁻, CX3CR1⁻/CMHII⁺, CX3CR1⁺/CMHII⁻, et CX3CR1⁺/CMHII⁺ [104].

Molawi *et al.*, ont démontré que presque tous les macrophages à la naissance étaient CX3CR1⁺/CMHII⁻, et qu'avec l'âge, il y avait une augmentation progressive des cellules CMHII⁺ associée à une diminution de la population CX3CR1⁺, ce qui conduisait à une distribution plus égale de ces différentes populations cellulaires à l'âge adulte [104].

4.3.2 Dans le cœur vieillissant

Avec l'âge une diminution de l'auto-renouvellement des macrophages résidents et une augmentation du recrutement tissulaire des monocytes sanguins est observée. Le vieillissement induit l'augmentation de la réponse inflammatoire basale, ce processus a été nommé « inflammaging ». Au cours de ce processus, les taux de molécules pro-inflammatoires au sein du tissu cardiaque, telles que TNF α , IL-6, et CCL2, ainsi que les MMPs, augmentent. Les macrophages résidents produisant la MMP9 et le CCL2 semblent ainsi impliqués dans le « vieillissement » du tissu cardiaque (lien avec l'augmentation des dimensions du VG). Dans ce contexte de cœur vieillissant, les proportions de macrophages M1 et M2 sont modifiées, avec une augmentation des macrophages pro-inflammatoires (F4/80⁺ / CD206⁻) et une diminution des macrophages M2 immunomodulateurs (F4/80⁺/CD206⁺) [105]. Ces modifications de proportions sont empêchées par la délétion de MMP9 suggérant l'implication des macrophages dans le vieillissement du tissu cardiaque.

L'augmentation des taux des macrophages M1, au cours du vieillissement, dans le tissu cardiaque pourrait être liée à un recrutement plus important de monocytes circulants et également à une altération dans le « destin » de ces monocytes recrutés [105].

De même, dans une autre situation pathologique, suite à l'IDM, on observe également des altérations de la composition des sous-types de macrophages au niveau cardiaque. En effet, dans le contexte particulier de l'IDM, la réponse immunitaire est caractérisée par des vagues séquentielles d'infiltration de cellules immunitaires. Les monocytes circulants sont recrutés et donnent naissance dans le myocarde aux différents sous types de macrophages permettant de réguler l'inflammation / la réponse immunitaire afin de réparer la lésion. Dans le chapitre II sera développé le rôle dans ces processus de réparation cardiaque post-IDM de ces macrophages, et plus particulièrement la sous population de macrophages M2 dérivés de monocytes circulants.

4.4 Epigénétique dans la polarisation et la différenciation cellulaire

La différenciation des monocytes en macrophages s'effectue au cours d'un processus complexe nommé l'hématopoïèse. Ce processus débute avec une cellule souche hématopoïétique pluripotente capable de se différencier en différents types cellulaires. A l'échelle moléculaire, l'hématopoïèse correspond à une cascade de facteurs de transcription permettant d'emmener cette cellule souche hématopoïétique vers le phénotype souhaité (*Figure 12*).

Nous verrons par la suite que ces facteurs de transcription peuvent voir leur expression modulée par l'action d'enzymes épigénétiques. Ainsi, certaines modifications épigénétiques vont pouvoir moduler ce processus d'hématopoïèse et orienter le devenir et la différenciation cellulaire. Dans le cadre de ce projet de thèse nous avons démontré que ces modifications épigénétiques permettent de favoriser la différenciation des monocytes en macrophages de type M2. Il convient de souligner que ces modifications épigénétiques, étant réversibles, pourraient constituer une cible thérapeutique de premier ordre, pour la mise en place de stratégies thérapeutiques transitoires.

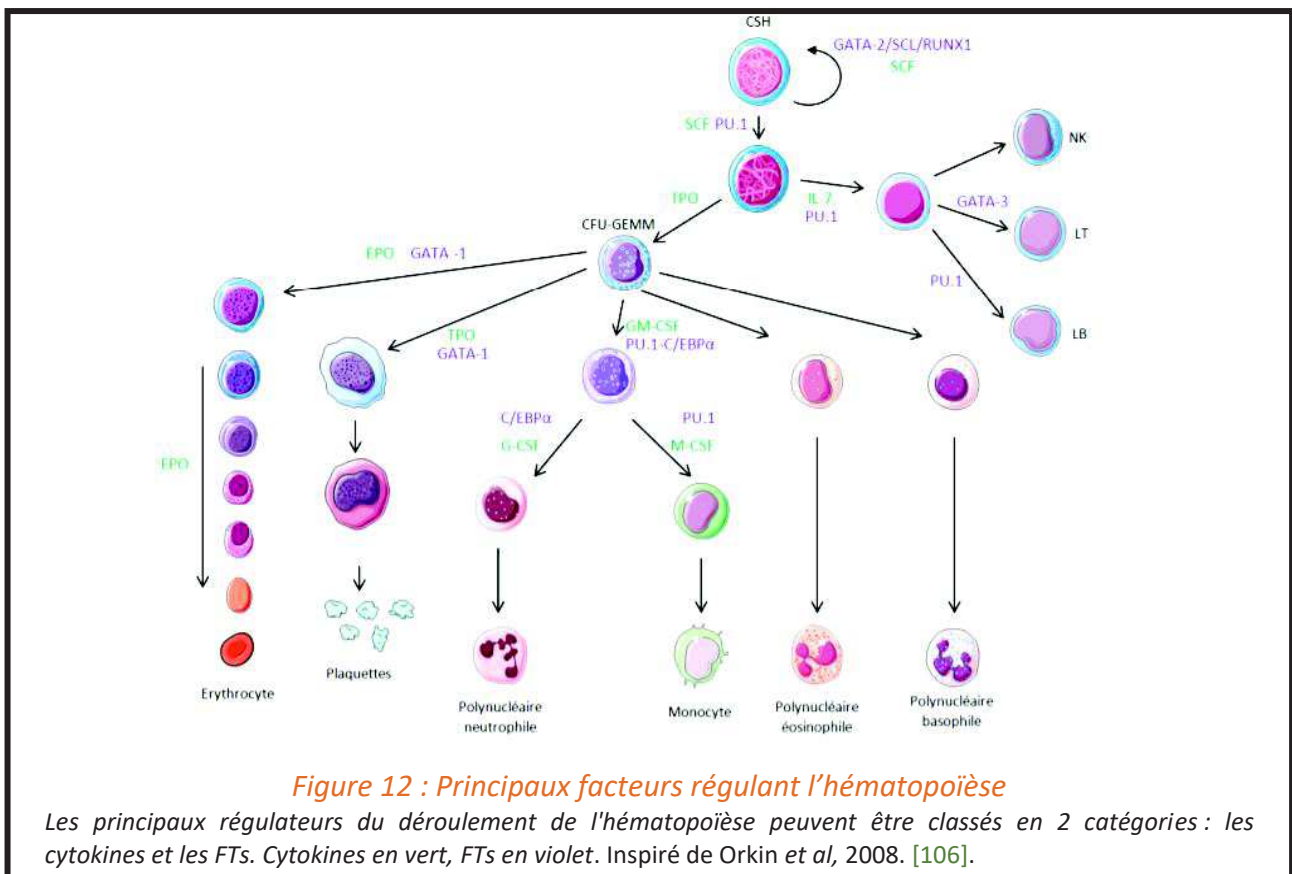


Figure 12 : Principaux facteurs régulant l'hématopoïèse

Les principaux régulateurs du déroulement de l'hématopoïèse peuvent être classés en 2 catégories : les cytokines et les FTs. Cytokines en vert, FTs en violet. Inspiré de Orkin et al, 2008. [106].

Chapitre 2 : Implication des monocytes/macrophages dans la réparation cardiaque après l'IDM

Ce deuxième chapitre sera dédié dans un premier temps, à une présentation générale et brève des maladies cardiovasculaires, notamment coronariennes. Puis, dans un second temps, à une vue plus approfondie de l'ensemble des différents types de cellules immunitaires impliquées dans la réponse aiguë à une lésion ischémique cardiaque. Enfin, une attention particulière sera portée sur les acteurs moléculaires clés, les cytokines, dans la médiation des effets de l'inflammation cardiaque.

1 L'IDM : définition et données épidémiologiques

1.1 Maladies cardio-vasculaires

Les pathologies cardio-vasculaires représentent 30% de la mortalité mondiale, et constituent un problème de santé publique majeur. Parmi celles-ci, les maladies coronariennes occupent une place importante. Selon le registre de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), sur les 50 millions de décès annuels enregistrés dans le monde, les cardiopathies ischémiques représentent la première cause de décès avec 7,2 millions de décès d'origine coronaire.

Bien qu'il ne constitue qu'environ 1/200^{ème} de la masse corporelle, le cœur utilise à lui seul 1/20^{ème} du volume sanguin pour son fonctionnement ; la majeure partie de cet apport bénéficiant au ventricule gauche. L'irrigation fonctionnelle du cœur est assurée par la circulation coronaire. Cette circulation est la moins étendue de l'organisme et met en jeu les artères coronaires droite et gauche. Les artères coronaires transportent le sang lorsque le muscle cardiaque s'est relâché en diastole mais se retrouvent comprimées par le myocarde au cours de la contraction systolique ventriculaire. Ainsi, les artères coronaires fournissent, de façon intermittente et rythmique, au myocarde l'oxygène et les nutriments nécessaires pour son activité continue.

1. L'IDM : définition et données épidémiologiques

Les 5 principales manifestations des maladies coronariennes sont : l'angine de poitrine stable, l'angor de poitrine instable, l'IDM, l'insuffisance cardiaque (IC) et la mort subite. En France, l'IDM représente une urgence cardiologique absolue dont l'incidence reste élevée avec 80 000 cas d'IDM enregistrés conduisant à 12 000 décès annuels.

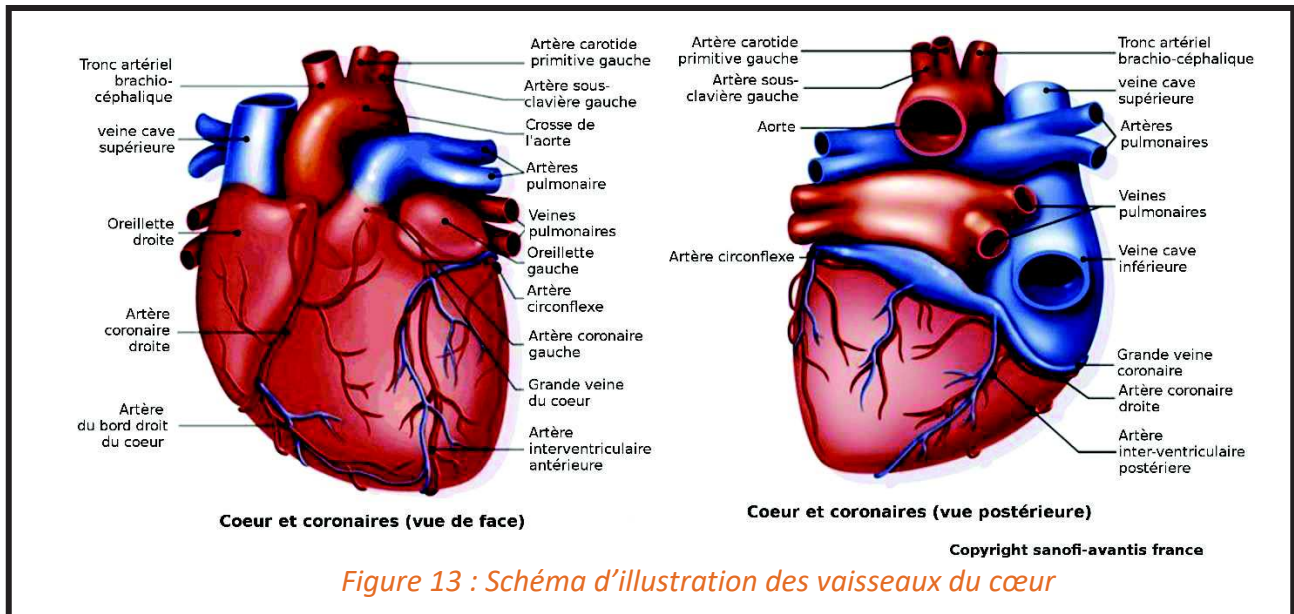


Figure 13 : Schéma d'illustration des vaisseaux du cœur

Ces artères débutent à la base de l'aorte et entourent le cœur dans le sillon coronaire. L'artère coronaire gauche se dirige du côté gauche du cœur puis elle se subdivise en artère plus petites appelées rameau interventriculaire antérieur et rameau circonflexe de l'artère coronaire gauche. L'artère coronaire droite s'étend vers le côté droit du cœur ou elle donne naissance à 2 rameaux : le rameau marginal droit et le rameau interventriculaire postérieur. Les ramifications des rameaux interventriculaires antérieur et postérieur se rejoignent près de l'apex du cœur (Figure 13).

1.2 L'IDM

L'IDM, plus couramment appelé crise cardiaque, est une pathologie cardiaque ischémique qui résulte de l'occlusion/obstruction prolongée de l'une des artères coronaires.

Le plus souvent, l'IDM est une complication aiguë d'une maladie coronarienne chronique, telle que l'athérosclérose. Dans ce cas, un épaissement localisé au niveau de l'intima artérielle, appelé plaque d'athérome, constitué d'un corps lipidique (monocytes et

macrophages spumeux chargés en lipides) entouré d'une chape fibreuse (cellules musculaires lisses et collagène), s'ulcère et se rompt. La rupture de la plaque d'athérome, rompt la barrière endothéliale et expose les constituants sous-endothéliaux aux plaquettes circulantes. Ceci déclenche des mécanismes d'adhésion et d'agrégation plaquettaire aboutissant à la formation d'un thrombus plaquettaire intra-coronaire occlusif.

Plus rarement, l'IDM peut survenir dans le cadre de vasospasmes, d'embolie coronaire sur artère saine, de dissection ou arthrite inflammatoire non athéromateuse (maladie de Kawasaki, syphilis).

De façon générale, l'IDM provoqué par l'obstruction ou le spasme prolongé d'une artère coronaire entraîne l'impossibilité d'irriguer une partie du myocarde ayant pour conséquence la mort par nécrose des cellules musculaires cardiaques ischémiées. Les cardiomyocytes adultes étant essentiellement amitotiques, la zone nécrotique laisse place à une cicatrice constituée d'une zone myocardique fibreuse non contractile aboutissant au remodelage cardiaque post-ischémique (dilatation ventriculaire et hypertrophie cardiaque) avec un risque ultime de développement d'IC.

La présentation clinique de l'IDM est variable, allant d'un évènement asymptomatique au choc cardiogénique voire à la mort subite.

L'occurrence et la gravité des altérations cardiaques est directement dépendante de l'étendue de la zone ischémique, de l'importance et la durée de réduction du flux sanguin, déterminant ainsi la sévérité de l'infarctus. Bien évidemment, la zone affectée s'étend d'autant plus que le temps d'occlusion coronaire perdure et les lésions du ventricule gauche auront, considérant son rôle dans la circulation systémique, des conséquences plus graves. La nécrose myocardique du ventricule gauche entraîne une altération de la fonction de contractilité cardiaque dès qu'elle atteint 20% de la masse myocardique. Elle devient incompatible avec la vie lorsqu'elle atteint 40% de la masse myocardique qu'elle soit le résultat d'un infarctus unique ou de plusieurs IDM successifs.

De manière générale, il est estimé que la destruction des cardiomyocytes est rapide et débute en moins de 30 minutes après le début de la thrombose. En 2h, il est estimé que 50% des cardiomyocytes constituant la zone non irriguée, dite à risque, sont morts et 80% à partir de la douzième heure. Néanmoins, il faut prendre en considération une variation de la vitesse de destruction du myocarde, inter-individuelle, au regard de la circulation collatérale

elle-même variable d'un individu à l'autre. Ceci relève l'importance d'intervenir au plus tôt après l'IDM afin de restaurer, par voie chirurgicale/interventionnelle ou pharmacologique, la perfusion cardiaque. Il est maintenant reconnu que les deux premières heures sont déterminantes pour mettre en place des traitements pour limiter l'étendue de la zone infarctée.

1.3 La prise en charge à la phase aiguë de l'IDM

La stratégie actuelle consiste en une reperfusion précoce par angioplastie percutanée ou par revascularisation chirurgicale correspondant à un pontage aorto-coronaire (uniquement en situation de sauvetage). La prise en charge médicamenteuse, consiste en l'association de traitements anti-agrégants plaquettaires et de traitement anticoagulants pour limiter l'extension de la thrombose intra-coronaire ou, en cas d'occlusion complète à la perméabiliser le plus vite possible. Un traitement cardioprotecteur par inhibiteur de l'enzyme de conversion et par statine pour diminuer le cholestérol sont également recommandés. Cette stratégie a permis, de significativement diminuer la mortalité aiguë après l'IDM, au cours des deux dernières décennies, mais on estime toujours à 10% la mortalité dans l'heure qui suit l'évènement. De plus, 15 à 30% des patients qui ont subi un IDM vont soit développer une IC soit décéder dans les 5 ans qui suivent [107], soulignant l'urgence sociétale d'identifier de nouveaux traitements afin de limiter les conséquences néfastes.

2 Réparation cardiaque post-IDM

2.1 Nécrose ou apoptose post-ischémique

L'ischémie myocardique observée au cours de l'IDM, résultant de l'obstruction partielle ou totale d'un coronaire, est définie comme le déséquilibre entre les besoins en O₂ et en nutriments du tissu myocardique et leurs apports par la circulation. Cette ischémie myocardique est un processus dynamique dont la sévérité va directement impacter la gravité des lésions observées après l'IDM. Elle est considérée comme irréversible à partir de 15-20 minutes d'ischémie car cela entraîne une mort cardiomyocytaire qui peut résulter de 2 processus : l'apoptose ou la nécrose.

L'apoptose est définie comme un mécanisme de mort cellulaire programmée ATP-dépendant. Elle survient lorsque la cellule endommagée conserve une machinerie métabolique suffisamment intacte pour produire l'énergie nécessaire à la mort cellulaire. Elle est caractérisée par un mécanisme de condensation nucléo-cytoplasmique. Le noyau se condense avant clivage de la chromatine en fragments réguliers d'environ 180pb (observables par la technique Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling, TUNEL). Ensuite, la membrane plasmique bourgeonne et donne naissance aux corps apoptotiques renfermant une partie du cytoplasme de la cellule, qui sont éliminés par efferocytose des macrophages ou autres phagocytes environnants. La cascade apoptotique est hautement régulée, avec une place particulière pour les caspases, tout ce processus étant excessivement coûteux en énergie.

Dans le contexte de l'IDM, l'ischémie myocardique provoque la déplétion profonde et rapide en ATP incompatible avec l'initiation du processus apoptotique au cœur de la zone ischémique. La cellule s'engage alors dans un processus de mort cellulaire par nécrose, nécroptose ou encore pyroptose. L'inactivation des canaux ioniques ATP dépendants entraîne une altération de l'homéostasie ionique cellulaire se traduisant par un gonflement cellulaire et une altération membranaire menant à la rupture létale de la cellule. De même, le gonflement des mitochondries et du cytoplasme entraîne la lyse de la membrane plasmique et le largage du cytoplasme dans le milieu environnant. L'ADN nucléaire sera dégradé de manière aléatoire par des endonucléases. Cette nécrose myocardique va être le siège d'un processus immuno-inflammatoire complexe à l'origine d'abord de la réaction

réparatrice de la zone lésée, pour la mise en place d'une cicatrice très résistante empêchant alors la rupture de la paroi, et par la suite impliqué dans l'étendue du remodelage cardiaque délétère.

2.2 Réponse immunitaire post-IDM

La réponse immuno-inflammatoire post-IDM est un mécanisme de réparation cardiaque endogène physiologique nécessaire à la cicatrisation, mais potentiellement délétère pouvant rapidement devenir pathologique si elle est exacerbée et/ou perdue dans le temps. Cette inflammation nécessite donc une régulation fine pour ne pas devenir excessive ou inadaptée. Cette réaction, locale ainsi que systémique, constitue un enchainement de mécanismes complexes impliquant de nombreux acteurs cellulaires et moléculaires (inducteurs, récepteurs, transmetteurs, effecteurs).

2.2.1 La réponse immunitaire post-IDM

La réponse immune s'organise chronologiquement autour de 3 phases : la phase pro-inflammatoire qui dure environ 3 jours chez la souris, la phase de résolution qui s'étend jusqu'au 7^{ème} jour post-IDM chez la souris et la phase de maturation qui est la phase la plus chronique survenant au décours de ces deux premières phases (Figure 14).

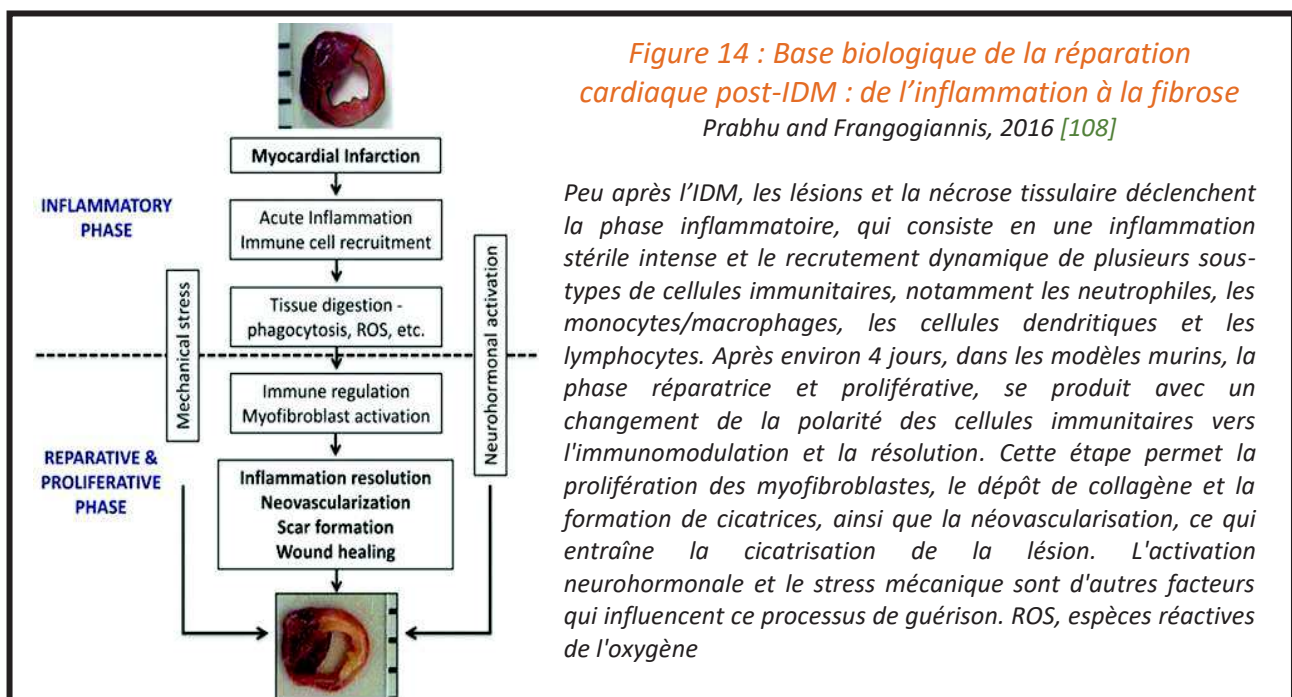


Figure 14 : Base biologique de la réparation cardiaque post-IDM : de l'inflammation à la fibrose

Prabhu and Frangogiannis, 2016 [108]

Peu après l'IDM, les lésions et la nécrose tissulaire déclenchent la phase inflammatoire, qui consiste en une inflammation stérile intense et le recrutement dynamique de plusieurs sous-types de cellules immunitaires, notamment les neutrophiles, les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes. Après environ 4 jours, dans les modèles murins, la phase réparatrice et proliférative, se produit avec un changement de la polarité des cellules immunitaires vers l'immunomodulation et la résolution. Cette étape permet la prolifération des myofibroblastes, le dépôt de collagène et la formation de cicatrices, ainsi que la néovascularisation, ce qui entraîne la cicatrisation de la lésion. L'activation neurohormonale et le stress mécanique sont d'autres facteurs qui influencent ce processus de guérison. ROS, espèces réactives de l'oxygène

2.2.1.1 La phase inflammatoire

La phase inflammatoire précoce a comme objectif l'élimination des cellules mortes et des débris de la MEC, présents dans la zone d'infarctus.

Au cours de cette première phase, l'ischémie myocardique entraîne la nécrose des cardiomyocytes, des cellules endothéliales, des fibroblastes résidents et la fragmentation de la MEC aboutissant à une réponse inflammatoire aiguë. Cette phase est initiée par l'action conjointe de plusieurs processus incluant l'activation de la cascade du complément, la production de ROS et la libération de DAMPS (motifs moléculaires associés au danger).

- **Cascade du complément**

Elle comprend une trentaine de protéines et fragments protéiques, dont beaucoup sont circulants et sont des pro-enzymes activées par des protéases selon 3 voies différentes : la voie classique, la voie des lectines et la voie alternative [109]. Ces trois voies sont convergentes et résultent en : *i*) l'opsonisation et phagocytose pour éliminer le matériel étranger et lésé (Complément C3b), *ii*) l'inflammation pour attirer des phagocytes supplémentaires (complément C3a, C4a, C5a), *iii*) l'activation du système du complément pour initier la coagulation.

Les DAMPS sont des inducteurs de l'inflammation, responsables d'une inflammation dite « stérile ». Ils sont reconnus par les récepteurs de type Pathogen Recognition Receptors (PRR) exprimés par les cellules de l'immunité innée. Ainsi, les DAMPs initient et amplifient la réponse inflammatoire myocardique post-IDM [109, 110] (*Tableau 3*).

La nature des DAMPS est variable, il s'agit de protéines, d'agents du métabolisme cellulaire, d'acides nucléiques ou encore des cytokines [108, 111].

DAMP	Receptor(s)	Reference(s)
HMGB1	TLR2, TLR4, TLR9, RAGE	[109, 110, 112-119]
S100A8/S100A9	TLR4, NLRP3, RAGE	[113, 115, 119, 120]
S100A1	Endolysosomal TLR4	[121]
Fibronectin-EDA	TLR2, TLR4	[109, 112, 113, 122-124]
IL-1 α	IL-1R	[115, 119, 125]
HSP-60, HSP-70	TLR2, TLR4/6	[109, 112, 113, 119]
LMW hyaluronic acid	TLR2, TLR4, NLRP3	[109, 112, 113, 119, 126]
ATP	P2X7/NLRP3	[113, 115, 119, 126-128]
Uric acid	TLR2, TLR4, NLRP3	[113, 115, 119, 126]
Mitochondrial DNA	TLR9, NLRP3	[109, 112, 113, 115, 119]
dsRNA	TLR3	[109, 115, 119]
ssRNA	TLR7, TLR8	[109, 112, 113, 115]

Tableau 3 : DAMPS et PRRs

Il existe 5 types de PRRs, les deux principaux sont TLR4 et NLRP3 (*Tableau 3 et 4, Figure 15*). Le récepteur TLR4 a été le premier des PRRs découvert et est le plus représenté dans le cœur. Le récepteur NLRP3 est associé à l'initiation de l'inflammasome. Ces deux types de récepteurs sont impliqués dans la sécrétion de nombreuses cytokines dont les cytokines pro-inflammatoires telles que l' $L1\beta$. La signalisation via ces récepteurs est impliquée dans l'aggravation de l'inflammation cardiaque post-IDM et l'augmentation de l'expansion de la taille de la zone lésée. Ils ont, par conséquent, été la cible de plusieurs stratégies thérapeutiques post-IDM et leur inhibition expérimentale entraîne une diminution de la taille de la zone lésée associée pour TLR4 à une diminution de la phase inflammatoire [129, 130].

Les DAMPs sont également responsables de l'activation d'une autre cascade de la réponse immunitaire innée, le système du complément. Dans le contexte de l>IDM les trois voies du complément [131] sont impliquées dans le recrutement des cellules immunitaires pro-inflammatoires dans le myocarde et son inhibition limite l'infiltrat cellulaire post-IDM [131, 132]. Une fois les récepteurs PRR activés, le signal est transmis à la cellule [133, 134] pour enclencher l'activation cellulaire. Les principaux transmetteurs intracellulaires dans les voies de signalisation de PRR sont Myeloid differentiation primary response 88 (MYD88), Irak et TRAF6. Ils activent le NF κ B qui est un facteur de transcription impliqué dans l'activation de l'expression de diverses cytokines et chimiokines contribuant ainsi à l'activation ou l'entretien de l'inflammation. L'inhibition expérimentale de MyD88 chez la souris permet de

limiter l'extension de la zone infarctée et de diminuer l'apoptose des cellules bordant la zone infarctée contribuant ainsi à l'amélioration de la survie post-IDM. Dans un autre modèle murin, l'inhibition de NFκB entraîne une amélioration de la fonction ventriculaire et augmente également la survie.

PRR	PAMP	Localisation
Récepteur scavenger	LDL, LPS (bactéries)	Membrane plasmique
Mannose récepteur	Mannose (levures, bactéries)	Membrane plasmique ou plasmatique
TLR2	Peptidoglycans (Gram+)	Membrane plasmique
TLR4	Lipopolysaccharides (Gram-)	Membrane plasmique
TLR3	ARN double brin (virus)	Endosome
TLR7, 8	ARN simple brin (virus)	Endosome
RIG-1 like helicase	ARN double brin (virus)	Cytosol
Nod-like receptor (NLR)	Parois bactérienne ou motifs bactériens (flagelline, toxine), signaux de danger endogènes	Cytosol

Tableau 4 : Principaux types de PRRs

Le premier récepteur Toll, découvert chez la drosophile possède des fonctions dans le développement embryonnaire. B. Lemaitre, chercheur français, met en évidence, en 1999, les fonctions immunitaires de Toll. Depuis, un grand nombre de Toll like récepteurs (TLR) ont été découverts chez les mammifères.

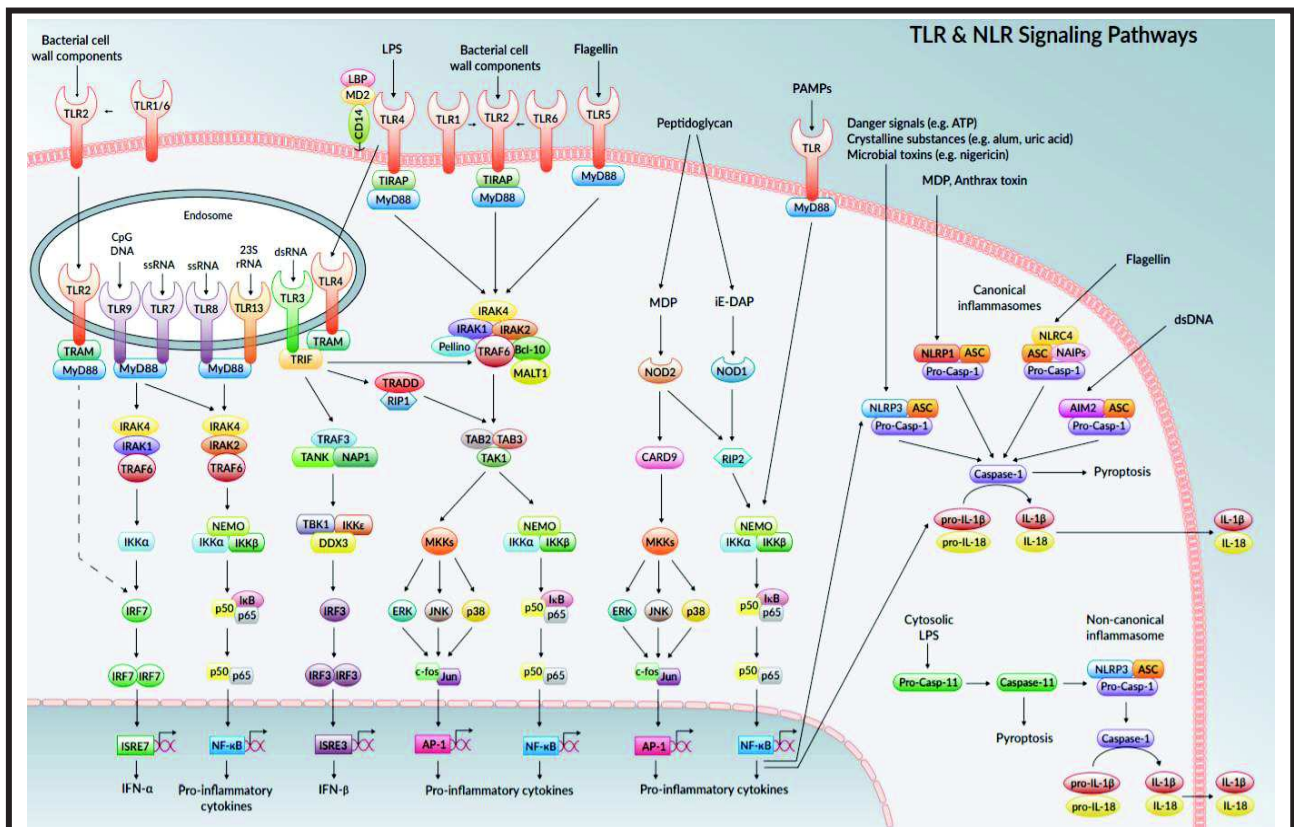


Figure 15 : Signalisation TLRs et NLRs

Source : InvivoGen

Cette cascade de signalisation orchestrée par des PRRs permet d'activer des effecteurs de nature variée : *i)* des petites molécules (monoxyde d'azote, eicosanoïdes), *ii)* des cytokines (pro-inflammatoires) *iii)* des chimiokines (CCL2, MCP1) ou *iv)* des cellules (leucocytes, macrophages, lymphocytes, cellules endothéliales) [135-140].

Les ROS, produites au sein de la zone lésée, favorisent le recrutement et l'activation des cellules immunitaires. En effet, les ROS sont capables d'accentuer le chimiotactisme leucocytaire par activation du système du complément, de stimuler l'expression des molécules d'adhésion endothéliales et de favoriser la synthèse de cytokines et de chimiokines via la voie de signalisation dépendante du NFκB.

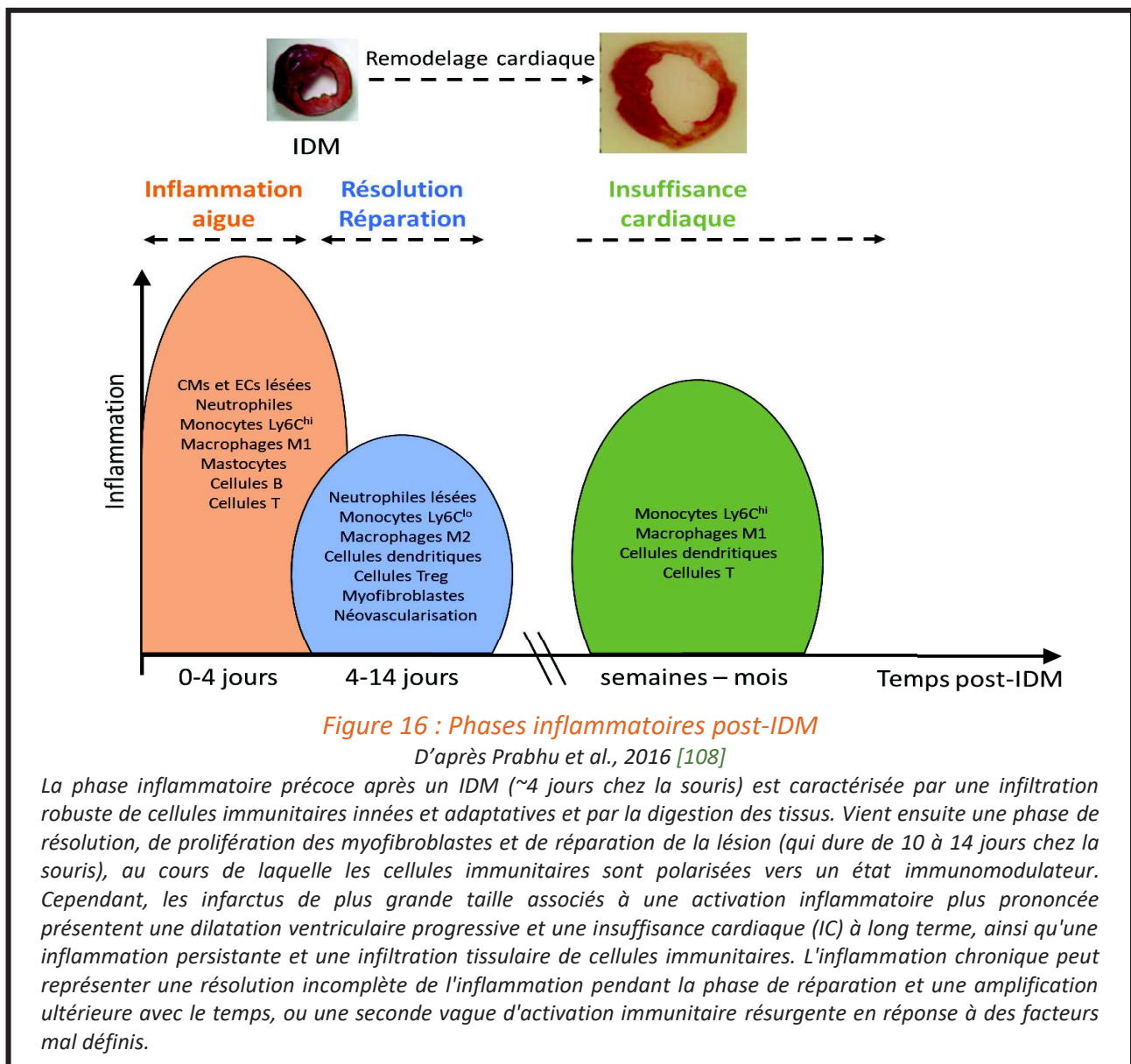
L'ensemble de ces signaux contribuera au chimiotactisme des monocytes classiques Ly6C^{high} vers le cœur. Ces monocytes infiltrés dans le cœur se différencient en macrophages de type M1 possédant une activité phagocytaire très élevée afin d'éliminer les cellules mortes et les débris de la MEC. Un orage cytokinique se produit, correspondant à l'augmentation du TNF α, de l'IL-1β et de l'IL-6 qui facilitent l'infiltration leucocytaire vers le myocarde via l'augmentation de l'expression des intégrines par l'endothélium vasculaire.

2.2.1.2 Phase proliférative/de résolution

La seconde phase, débute avec le recrutement des monocytes non classiques Ly6C^{low} qui, une fois dans le tissu cardiaque, vont se différencier en macrophages de type M2. Ces macrophages favorisent la cicatrisation de la zone lésée, sécrètent des facteurs de croissance permettant le recrutement des fibroblastes et leur activation en myofibroblastes. Ces myofibroblastes prolifèrent et sécrètent du collagène ainsi que d'autres composants de la MEC. Les macrophages de types M2 sont également capables de sécréter des facteurs de croissance impliqués dans l'angiogenèse et la lymphangiogenèse pour stimuler la croissance des vaisseaux sanguins et lymphatiques [141, 142]. L'apoptose de la majorité des cellules réparatrices marque la fin de la phase proliférative.

2.2.1.3 Phase de maturation

Au cours de cette dernière phase, la maturation du tissu fibrotique vers un tissu cicatriciel massif et dense constitué de collagène réticulé permet la mise en place d'une cicatrice stable en lieu et place de la zone lésée. En conclusion, cette réponse immuno-inflammatoire est très finement régulée et fait intervenir comme évoqué précédemment différents acteurs cellulaires et moléculaires dont le recrutement et l'action est orchestré selon ces trois phases. J'évoquerai donc le rôle des principaux acteurs cellulaires et moléculaires mis en jeu en suivant le déroulement chronologique selon lequel ils participent à la réparation cardiaque post-IDM (*Figure 16*).



2.2.2 Les acteurs cellulaires de la réponse immune post-IDM

2.2.2.1 Cellules immunitaires résidentes cardiaques

En conditions physiologiques, en absence de toute pathologie cardiovasculaire, les cellules immunitaires ne sont que très faiblement représentées dans le tissu cardiaque. La majorité de celles-ci sont les macrophages situés à proximité des cellules endothéliales et au niveau de l'interstitium cardiomyocyttaire. Les autres cellules immunitaires (mastocytes, cellules dendritiques, cellules B, cellules Treg), se trouvent disséminées entre les cardiomyocytes. Ces cellules, dites résidentes, semblent constituer un réservoir de cellules capables de répondre rapidement à un dommage tissulaire en amont du recrutement de cellules immunitaires circulantes. Par ailleurs, comme évoqué précédemment, les macrophages résidents semblent avoir un rôle dans l'activité conductrice du cœur [103]. Les neutrophiles et les monocytes, se trouvent dans la circulation coronaire et sont par conséquent absents du tissu cardiaque sain (*Figure 17a et 17b*).

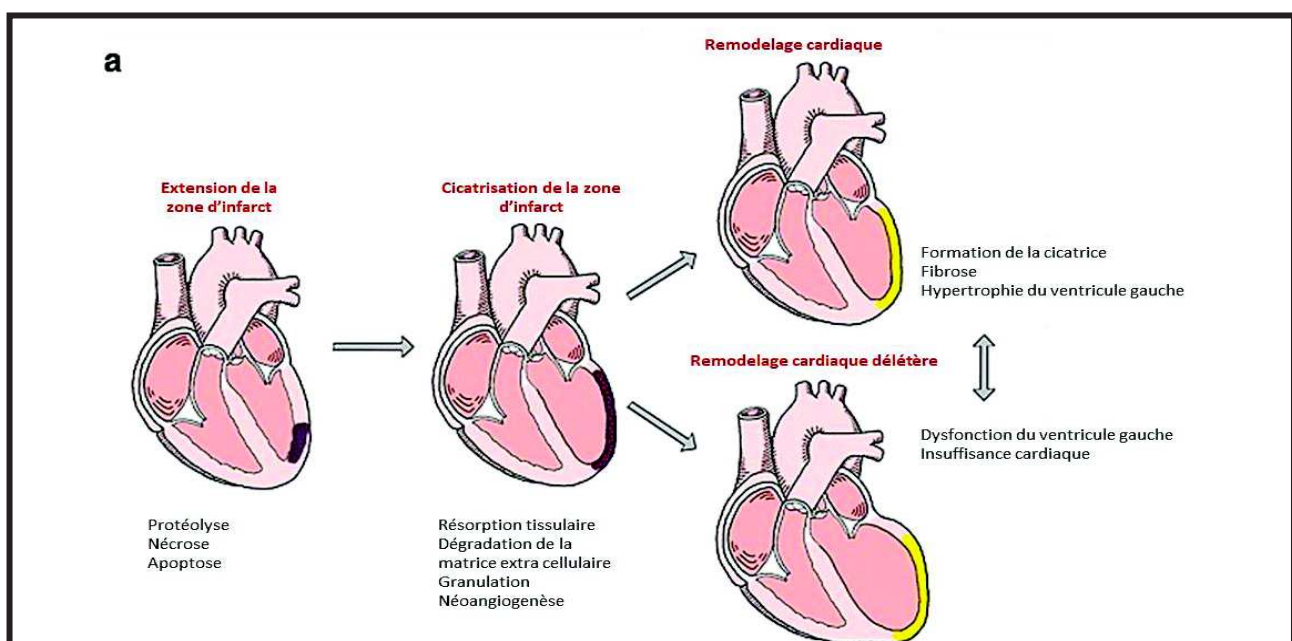
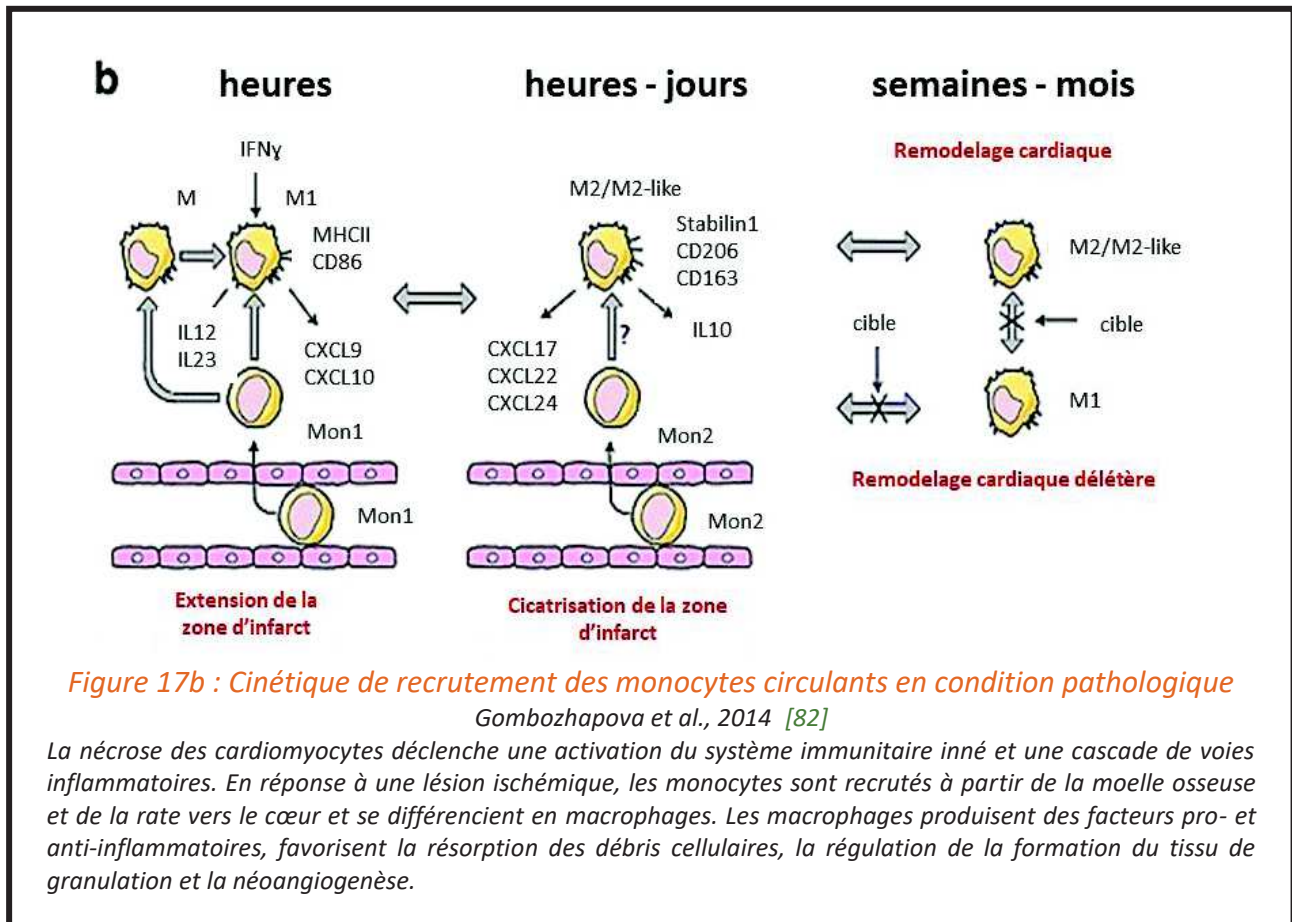


Figure 17a : Cinétique de recrutement des monocytes circulants en condition pathologique.

Gombozhapova et al., 2014 [82]

Mécanismes du remodelage cardiaque post-IDM. Dans la phase précoce de la lésion, le remodelage ventriculaire est un effet de l'expansion de la zone d'infarctus ; dans la phase tardive, il implique une hypertrophie des myocytes, une fibrose interstitielle et une dilatation du ventricule gauche. Les modifications de la matrice extracellulaire dans le cœur post-IDM jouent un rôle important dans le remodelage cardiaque. Un grand nombre de facteurs endogènes affectent la matrice extracellulaire, provoquant la dégradation ou la synthèse de ses composants.



2.2.2.2 Processus dynamique de recrutement des cellules inflammatoires post-IDM

L'inflammation locale survenant après l'IDM entraîne le recrutement dynamique des cellules inflammatoires. En effet, les cellules immunitaires sont les principaux médiateurs de la phase pro-inflammatoire post-IDM. Plus précisément, le myocarde devient le siège de l'infiltration séquentielle des neutrophiles, des phagocytes mononuclés, des cellules dendritiques et des lymphocytes [143-145].

Les neutrophiles migrent vers le myocarde dès les premières heures suivant l'ischémie et leur nombre est maximum 1 jour post-IDM. Par la suite, les monocytes/macrophages deviennent les populations majoritairement recrutées dans le myocarde. Ce recrutement s'accompagne alors de la libération de médiateurs de l'inflammation, de ROS et d'enzymes protéolytiques. Ces cellules participent ainsi à l'initiation et à la résolution de l'inflammation et orchestrent des processus tels que la phagocytose, la protéolyse, l'angiogenèse, le remodelage et la régénération ventriculaire dans les phases séquentielles de la réparation cardiaque [146].

Les cellules dendritiques et les lymphocytes T sont également recrutés au niveau de la zone lésée pour contribuer à la cicatrisation et au remodelage ventriculaire [147].

J'aborderai ci-après l'implication de ces cellules de l'immunité innée et adaptative dans le bon déroulement de la réponse inflammatoire post-IDM.

2.2.2.3 Les cellules de l'immunité innée

Les cellules de l'immunité innée possédant les récepteurs de type PRRs à leur surface sont recrutées dès la phase inflammatoire de la réponse immune post-IDM.

- Les neutrophiles

En conditions homéostatiques, les neutrophiles sont produits en grande quantité dans la moelle osseuse à raison de 1.10^{11} voire 2.10^{11} neutrophiles par jour chez l'adulte. La production de neutrophiles est régulée par le taux d'apoptose dans les tissus, ainsi leur production s'accroît suite à un IDM [148]. Ce sont, effectivement, les premières cellules immunitaires recrutées au niveau du myocarde lésé. Les neutrophiles sont impliqués dans la défense contre les micro-organismes. Après leur production ils circulent dans le sang périphérique avec une demi-vie de quelques heures et sont recrutés dans le cadre de l'IDM par les cellules endothéliales activées.

En effet, les signaux de danger DAMPs générés par le myocarde lésé et les macrophages résidents entraînent l'activation des cellules endothéliales locales favorisant l'adhésion et le recrutement des neutrophiles, plus précisément au niveau des veinules post-capillaires où les forces de cisaillement lié au flux sanguin sont moins importantes que dans les artérioles ou capillaires.

Le recrutement des neutrophiles suit deux phases distinctes : dans un premier temps, la libération des DAMPs mitochondriaux (peptides formylés et ADN mitochondrial) vont favoriser l'activation périphérique des neutrophiles et leur recrutement par chimiotactisme au niveau de la zone lésée. Les neutrophiles expriment alors les récepteurs FRP1 (pour Formyl Peptide Receptor 1) et TLR9, respectivement responsables de la reconnaissance des peptides formylés et de l'ADN mitochondrial.

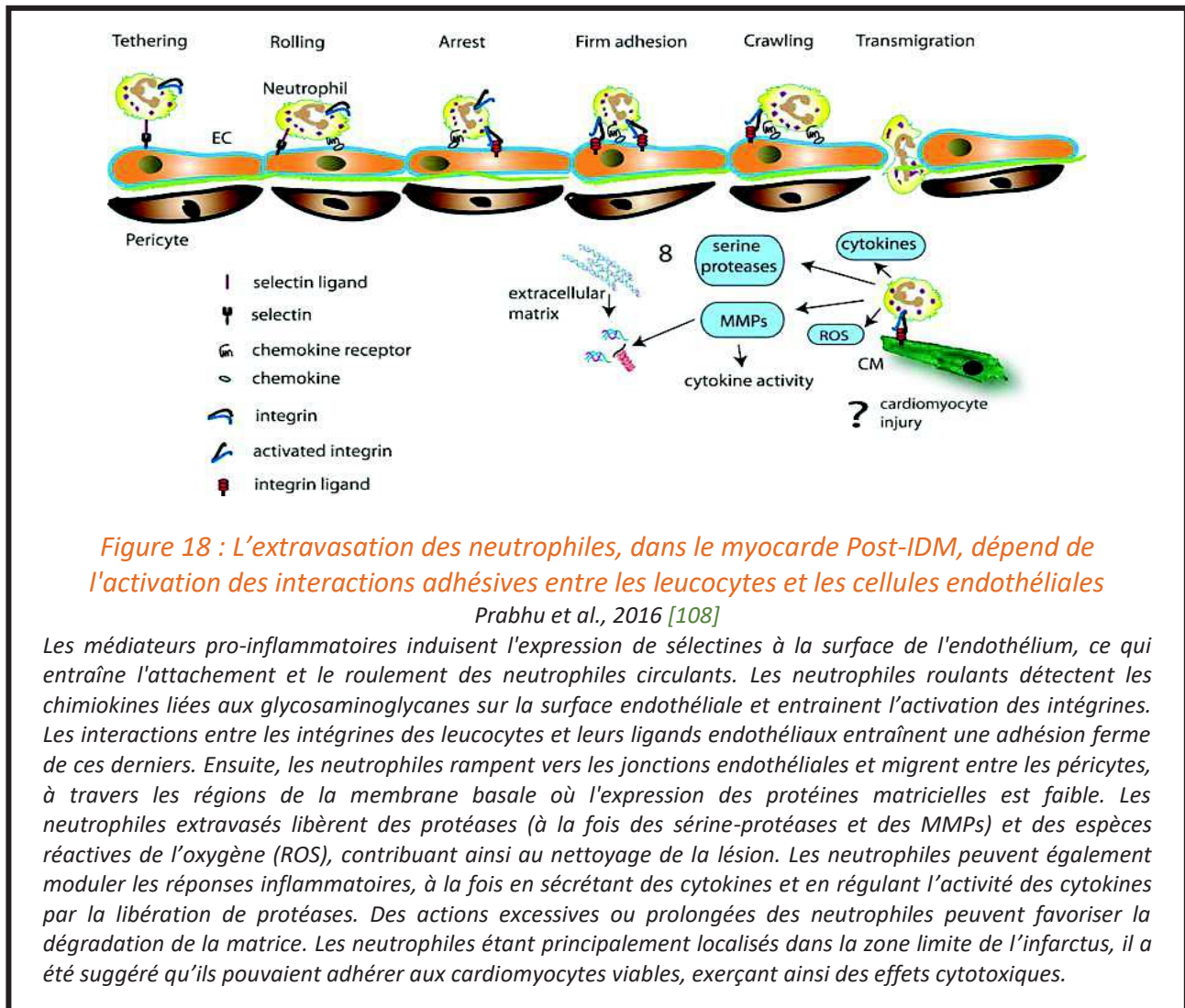
Dans un second temps, les neutrophiles activés vont infiltrer le tissu cardiaque. Cette étape met en jeu les cellules endothéliales activées par la présence des cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 β et IL-18). En effet, les médiateurs de l'inflammation locale observée dans le myocarde suite à un IDM (TNF α , l'IL-17 ou encore l'IL-1 β), entraînent l'activation locale des cellules endothéliales, qui déterminent l'adhésion et la fixation initiale des neutrophiles activés. L'endothélium vasculaire activé surexprime plusieurs molécules d'adhésion (P-selectine, E-selectine et les intégrines Intercellular Adhesion Molecule 1 ; ICAM1 et Vascular Cell Adhesion Molecule 1 ; VCAM1). Ces molécules d'adhésion sont capables de se lier à la P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) et la L-selectine exprimées de façon constitutive par les neutrophiles.

Le contact initial entre les neutrophiles et les cellules endothéliales activées est établi par la reconnaissance entre PSGL-1 et les sélectines (P et E).

La E-sélectine se lie également à la E-selectin ligand-1 (ESL-1) sur les microfilaments [149-151] et à CD44 sur la membrane cellulaire, ces deux interactions permettent de réduire la vitesse de roulement des neutrophiles [152] nécessaire pour mettre en place l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium. Cette adhésion fait intervenir les intégrines β 2 (Lymphocyte function-associated antigen 1 ; LFA-1 et Macrophage-1 antigen ; Mac-1) présentes sur les neutrophiles et leurs ligands appartenant à la superfamille des immunoglobulines, ICAM-1 et ICAM-2, présents sur les cellules endothéliales vasculaires.

De façon intéressante, il semble que ICAM-1 soit concentré sur des micro-domaines formant des plateformes d'adhésion/adhésives endothéliales [153]. Cette étape d'adhésion est cruciale pour le processus de diapédèse des neutrophiles. En effet, en absence de CD18 (Intégrine de type β), il est observé une réduction de l'adhérence des leucocytes par une incapacité à établir une adhérence vasculaire ferme.

Une fois l'adhésion stable établie, il subsiste deux possibilités de migration trans-endothéliale : *i*) Trans-cellulaire où les neutrophiles pénètrent à travers des pores des cellules endothéliales et *ii*) Para-cellulaire où les neutrophiles se compriment entre les cellules endothéliales (*Figure 18*).



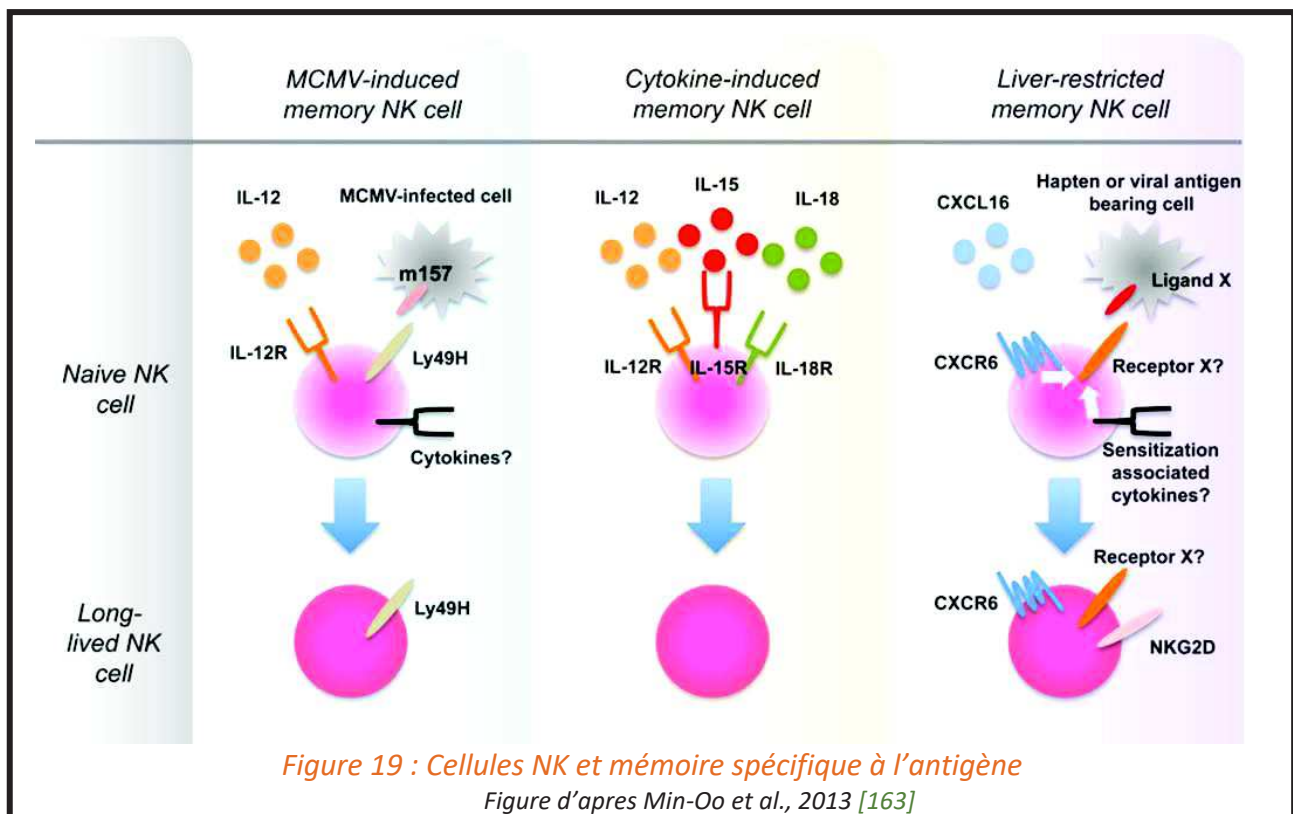
Longtemps, les neutrophiles ont été considérés comme la première population cellulaire infiltrant la zone lésée. Une étude récente basée sur l'utilisation de microscopie intravitale post-IDM chez des souris CX3CR1^{8fp/+}, met en évidence un recrutement plus intense et précoce de monocytes comparativement à celui des neutrophiles [154]. Cette population de monocytes « patrouillant » pourrait correspondre au premier pool d'infiltrat monocytaire post-IDM, permettant d'attirer les neutrophiles et d'amplifier ainsi le signal inflammatoire initial. Outre ces monocytes CX3CR1⁺, les macrophages résidents CCR2⁺ influencent également la réponse initiale des neutrophiles, en promouvant l'extravasation des neutrophiles de la circulation vers la zone lésée, via la production de Chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)2 et de CXCL5 dépendante de la voie TLR9/MyD88 [155].

Les neutrophiles actifs après migration et infiltration des tissus [156] produisent plusieurs chimiokines (dont l'IL-8 et Gro- α) permettant le recrutement successif d'autres cellules immunitaires. Les neutrophiles sécrètent également des protéases, responsables, en partie, de la digestion du tissu cardiaque lésé, mais aussi l'activation de certains chemo-attractants tels que le C5a. Ces protéases, susceptibles d'aggraver les lésions tissulaires, ont entraîné le développement de stratégies thérapeutiques visant à bloquer le recrutement précoce des neutrophiles. Ces stratégies expérimentales semblent bénéfiques post-IDM en limitant la mort cardiomyocytaire chez la souris.

Les études de Liehn et collaborateurs se sont intéressées au recrutement de neutrophiles chez la souris post-IDM. Ils ont mis en évidence l'importance de l'axe CXCR4-CXCL12 (SDF-1). En effet, CXCR4 est essentiel à la fois pour la mobilisation des neutrophiles de la moelle osseuse vers la circulation et pour le recrutement des cellules circulantes vers les tissus périphériques lésés. Dans leur modèle, les animaux hétérozygotes CXCR4^{+/-}, sont caractérisés par une faible expression de CXCR4 dans les cellules myéloïdes dérivées de la moelle osseuse. Le moindre recrutement de neutrophiles au niveau de la zone ischémique est associé au développement d'une cicatrice de plus petite taille à 4 semaines post-IDM en comparaison aux individus contrôles. Ici encore, il semble qu'un moindre recrutement de neutrophiles en phase précoce post-IDM favoriserait un remodelage bénéfique. L'effet néfaste des neutrophiles dans les zones ischémiques, exacerbant les dommages tissulaires observés post-IDM pourrait être médié par la libération accrue de ROS et de cytokines pro-inflammatoires.

- Les lymphocytes Natural Killers (NK)

Les cellules NK [143, 157, 158], classiquement connues pour leur implication dans la réponse antivirale et antitumorale, sont également impliquées dans l'homéostasie tissulaire. Elles sont à l'interface de l'immunité innée et adaptative. En effet, bien que classiquement décrites comme appartenant au compartiment inné, dépourvu de réponse spécifique à l'antigène et incapable de développer une réponse mémoire, plusieurs données mettent en évidence la capacité des cellules NK à se différencier en cellules mémoires, possédant une durée de vie longue [159-161]. Plusieurs études tendent à mettre en évidence les fonctions antigènes spécifiques des NK, notamment dans le foie où les NK résidents sont capables d'acquérir une mémoire spécifique à l'antigène. Il semblerait que cette mémoire soit médiée par le récepteur CXCR6 [162] (Figure 19).



Les cellules NK sont capables de répondre aux stimuli inflammatoires présents dans les tissus endommagés et sont impliquées par conséquent dans l'amplification et la résolution de l'inflammation. Les cellules NK possèdent un répertoire riche de récepteurs activateurs et inhibiteurs à leur surface. Ces récepteurs sont exprimés constitutivement mais distribués de façon stochastique *i.e.* tous les récepteurs ne sont pas exprimés sur une unique cellule NK. Ainsi, chaque cellule NK possède une combinaison de récepteurs qui lui est propre. Cette richesse de répertoire de récepteurs permet aux cellules NK de distinguer les cellules du soi, des cellules transformées (soi altérées ou modifiées) et les cellules du non soi et ainsi de reconnaître de potentiels dangers microbiens.

Les NKs participent à l'immuno-surveillance via leurs récepteurs inhibiteurs (tel que Natural Killer Group (NKG2A) permettant de déterminer si le CMH est correctement exprimé. Tant chez l'Homme que chez la souris, les NKs sont capables de détecter les cellules néoplasiques, infectées ou stressées via leur récepteurs NKG2D et NKp46 (récepteurs activateurs). Cette reconnaissance entraînera leur activation.

Plus précisément, les NKs peuvent être activés par divers mécanismes : *i)* par réticulation des récepteurs activateurs (NKG2D et NKp46) associé au désengagement des récepteurs inhibiteurs (NKG2A), *ii)* par stimulation avec de cytokines telles que l'IFN γ , l'IL-2, l'IL-12, l'IL-15 et l'IL-18, *iii)* par activation directe via le CD16A ou les TLRs. En effet, les cellules NK expriment à la surface le TLR2, TLR3, TLR7/8 et TLR9, permettant de détecter les PAMPs d'origine virale ou bactérienne, mais également de reconnaître les motifs moléculaires associés aux PAMPs exprimés par les cellules endogènes en souffrance [164].

Les cellules NK sont impliquées dans la régulation de la réponse immune via : *i)* la production de chimiokines et cytokines, *ii)* l'interaction avec les cellules dendritiques et *iii)* l'interaction avec les lymphocytes T. En effet, les cellules NK activées sont capables de produire une grande variété de chimiokines induisant l'amplification de la réponse immunitaire et le recrutement de cellules immunitaires supplémentaires (Lymphocytes T ou cellules NK). La production de cytokines pro-inflammatoires Th1 (IFN γ et TNF α) va quant à elle permettre d'établir un dialogue avec les autres acteurs cellulaires de la réponse immunitaire et permettre d'activer les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes T [165-167].

Les cellules NK peuvent également sécréter des cytokines immuno-régulatrices telles que le TNF β , l'IL-13, l'IL-10 ou encore le GM-CSF [168]. L'IL-10 confère aux cellules NK des fonctions immunosuppressives en induisant la répression de la prolifération et les fonctions sécrétrices des Lymphocytes T stimulés par un antigène [169].

Dans le contexte inflammatoire post-IDM, les cellules NK peuvent être activées par les cytokines IFN γ , IL-2, IL-12, IL-15 et IL-18. Le rôle des NKs, au cours de l'IDM, a fait l'objet des études de Luger et collaborateurs [170]. La déplétion des NKs par injection *iv* d'un anticorps anti-NK1.1, 24 h avant l'induction d'un IDM chez la souris est corrélée à une diminution des neutrophiles dans la rate et le cœur. Ainsi, ils établissent un lien étroit entre les NKs et les neutrophiles dans la phase précoce post-IDM. De façon intéressante, l'absence des NKs associée à la diminution des neutrophiles semble également associée à l'augmentation des proportions de mono Ly6C^{high} à 24h et 7 jours post-IDM [143, 157].

Bien que Luger et collaborateurs mettent en avant un rôle bénéfique de l'absence des NKs, selon Yan et collaborateurs cela n'est pas corrélé avec amélioration de la fonction cardiaque [158].

Par ailleurs, les cellules NK, comme évoqué précédemment, participent principalement à la mise en place de la réponse adaptative efficace via la sécrétion de médiateurs solubles et par l'initiation d'un dialogue bidirectionnel avec d'autres cellules immunitaires, notamment avec les cellules dendritiques.

- Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DCs) représentent un groupe hétérogène de cellules dont la fonction principale est la présentation antigénique et l'induction de la polarisation des lymphocytes T. Les DCs sont les seules cellules présentatrices de l'antigène (Antigen-Presenting Cells ; APC) induisant des réponses primaires et capables d'établir une mémoire immunologique [171-173].

L'ontogenèse des DCs se découpe en 4 phases. Les DCs proviennent de progéniteurs de la moelle, communs aux macrophages, appelés DCs médullaires immatures, qui deviennent des précurseurs périphériques circulants capables de reconnaître les antigènes, de libérer de grandes quantités de cytokines et de coloniser les tissus. Les DCs immatures

résidant dans les tissus possèdent une forte capacité de phagocytose. Ensuite, les DCs deviennent matures dans les organes lymphoïdes secondaires, exprimant des niveaux élevés de molécules co-stimulatrices.

La maturation des DCs est un processus continu qui est initié à la périphérie lors de la rencontre avec un antigène et/ou les cytokines pro-inflammatoires et complété lors de l'interaction des DCs avec les Lymphocytes T. Cette maturation des DCs est régulée par de nombreux facteurs tels que les molécules liées aux agents pathogènes (ADN bactérien, ARN double brin, signaux inflammatoires et signaux dérivés des Lymphocyte Ts) ou les signaux inflammatoires du micro-environnement local (TNF α , IL-1, IL-6, IL-10, TGF- β).

Lors de dommages tissulaires, tels que ceux observés post-IDM, les DCs immatures migrent vers les organes lymphoïdes permettant la maturation des cellules T spécifiques de l'antigène, déclenchant ainsi la réponse immunitaire adaptative. En effet, les DCs présentent les antigènes aux cellules T CD4-helper, qui à leur tour régulent les effecteurs immunitaires (Lymphocytes T CD8, Lymphocytes B, mais aussi les macrophages, éosinophiles, cellules NK). Ainsi, les DCs participent au recrutement des cellules effectrices sur le site de lésion tissulaire.

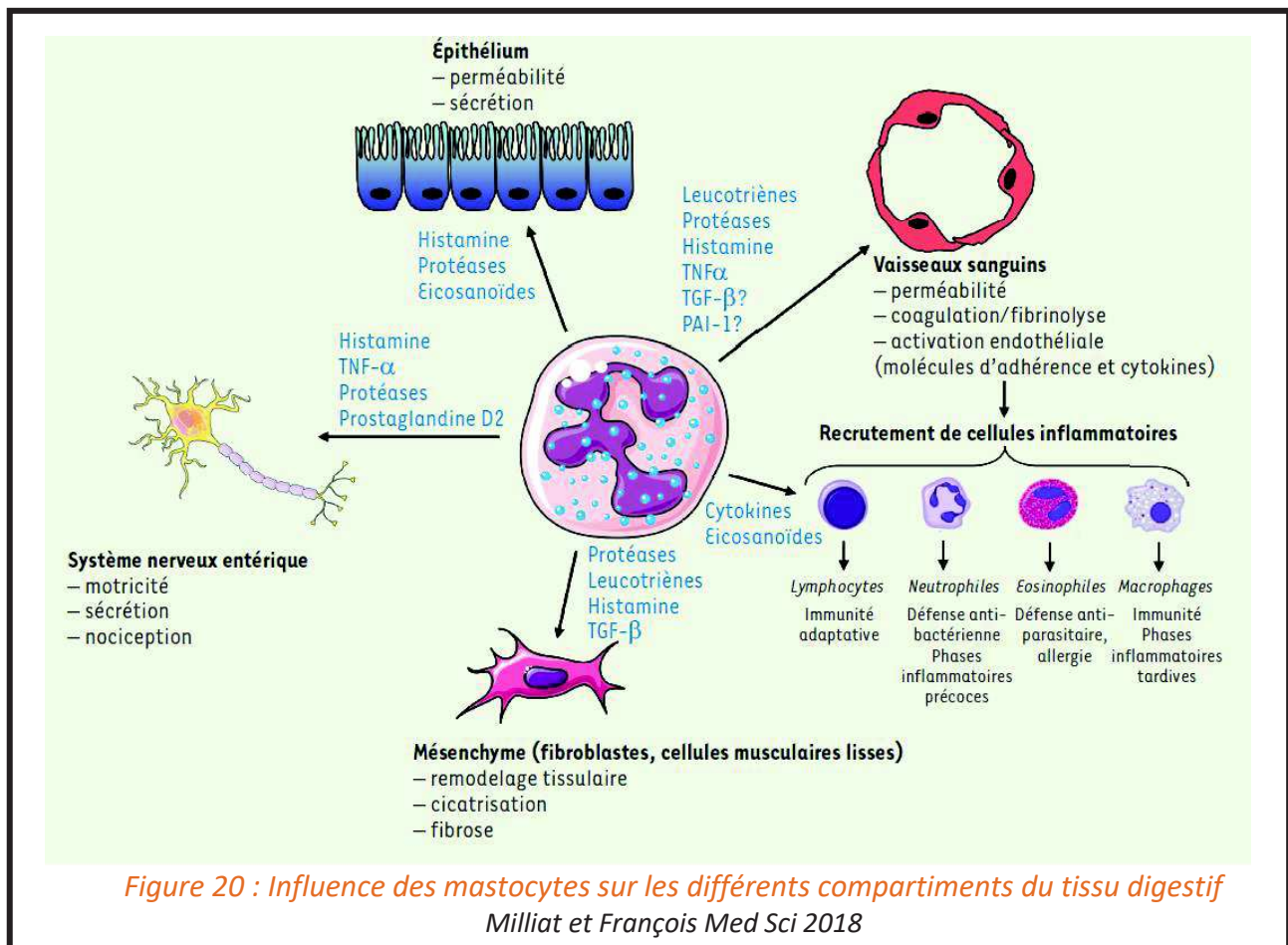
L'implication des DCs dans le processus d'activation des Lymphocytes T post-IDM est connue depuis les années 1990 [174]. Des études sur les modèles expérimentaux associent un rôle ambivalent des DCs sur le remodelage post-IDM [175-177]. En effet, d'une part, la mobilisation des DCs *via* la voie IL-1 Receptor-Associated Kinase (IRAK)-4, entraîne l'amplification de la réponse Th1, la majoration de la fibrose interstitielle et contribue ainsi à l'apoptose des cardiomyocytes aboutissant au remodelage pathologique du ventricule gauche post-IDM [176]. La signalisation du G-CSF permettant la moindre infiltration des DCs précocement post-ischémie est corrélée avec une amélioration du remodelage du ventricule. En revanche, l'utilisation d'un modèle de souris transgéniques permettant la déplétion des DCs a mis en avant le rôle bénéfique immuno-protecteur des DCs au cours de la guérison *via* la régulation de l'homéostasie des macrophages [177, 178].

- Les mastocytes

Les mastocytes sont des dérivés tissulaires de granulocytes basophiles circulants, répartis de façon ubiquitaire dans l'organisme, localisés à proximité des cellules avec lesquels ils interagissent. Chez les rongeurs, les mastocytes siègent principalement au niveau des tissus épithéliaux et muqueux, des cavités thoraciques et péritonéales. Ils existent au niveau de tous les tissus vascularisés à l'exception du système nerveux central et de la rétine. Ils sont principalement concentrés au niveau des zones exposées au milieu extérieur (tractus gastro-intestinal, l'épithélium respiratoire, la peau) [179, 180] (*Figure 20*).

Les mastocytes initialement étudiés pour leur implication dans la réaction allergique sont en réalité également impliqués dans de nombreux processus physiopathologiques. En effet, le développement de modèles animaux dépourvus de mastocytes a permis de mettre en évidence leur implication dans des processus physiopathologiques tels que la cicatrisation tissulaire, la défense de l'organisme, l'inflammation, la fibrose ou encore le développement tumoral.

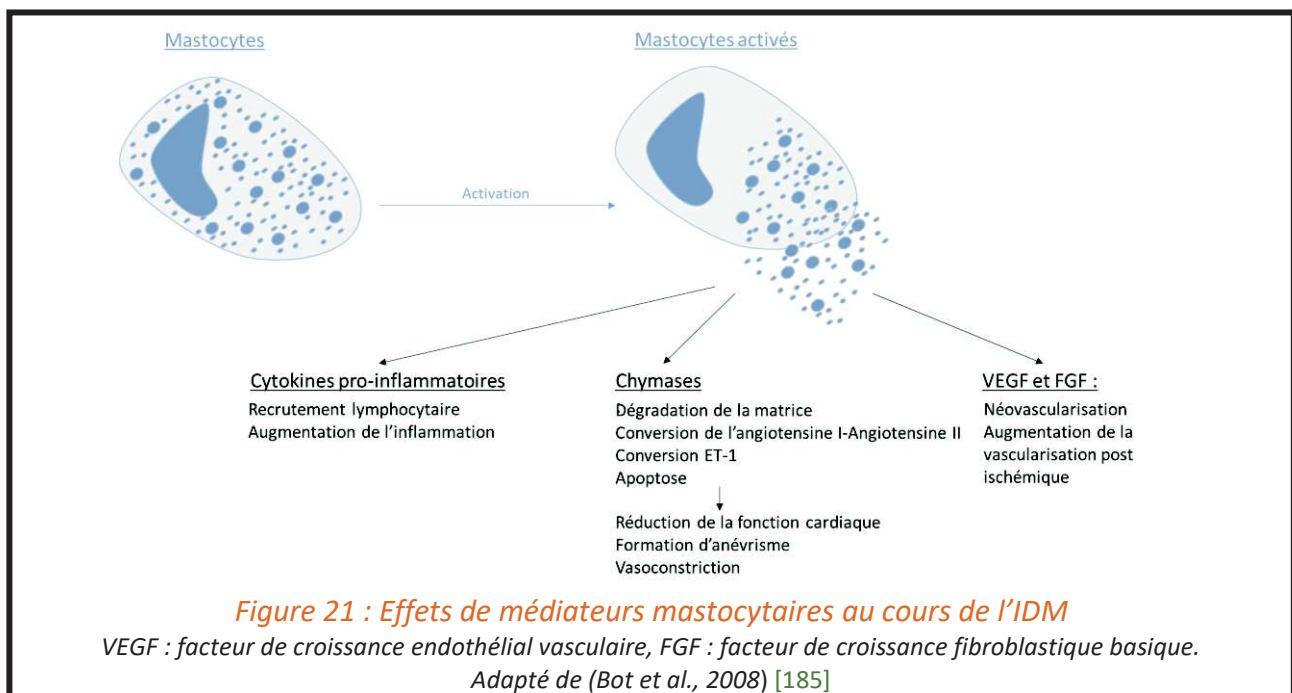
Dans les tissus, en réponse au microenvironnement, les mastocytes peuvent prendre des phénotypes multiples, qui diffèrent notamment entre espèces, organes, ou conditions physio/pathologiques [181]. A titre d'exemple, chez la souris, on peut distinguer les mastocytes muqueux (mucosal mast cells, MMC), présents dans la muqueuse intestinale des rongeurs, des mastocytes séreux (connective tissue mast cells, CTMC). La distinction repose sur la localisation tissulaire et le phénotype, notamment en considération du type de médiateurs qu'ils synthétisent [182]. Chez l'homme, l'hétérogénéité mastocytaire est fixée par l'expression des sérines protéases (chymases et tryptase).



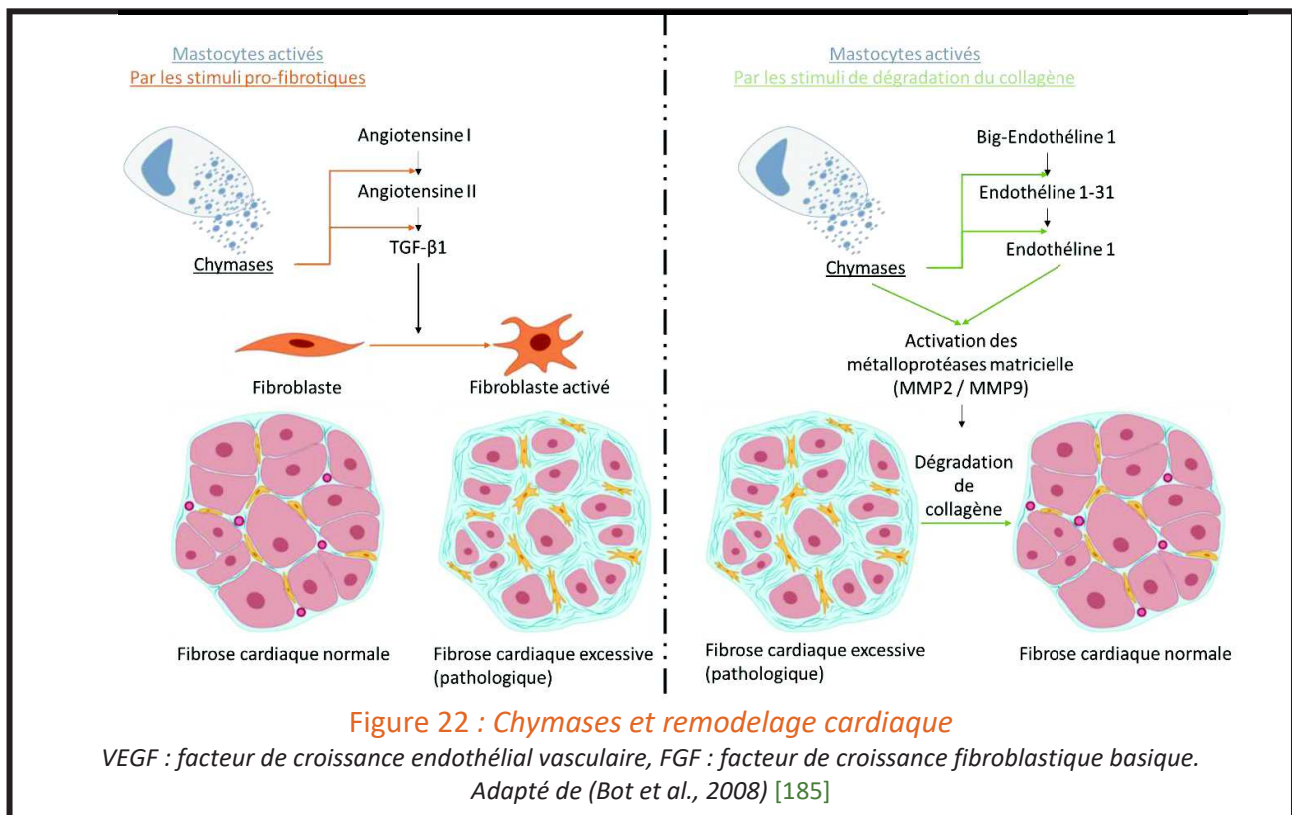
Les mastocytes sont des granulocytes et exercent leurs fonctions dans les tissus par le stockage et la libération voire la sécrétion *de novo* de médiateurs biologiques actifs. En effet, les mastocytes sont capables d'agir sur les cellules adjacentes et sur le microenvironnement local à travers les médiateurs libérés par dégranulation [183]. Les granules mastocytaires contiennent plusieurs molécules, dont les protéoglycanes, l'histamine, les cystéinyles cathepsines, les protéases et des cytokines pro/anti-inflammatoires. Les mastocytes sont donc des cellules sécrétrices capables de stocker et de libérer via dégranulation de multiples médiateurs de l'inflammation, en condition physiologique et en réponse à de nombreuses situations pathologiques (traumatismes, brûlure, irradiation, réponse anti-bactérienne etc...). Ils jouent notamment un rôle prépondérant dans le recrutement précoce de cellules immunitaires telles que les neutrophiles ou les lymphocytes T, et sont la source de nombreux médiateurs inflammatoires importants.

Au niveau cardiaque, les mastocytes ont une localisation périvasculaire tant chez la souris que chez l'homme. Ils sont connus pour jouer un rôle physiologique dans le processus d'angiogenèse et la génération d'angiotensine II. La plupart des mastocytes cardiaques sont des mastocytes du tissu conjonctif. Leurs granules contiennent de l'héparine, la chymase, la tryptase, le TGF- β , l'IL-8 ou encore de CCL2 [183] (Figure 21). Dans le contexte inflammatoire particulier qui suit l'IDM, plus précisément dans la phase inflammatoire précoce (3-4 jours chez la souris), les cytokines, les ROS et l'activation du système du complément stimulent les mastocytes et entraînent leur dégranulation. Les mastocytes libèrent ainsi les médiateurs inflammatoires qu'ils contiennent déclenchant la réaction inflammatoire post-IDM. Ainsi, les mastocytes résidents péri-vasculaires participent à l'activation de la cascade inflammatoire post-IDM. Lors des phases tardives de la réponse inflammatoire post-IDM, les mastocytes régulent la prolifération des fibroblastes par interaction inter-cellulaire et libération de cytokines et facteurs de croissance. La densité mastocytaire myocardique est donc augmentée post-IDM suite au recrutement des précurseurs de mastocytes [108].

La libération par les macrophages du myocarde ischémié du Stem Cell Factor (SCF), ligand du récepteur c-Kit exprimé par les mastocytes [184], va les attirer vers la zone lésée par chimiotactisme. Les patients atteints de cardiomyopathie ischémique présentent une densité mastocytaire et une expression du SCF plus élevées [108].



L'un des éléments importants à prendre en considération est l'augmentation privilégiée du nombre de mastocytes dans les zones fibrosées. D'une part, il a été mis en évidence le rôle crucial que jouent les mastocytes dans la formation de la fibrose myocardique observée post-IDM [108] (*Figure 22*). Les activateurs produits par les mastocytes influencent le développement et la prolifération des fibroblastes. Les fibroblastes par contact physique avec les mastocytes et sous influence de certains facteurs libérés par ces derniers, tels que la tryptase, les histamines et le TGF- β , se différencient en myofibroblastes. Les myofibroblastes produisent du collagène, de la fibronectine et des protéoglycanes pour stabiliser la MEC et rétrécir la zone infarctée, mais participent également à la modulation de la réponse inflammatoire via la production et la sécrétion de facteurs de croissance et de cytokines. Le processus de dépôt de collagène peut devenir pathologique aboutissant à une fibrose tissulaire [186].



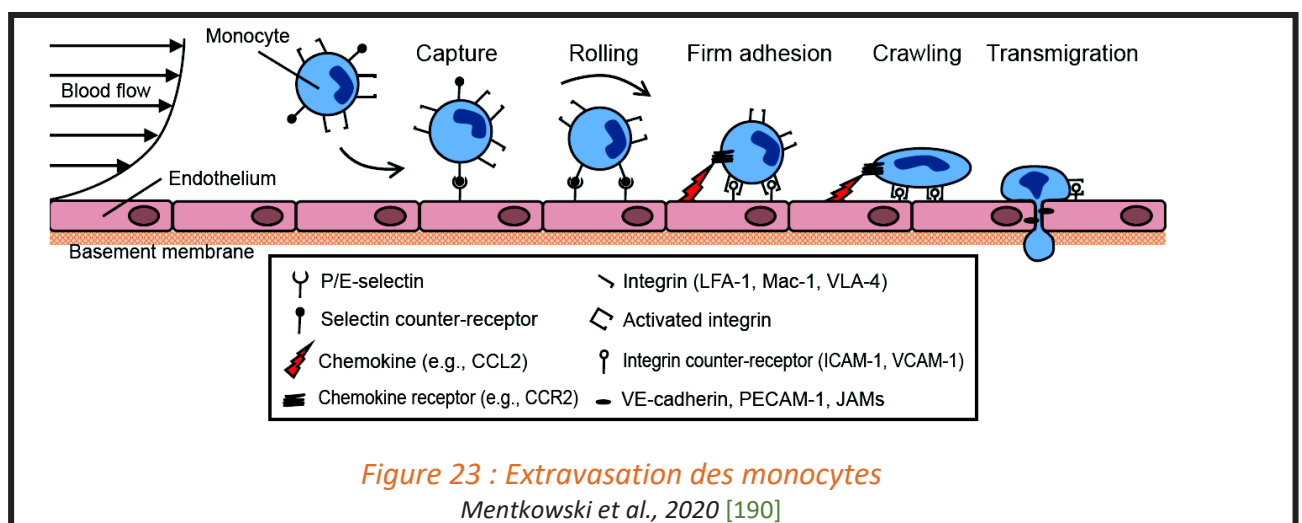
D'autre part, les mastocytes activent les MMPs induisant ainsi la dégradation de la MEC. Le rôle ambivalent des mastocytes suggère l'importance de leur implication dans le remodelage cardiaque [187]. Sur le plan physiopathologique, la fibrose myocardique est un processus de remodelage de la MEC, induisant une rigidité de la paroi ventriculaire [188], pouvant entraîner une dysfonction cardiaque notamment diastolique.

Les travaux de Bhattacharya et collaborateurs [189] associent la déficience en mastocytes à une augmentation de la survie des cardiomyocytes et à une réduction de la nécrose myocardique.

- Les monocytes classiques et macrophages M1

Comme précédemment décrit dans le chapitre 1, les monocytes Ly6-C^{high} n'étant pas présents dans le tissu cardiaque en condition homéostatique, ils sont recrutés à partir de la circulation coronaire afin d'infiltrer le myocarde, et déclencher le début de la phase inflammatoire. Leur recrutement met en jeu le récepteur CCR2 présent à leur surface et la cytokine CCL2 produite dans la zone lésée (Figure 23).

Ces monocytes Ly6-C^{high} une fois infiltrés dans le tissu cardiaque se différencient en macrophages M1 dont l'activité phagocytaire très élevée permet l'élimination des cellules mortes et des débris de la MEC. Ces macrophages M1 sont dits pro-inflammatoires considérant leur capacité de sécrétion de plusieurs cytokines pro-inflammatoires, importantes au déroulement de cette phase.



2.2.2.4 Les cellules de l'immunité adaptative

Les cellules de l'immunité adaptative participent également au bon déroulement de la phase inflammatoire précoce post-IDM. L'immunité adaptative, contrairement à l'immunité innée, fournit une réponse relativement lente. Les cellules de l'immunité adaptative, étant dotées de récepteurs spécifiques à l'antigène, mettent en place une mémoire immunologique spécifique de l'antigène. Au cours de cette phase pro-inflammatoire les principales cellules de l'immunité adaptative impliquées sont les lymphocytes B et les lymphocytes T naïfs ou mémoires plutôt que effectrices.

- Les Lymphocytes T

L'immunité adaptative correspond à l'activation des Lymphocytes T. Ce processus se déroule en plusieurs étapes. Schématiquement, les antigènes sont dans un premier temps reconnus et internalisés par les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (DCs, macrophages, Lymphocytes B) via le CMH de classe I et II, présents à la surface [191, 192]. Dans un second temps, l'interaction T Cell Receptor (TCR), présent sur les Lymphocytes T, avec le complexe peptide-CMH, à la surface des CPAs, est nécessaire à l'activation des Lymphocytes T (Figure 24). En parallèle, le signal de co-stimulation mettant en jeu le CD28, à la surface des Lymphocytes T et le CD80 ou CD86, à la surface des CPAs, sert de deuxième signal d'activation pour les lymphocytes [193]. Le troisième signal activateur des lymphocytes est l'environnement cytokinique favorisant ou pas une prolifération et activation cellulaire.

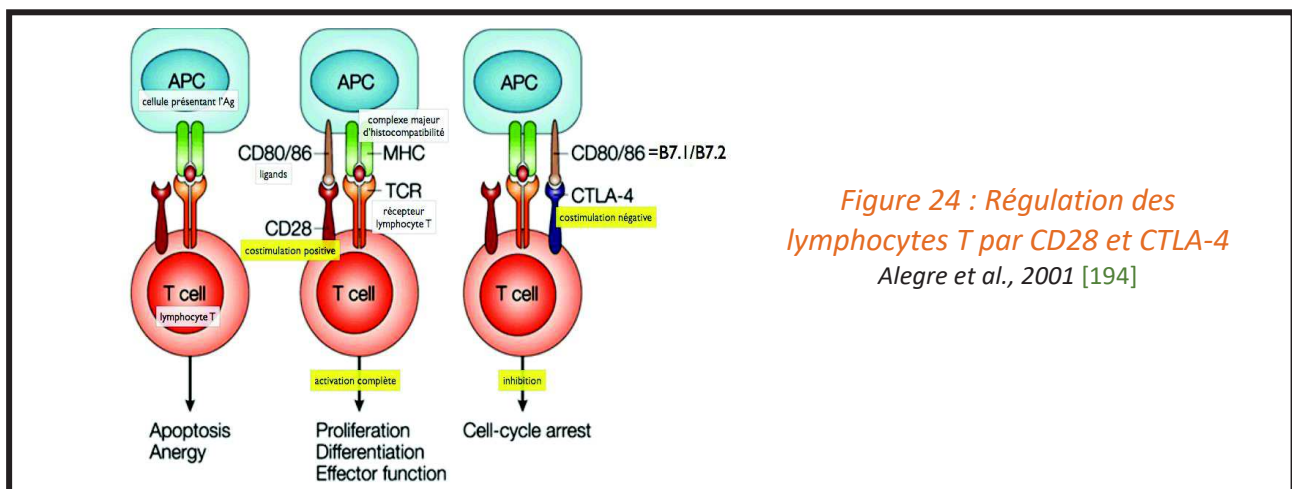


Figure 24 : Régulation des lymphocytes T par CD28 et CTLA-4
Alegre et al., 2001 [194]

Post-IDM, le taux de Lymphocytes T et Lymphocytes B au niveau circulatoire et cardiaque est fortement augmenté. Dans les modèles d'occlusion permanente de l'artère

coronaire ce nombre est multiplié par 5 voire par 10 dans le myocarde atteignant un pic à 7 jours post-IDM [195]. Sans preuve actuelle de prolifération *in situ* de ces populations cellulaires dans le myocarde, il semble probable que cette augmentation soit due à un recrutement plus accru.

La réponse des Lymphocytes T à l'IDM correspond à l'activation des Lymphocytes T CD4⁺ et l'expansion des Lymphocytes T régulateurs (TReg) Foxp3⁺ [196].

Les Lymphocytes T CD4⁺

Les Lymphocytes T CD4⁺ conventionnels présents dans le myocarde lésé sont principalement polarisés en Th1, avec une forte sécrétion d'IFN γ [195]. En effet, l'ischémie myocardique induit l'activation des Lymphocytes T CD4⁺ au sein des ganglions lymphatiques drainant le cœur (médiastinaux). Cette activation nécessite un répertoire de TCR intact. Par ailleurs, les Lymphocytes T CD4⁺ activés par le TCR sont nécessaires au dépôt correct de collagène lors de la phase maturation fibrotique post-IDM [147]. Ils interviennent ainsi dans la prévention de la dilatation du VG et la rupture pariétale consécutive.

Une étude expérimentale chez des souris déficientes en DCs CD11c⁺ donne la preuve indirecte de l'activation des Lymphocytes T CD4⁺ par les CPAs. Ces souris présentent un phénotype similaire post-IDM aux souris déficientes en Lymphocytes T CD4⁺ avec une détérioration de la fonction ventriculaire gauche et une aggravation du remodelage cardiaque [177]. Ces Lymphocytes T CD4⁺ régulent négativement le recrutement des monocytes pro-inflammatoires (Ly6C^{high}). Une absence de Lymphocytes T CD4⁺ dans le cœur entraîne une augmentation de la densité des Ly6C^{high} à l'origine d'une altération de la réponse angiogénique et du dépôt de collagène 7 jours après l'IDM [147]. Ainsi ces Lymphocytes T CD4⁺ semblent bénéfiques en diminuant la dilatation ventriculaire gauche et la mortalité post-IDM via leur action sur la modulation de l'activation immunitaire innée locale et plus particulièrement l'infiltration monocytaire.

Pourtant, le rôle de ces lymphocytes T post-IDM est ambivalent. Certaines études montrent que la déplétion des lymphocytes T CD4⁺ est associée à une diminution de la taille de la zone lésée et que les lymphocytes T CD4⁺ spécifiques aggravent l'inflammation. En effet, suite à l'IDM, les cellules dendritiques de classe 2 (cDC2) ayant migré dans le cœur procèdent à l'exposition à leur surface de certains antigènes, tels que l' α -myosine,

permettant une fois de retour dans les ganglions médiastinaux d'activer les lymphocytes T CD4 spécifiques. Ces derniers, retournent au cœur et peuvent aggraver l'inflammation. Cette réponse des lymphocytes T CD4 antigène spécifique serait donc délétère post-IDM, tandis que les cellules T CD4⁺ naïves ou T Reg initialement recrutées pourront être bénéfiques car limitant l'expansion des monocytes pro-inflammatoires. A l'inverse, d'autres études montrent un rôle essentiel des cellules T pour la cicatrisation cardiaque. En effet, la déplétion des lymphocytes T CD4⁺ augmente le recrutement des monocytes classiques Ly6C^{high} et altère la déposition des fibres de collagène entraînant la mort précoce des souris mâles par rupture cardiaque [147]. D'autre part, notre équipe a récemment démontré que la prévention du recrutement des lymphocytes T CD4⁺ améliore la lymphangiogenèse cardiaque et a un effet bénéfique sur le remodelage cardiaque post-IDM chez des souris femelles, qui sont moins à risque que des souris mâles à la rupture de l'infarctus [142].

Les lymphocytes T régulateurs

Les lymphocytes T Reg Foxp3⁺ sont retrouvés dans les ganglions lymphatiques drainant le cœur. Ces derniers sont en proportion maximale dans les ganglions et dans le cœur 1 semaine après l'IDM. Ils sont reconnus pour être nécessaires au remaniement approprié de la MEC et à la mise en place de l'angiogenèse au cours de la cicatrisation post-IDM. Le rôle des Lymphocytes T Regs a été mis en évidence par la déplétion sélective de T Regs par exemple suite à l'injection d'anticorps anti-CD25. L'absence de Lymphocytes T Regs entraîne une majoration de la dilatation du VG associée à une diminution de la survie post-IDM [197]. La déplétion en Lymphocytes T Regs est également corrélée à une augmentation du nombre de neutrophiles et à l'infiltration des monocytes classiques dans la zone lésée.

Ainsi, les Lymphocytes T Regs limitent l'infiltration des cellules myéloïdes pro-inflammatoires, qui, si elles sont présentes en excès, peuvent avoir un effet néfaste sur le remodelage cardiaque. D'autre part, certaines études démontrent que la déplétion des lymphocytes T Regs aboutit à l'augmentation du nombre de macrophages dans le myocarde [198]. Les lymphocytes T Regs sont également impliqués dans la différenciation des monocytes Ly6C^{high} vers le phénotype M2. En effet, des études chez des souris déplétées en lymphocytes T Regs mettent en évidence une expression significativement plus élevée, dans la population cellulaire de monocytes infiltrant le cœur, des marqueurs caractéristiques des

macrophages M1, tels que iNOS, à 5 jours post-IDM, associée à une régulation négative de l'expression des cytokines anti-inflammatoires caractéristiques des macrophages M2, telles que l'IL-10 et TGF- β .

Les lymphocytes T Regs, de manière générale, sont donc capables de modifier l'environnement au cours de la première semaine post-IDM, via la sécrétion de facteurs paracrines, tels que l'IL-10, l'IL-13 ou le TGF- β , favorisant la différenciation en macrophages M2.

Les lymphocytes T CD8⁺

Les Lymphocytes T CD8⁺ naïves sont retrouvés dans la zone entourant la lésion vers 7 jours post-IDM chez le rat [199]. Ils expriment le récepteur à l'angiotensine (AT) II dont la stimulation *in vitro* entraîne la production d'IL-10, les différenciant des Lymphocytes T cytotoxiques.

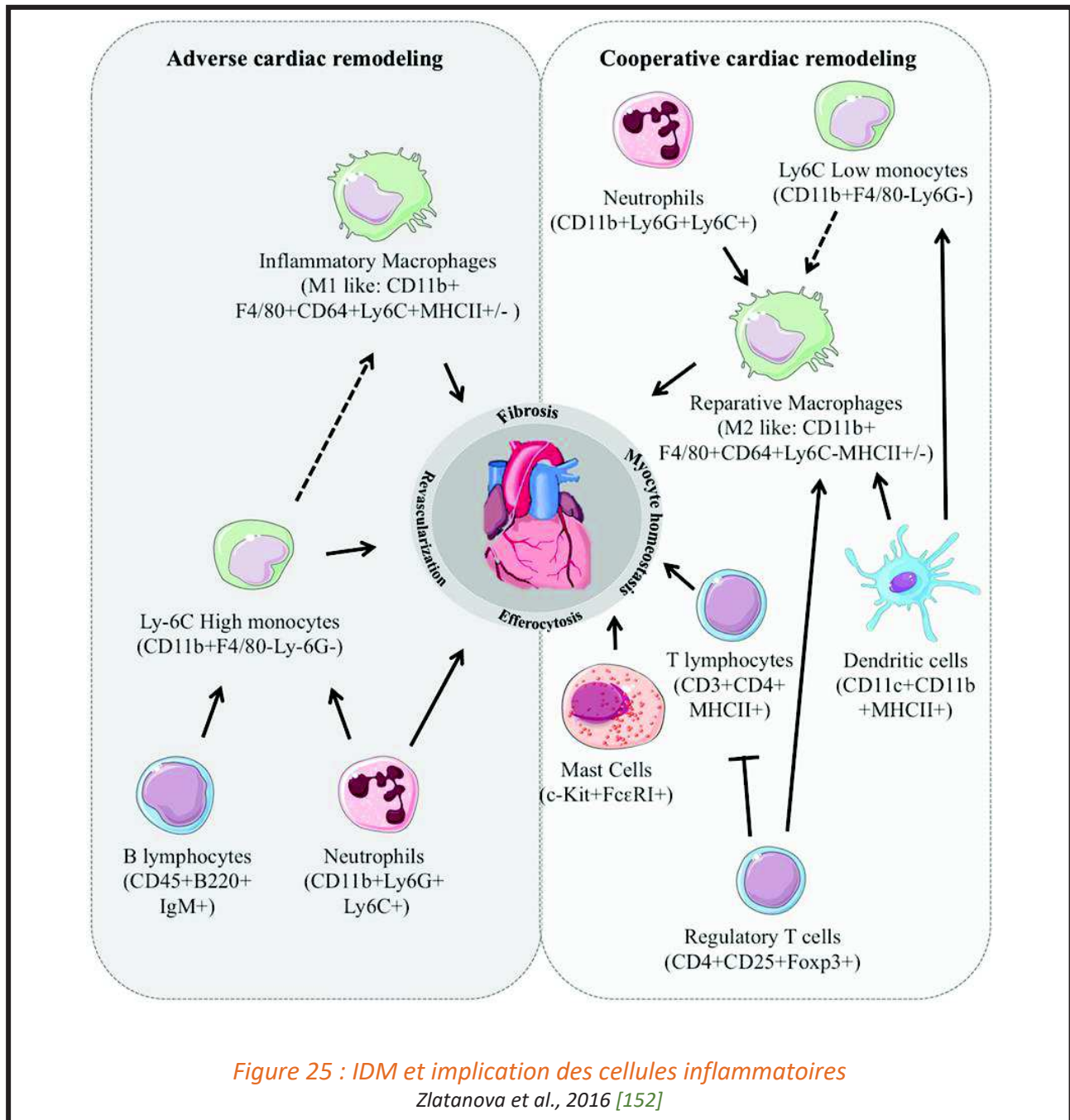
Ces Lymphocytes T CD8⁺ ATIIIR⁺ semblent avoir un effet bénéfique dans la cicatrisation myocardique. En effet, la réinjection chez des souris de Lymphocytes T CD8⁺ ATIIIR⁺, récupérés chez des rats à 7 jours post-IDM, est associée à une moins grande zone d'infarct à 2 semaines post-IDM. D'autre part, la déficience en LT CD8⁺ chez la souris a conduit à une rupture précoce de l'infarctus, liée à une exagération de la réponse innée avec des taux cardiaques plus forts de neutrophiles et macrophages à jour 3 et de mastocytes à jour 7 post-IDM [200]. Pourtant, comme pour les lymphocytes T CD4⁺, notre équipe a démontré que la déplétion en lymphocytes T CD8⁺ améliore la lymphangiogenèse cardiaque post-IDM [142].

- Les Lymphocytes B

L'infiltration dans le myocarde des Lymphocytes B correspondant, en cytométrie en flux, aux cellules B220⁺CD19⁺IgD⁺IgM^{low}, est induite suite à l'IDM [201] (Figure 25). Le rôle de ces cellules B post-IDM a été mis en évidence, dans des modèles murins d'IDM, suite à plusieurs stratégies de déplétion. La stratégie de déplétion avec un anticorps anti-CD20, ciblant les cellules B2 de la zone folliculaire et de la zone marginale, est associée à une diminution de la taille de la zone d'infarctie, une moindre dilatation ventriculaire et donc une amélioration de la fonction systolique ventriculaire gauche à 14 jours post-IDM chez la souris. Une autre stratégie consiste à viser le B cell-activating factor receptor (Baff-R), récepteur d'activation des cellules B, soit via un anticorps anti-Baff-R, soit directement dans un modèle murin de délétion pour le gène codant pour Baff-R. Dans ces deux cas, une amélioration de la fonction ventriculaire gauche post-IDM est observée comparativement aux souris contrôle.

L'absence de cellules B matures est associée à une diminution du taux de chimiokines CCL7 entraînant une infiltration cardiaque moins importante de monocytes classiques Ly6C^{high}, probablement par leur rétention dans la moelle osseuse. Ainsi, l'absence de cellules B matures en phase aiguë de l'IDM, semble conférer une protection contre le remodelage délétère via la diminution du recrutement des monocytes classiques.

Dans ce contexte post-IDM, les monocytes sont mobilisés à partir de la rate et de la moelle osseuse, via la circulation sanguine et vers le myocarde lésé. Les Lymphocytes T et B de l'immunité adaptative, en contrôlant le recrutement et la différenciation des monocytes Ly6C^{high} au niveau cardiaque, contribuent à la mise en place d'une réponse inflammatoire favorable à la cicatrisation appropriée du myocarde.



2.2.3 Déterminants moléculaires de la réponse inflammatoire

Cette partie sera dédiée tout d'abord aux principaux médiateurs pro-inflammatoires qui ont été les cibles des approches thérapeutiques avec l'objectif de limiter l'inflammation cardiaque dans les maladies cardiovasculaires. Puis, brièvement les médiateurs anti-inflammatoires actifs dans le cœur notamment dans la résolution de la phase pro-inflammatoire post-IDM seront présentés.

2.2.3.1 Les cytokines pro-inflammatoires

A l'état physiologique, les cytokines pro-inflammatoires sont peu exprimées dans le tissu cardiaque. La production de cytokines par les différents acteurs cellulaires évoqués précédemment, parmi lesquels les fibroblastes, les leucocytes et les cellules vasculaires, est une réponse intrinsèque physiologique provoquée par différents médiateurs. Pendant la phase aiguë post-IDM, les déclencheurs de la libération de cytokines sont l'hypoxie cellulaire, les ROS, le stress mécanique, et les DAMPs endogènes (provenant de la nécrose cardiomyocytaire et de la fragmentation de la MEC). La libération de cytokines pro-inflammatoires permet d'initier et d'amplifier la réponse inflammatoire post-IDM. De nombreuses cytokines pro-inflammatoires sont libérées dans la phase inflammatoire aiguë, parmi celles-ci les cytokines de la famille des IL-1 (dont l'IL-1 β), le TNF α et l'IL-6 occupent une place importante.

- La famille des IL-1

La famille de IL-1 est composée de 7 molécules (IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33, IL-36 α , IL-36 β et IL-36 γ), de 3 récepteurs, et de la cytokine anti-inflammatoire IL-37 [202]. Ces 7 ligands de type IL-1 présentent de profondes différences en termes d'expression et de régulation. Certains membres de la famille (comme l'IL-1 α) sont présents dans la plupart des cellules saines et sont libérés à la suite d'une blessure, servant de signal de danger. D'autres membres (tels que l'IL-1 β et l'IL-18), synthétisés après stimulation, représentent des précurseurs inactifs.

La libération de l'IL-1 α et l'induction de l'IL-1 β sont systématiquement constatées dans les modèles expérimentaux d'IDM [125, 203]. Les cardiomyocytes nécrotiques libèrent l'IL-1 α , alors que les sous-ensembles de monocytes pro-inflammatoires peuvent être une source majeure d'IL-1 β dans le cœur post-IDM [204].

L'augmentation des taux d'IL-1 circulants chez les patients ayant subi un IDM a été moins régulièrement documentée. Chez les patients post-IDM, les taux d'IL-1 β circulants ont été associés à un dysfonctionnement systolique et à un remodelage défavorable [205].

L'IL-1 β libérée au sein de la zone infarctée participe à la synthèse de médiateurs chimiotactiques stimulant le recrutement leucocytaire. La génération de l'IL-1 β sous sa

forme active, dans le tissu lésé, fait intervenir la caspase 1 et nécessite la mise en place d'une plateforme moléculaire spécialisée : « l'inflammasome ». Au sein de ce complexe, le récepteur NLRP3 joue un rôle important dans la génération de l'IL-1 β active (Figure 26) [206]. Plusieurs études ont tenté d'éclaircir le rôle de l'inflammasome au sein du myocarde infarci. Mezzarona et collaborateurs ainsi que Kawaguchi et collaborateurs ont montré que l'activation de l'inflammasome dans ce contexte est localisée dans les leucocytes, les fibroblastes résidents ainsi que dans les cardiomyocytes bordant la zone ischémisée [127].

L'activation de l'inflammasome joue un rôle essentiel dans la génération de l'IL-1 β bioactive. L'activation de l'inflammasome dans les fibroblastes cardiaques et dans les cardiomyocytes a été largement documentée dans des modèles expérimentaux d'IDM et pourrait contribuer à la réaction pro-inflammatoire [127, 128, 207]. Il existe néanmoins des mécanismes d'activation de l'IL-1 β indépendants de la caspase-1 [202].

Plusieurs autres membres de la famille des IL-1 sont surexprimés dans le cœur infarci. L'IL-18 est régulée à la hausse dans le myocarde infarci [208, 209] avec des taux circulants augmentés chez les patients atteints de syndromes coronariens aigus [210]. L'IL-33, protéine induite biomécaniquement [211], principalement exprimée dans les fibroblastes, est également régulée à la hausse suite à l'IDM.

Le rôle de l'IL-1 dans la régulation des lésions cardiaques, la réparation et le remodelage du cœur post-IDM a été étudié suite à la neutralisation de l'IL-1. Ces études suggèrent que les membres de la famille des IL-1 jouent un rôle important dans ces processus pro-inflammatoires [149, 212, 213]. Les effets des membres de la famille IL-1 peuvent impliquer plusieurs actions distinctes sur divers types de cellules cardiaques.

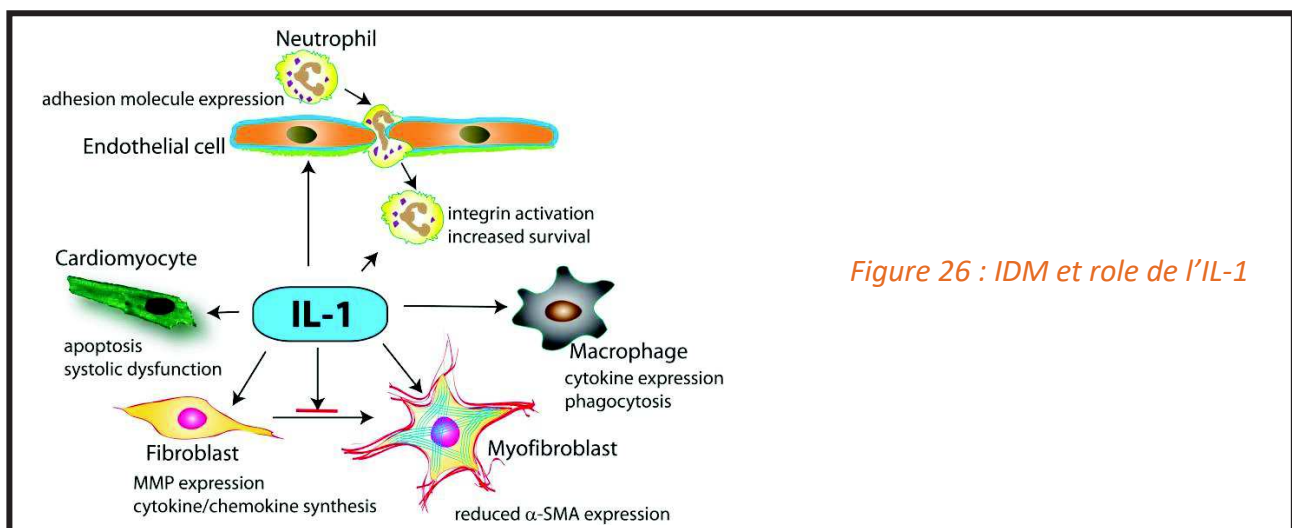


Figure 26 : IDM et rôle de l'IL-1

Considérant ses propriétés pro-inflammatoires, la question de l'implication de l'IL-1 dans l'expansion de la cicatrice suite à l'IDM se pose. En effet, l'IL-1 α , libérée par les cardiomyocytes nécrosés, sert de signal de danger, impliqué dans l'activation de la réponse inflammatoire post-IDM [125]. Il a été suggéré que la libération de l'IL-1 α constitutive et l'induction de l'IL-1 β pourrait étendre la lésion ischémique, augmentant l'apoptose des cardiomyocytes. Il a été démontré *in vitro* que la stimulation de l'IL-1 β active les voies apoptotiques dans les cardiomyocytes néonataux chez le rat [214]. Les effets pro-apoptotiques de l'IL-1 ont été confirmés par des études sur des modèles d'IDM chez le rat et la souris montrant que l'administration de l'antagoniste de l'IL-1, l'IL-1RA recombinant humain (anakinra), diminuait l'apoptose des cardiomyocytes et empêchait la dilatation cardiaque [215]. Notre équipe a démontré que le blocage de l'IL-1 β limite la dysfonction endothéliale et l'expansion de la taille de la zone d'infarctus dans un modèle d'ischémie reperfusion chez le rat [216]. Chez l'Homme, l'étude CANTOS a mis en évidence que le traitement avec le canakinumab, un anticorps monoclonal anti-inflammatoire ciblant la voie d'immunité innée de l'IL-1 β diminue significativement le taux d'événements cardiovasculaires récurrents [1].

Dans les cellules endothéliales, l'IL-1 induit la synthèse de chimiokines et de molécules d'adhésion, renforçant les interactions adhésives impliquées dans le recrutement des leucocytes dans les tissus lésés [217]. L'IL-1 régule également la synthèse des chimiokines dans les cellules mononucléaires et prolonge la durée de vie des neutrophiles [218].

In vivo, la surexpression de l'IL-1RA, antagoniste endogène du récepteur IL-1R1 utilisé par IL-1 α et IL-1 β , a réduit de manière significative l'infiltration du cœur ischémique par les neutrophiles [219]. En revanche, la perte de l'expression du récepteur de l'IL-1R1 a été associée à une réduction marquée du pic d'expression de l'ARNm des cytokines et des chimiokines dans le cœur infarci et à une infiltration atténuée de l'infarctus par les neutrophiles et les monocytes pro-inflammatoires. L'absence de signalisation IL-1 se traduit donc par une inflammation atténuée [204, 220].

L'IL-1 intervient également lors du processus d'activation des fibroblastes cardiaques résidents et sur le métabolisme de la MEC. Pendant la phase inflammatoire de la réparation cardiaque, les fibroblastes activés [221] représentent une source importante de cytokines et de chimiokines.

La libération de l'IL-1 α , l'induction de l'IL-1 β et l'activation en aval de la signalisation de l'IL1R1 stimulent un programme pro-inflammatoire dans les fibroblastes cardiaques [125, 204, 222]. En plus de ses actions pro-inflammatoires, l'IL-1 favorise le phénotype de dégradation de la MEC par les fibroblastes cardiaques, en régulant la synthèse des métalloprotéases matricielles (MMPs) [223, 224]. L'activation de la signalisation de l'IL-1 retarde également la transdifférenciation des myofibroblastes, réduisant l'expression de l'actine α -sma dans les fibroblastes cardiaques. La signalisation de l'IL-1 peut empêcher la conversion prématurée des fibroblastes cardiaques en myofibroblastes synthétiques de la MEC, jusqu'à ce que la plaie soit débarrassée des cellules mortes et des débris de la MEC.

L'IL-1 favorise un remodelage ventriculaire gauche, dilatateur, défavorable du cœur infarcté. Post-IDM, le remodelage ventriculaire gauche entraîne une dilatation de ce dernier ayant des conséquences fonctionnelles défavorables. Les expériences de surexpression de l'IL-1RA ou de perte de fonction ciblant la cascade de signalisation de l'IL-1 ont démontré que la perturbation de l'IL-1 atténue le remodelage dilatateur, observé suite à l'IDM [220, 225]. Ces effets bénéfiques dans le remodelage post-IDM peuvent être médiés par une signalisation pro-inflammatoire moins importante ou la perte d'action directe sur le métabolisme matriciel et la fonction des fibroblastes.

Néanmoins, une dégradation excessive de la MEC réduit la résistance à la traction de la plaie, pouvant priver les cardiomyocytes de la zone bordante des signaux de survie [226, 227].

L'arrêt de la signalisation de l'IL-1 est crucial pour le passage de la phase pro-inflammatoire à la phase de réparation. La réparation cardiaque post-IDM nécessite une répression opportune de la réaction pro-inflammatoire et la résolution de l'infiltrat inflammatoire [145].

La suppression de la réaction inflammatoire n'est pas un processus passif, il nécessite l'activation de signaux STOP qui inhibent la signalisation pro-inflammatoire. Compte tenu des actions pro-inflammatoires intenses de l'IL-1, la suppression et l'arrêt de la signalisation de l'IL-1 sont cruciaux pour le passage de l'inflammation à la réparation. Plusieurs signaux moléculaires peuvent participer à la suppression de la réponse IL-1. Premièrement, l'induction de médiateurs anti-inflammatoires, tels que l'IL-10 [228] et le facteur de croissance TGF- β [229] pourrait entraîner la désactivation des cellules mononucléaires, réduisant ainsi la transcription de l'IL-1. Bien que cette hypothèse soit plausible, il convient de noter que les animaux KO pour l'IL-10, dans un modèle d'IDM, 24 h après reperfusion, présentent des niveaux d'ARNm IL-1 β myocardique comparables à celui des animaux sauvages [230]. Deuxièmement, les médiateurs inhibant l'inflammasome pourraient limiter la génération d'IL-1 β bioactive [231]. Troisièmement, l'activation de régulateurs intracellulaires négatifs, tels que l'IRAK (IL receptor-associated kinase) -M dans les macrophages et les fibroblastes, supprimerait la signalisation pro-inflammatoire du IL-1/TLR [232]. Quatrièmement, la régulation à la hausse des récepteurs leurres (tels que l'IL-1R2) dans les macrophages M2 pourrait mettre fin à la réponse induite par l'IL-1 [204]. Le recrutement de sous-ensembles de monocytes et de lymphocytes ayant des propriétés anti-inflammatoires pourrait également jouer un rôle important dans la suppression de la réponse de l'IL-1 [58, 197, 198].

- Le Tumor Necrosis Factor- α (TNF α)

Le TNF α étudié et nommé par Carwell EA et collaborateur [233], est une protéine de signalisation cellulaire omniprésente. Principalement produite par les macrophages, elle peut également être produite en moindre proportion par de nombreux autres types cellulaires, comme : les DCs, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les cellules endothéliales, et les neurones. De façon intéressante, notons que cette molécule pro-inflammatoire est aussi produite par les cardiomyocytes [234, 235].

Le TNF α est fortement exprimé dans plusieurs contextes pathologiques tels que : la cachexie, le choc septique, les maladies prolifératives ou les maladies auto-immunes comme l'arthrite rhumatoïde, ou la maladie de Crohn.

Le TNF α existe sous deux formes, la forme soluble et la forme liée à la membrane. Sa liaison aux récepteurs TNFR1 et TNFR2 induit des effets divers, impliqués dans la physiologie et la pathologie du cœur. Premièrement, le TNF α possède des effets inotropes négatifs [236], ainsi une production excessive dans le cœur est associée au développement d'une dysfonction contractile [237]. Le TNF α participe à l'induction de changements pathologiques dans le myocarde, tels que : le remodelage ventriculaire, le développement de la fibrose interstitielle ou encore l'apoptose des cardiomyocytes [238, 239]. En effet, la surexpression cardiaque de TNF α chez la souris est associée au développement d'une IC, caractérisée par une hypertrophie, dilatation et dysfonction ventriculaire, ainsi que de la fibrose et perte de la réactivité alpha-adrénergique, l'activation des programmes de gènes fœtaux, et la mort prématurée [240].

Post-IDM, le TNF α produit et sécrété en grande quantité dans la zone infarctée, stimule la synthèse de cytokines pro-inflammatoires par les mastocytes résidents, menant à l'amplification de la réaction inflammatoire.

De façon intéressante, nous pouvons noter que les formes membranaires et solubles des récepteurs de TNF α ont des actions biologiques différentes. En effet, une surexpression de la forme membranaire des TNFRs est associée à une hypertrophie concentrique alors que la surexpression de la forme soluble des TNFRs entraîne une dilatation mal adaptative du cœur [241].

Une surexpression du TNF α (sécrété) entraîne également l'aggravation de l'amincissement de la paroi ventriculaire gauche et la dilatation du VG post-IDM, avec une augmentation de l'apoptose cardiomyocytaire et la perte du facteur Bcl-2, facteur de protection cellulaire, activant différentes voies de signalisation de mort cellulaire [242].

Le TNF α étant impliqué dans le remodelage du ventricule gauche, un déséquilibre entre les enzymes collagénolytiques, MMPs, et leurs inhibiteurs endogènes (Tissue Inhibitors of Matrix metalloProteinases, TIMPs) est observé. En effet, chez les souris transgéniques, sur-exprimant dans le cœur le TNF α , l'augmentation de l'activité globale des MMPs favorise la dilatation du ventricule gauche [243].

Récepteur	Effet	Condition physiopathologique	Référence
TNFR1	Effet toxique (via signalisation par TNFR1)	Phase aiguë IDM	[244]
TNFR2	Effet protecteur (via signalisation par TNFR2)	Phase aiguë IDM	[244]
TNFR2	Augmentation plasmatique de TNF α	IC chronique	[245]
TNFR2	Corrélation positive entre l'expression du gène TNF α et le niveau, la gravité et l'étiologie de l'insuffisance cardiaque	IC	[246]
TNFR2	Surexpression cardiaque de la forme liée à la membrane : hypertrophie ventriculaire et dysfonction ventriculaire		[240]
TNFR2	Surexpression cardiaque de la forme sécrétée : dilatation ventriculaire et dysfonction ventriculaire subséquente		[241]

Tableau 5 : Role du TNF α

Il est bien établi que la stimulation par le TNF α induit une grande diversité de réponses, à mettre en lien avec la divergence des signalisations de ses différents récepteurs. En effet, dans un modèle murin d'IDM, le TNF α induit une réponse toxique via la signalisation par le récepteur TNFR1 et une réponse protectrice via la signalisation par le récepteur TNFR2 (*Tableau 5*).

Les études de Valgimigli et collaborateurs [247] proposent le TNFR1 soluble comme un indicateur pronostique chez les patients en phase aiguë post-IDM et associent les taux d'ARNm et de protéines TNFR1/2 au risque de développement d'IC chez les patients atteints de diabète de type 2.

Le blocage du TNF α est une stratégie thérapeutique d'ores et déjà utilisée dans le contexte des pathologies inflammatoires auto-immunes (maladie de Crohn et polyarthrite

rhumatoïde) mais de telles stratégies n'ont cependant pas fait leurs preuves dans le contexte de l'IDM. En effet, des essais thérapeutiques ciblant le TNF α chez des patients développant une IC post-IDM soit avec un anticorps neutralisant, l'infliximab [248], ou le récepteur soluble recombinant, l'éta nercept [249], n'ont pas démontré les effets bénéfiques escomptés.

- La famille des Interleukines 6

La famille des IL-6 est composée de plusieurs membres, les principaux, l'IL-6, le facteur inhibiteur de la leucémie (Leukemia Inhibitor Factor, LIF) et la cardiotrophine (CT)-1, sont significativement augmentés dans les modèles expérimentaux et chez l'Homme après l'IDM. Ces cytokines interviennent à la fois dans la phase inflammatoire et la phase réparatrice via les voies de signalisation communes impliquant la gp130 [250]. L'activation prolongée de la voie de signalisation gp130/STAT3 est notamment connue pour entraîner une inflammation persistante pouvant aboutir à la rupture cardiaque [251] (Figure 27).

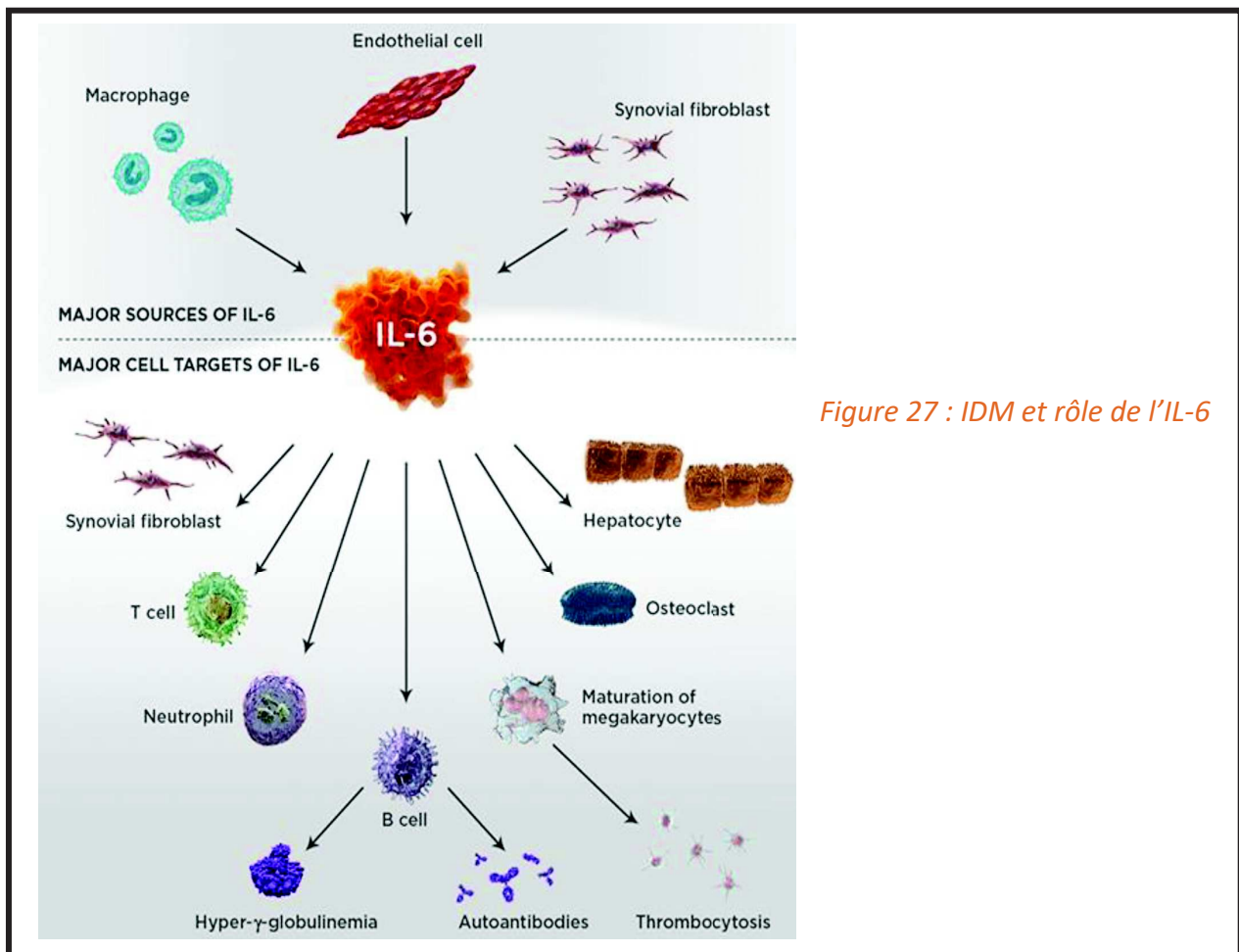


Figure 27 : IDM et rôle de l'IL-6

De manière générale, ces cytokines pro-inflammatoires, produites post-IDM au niveau de la zone lésée ou aux abords de celle-ci contribuent à l'inflammation aiguë cardiaque observée au cours des 3 premiers jours suivant l'ischémie. Elles sont nécessaires à la formation d'une cicatrice et l'induction d'une hypertrophie compensatoire. Néanmoins, une expression élevée prolongée de ces cytokines pro-inflammatoires devient défavorable à la bonne réparation cardiaque post-IDM. Et de nombreuses études insistent sur l'importance de la résolution de cette phase inflammatoire pour passer vers une phase de réparation caractérisée par l'expression de cytokines anti-inflammatoires.

2.2.3.2 Les cytokines anti-inflammatoires

Les cytokines anti-inflammatoires sont secrétées plus tardivement lors de la phase de résolution de l'inflammation. Parmi ces cytokines, l'IL-10, l'IL-4 et le TGF- β sont fortement exprimées dans les tissus lésés.

- IL-10

L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire produite par de nombreuses cellules dont les Lymphocytes T Th2, les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes B ou encore les mastocytes. L'activité biologique de l'IL-10 va dépendre de la cellule productrice et du type cellulaire qui y répond.

L'IL-10 agit par un complexe de récepteur tétramérique composé de deux sous unités protéiques IL-10R1 et deux sous unités IL-10R2. La liaison de l'IL-10 au complexe active la voie de signalisation JAK/STAT, influençant ainsi l'expression génique [252].

L'IL-10 joue son rôle anti-inflammatoire notamment en bloquant la production et sécrétion des cytokines pro-inflammatoires.

Il est également suggéré un rôle antioxydant de l'IL-10 en raison de sa capacité à bloquer la diffusion des ROS et à diminuer la production de NO produit par la iNOS. De même, cette cytokine est impliquée dans la modulation du stress oxydant induit par le TNF α [253].

L'IL-10 est la cytokine anti-inflammatoire la plus étudiée dans le contexte de l'IDM. Elle est produite dans le cœur par les cellules mononuclées, macrophages et lymphocytes T. Dans les modèles d'IDM chez le rat, les taux protéiques et d'ARNm de l'IL-10 cardiaque sont significativement réduits et sont corrélés avec une fonction cardiaque réduite évoluant en IC congestive [254].

L'IL-10 inhibe la production de MMPs libérées par les monocytes activés [255]. Le taux plasmatique d'IL-10 est diminué chez les patients atteints de maladies cardiovasculaires et sont particulièrement faibles chez ceux présentant un IDM ou une IC [256].

Augmentation des taux d'IL-10 et cardioprotection

L'administration de certains composés cardioprotecteurs, permettant une amélioration de la fonction cardiaque associée à une diminution de la taille de l'infarctus dans des modèles d'ischémie-reperfusion, sont corrélés avec une augmentation des taux cardiaques d'IL-10 [257, 258].

Il a également été observé, *in vitro* et *in vivo*, que la cardioprotection conférée par les vésicules extra cellulaires, libérées par les cellules cardiaques, pourrait être liée à la modulation de l'expression et de la sécrétion d'IL-10 [259].

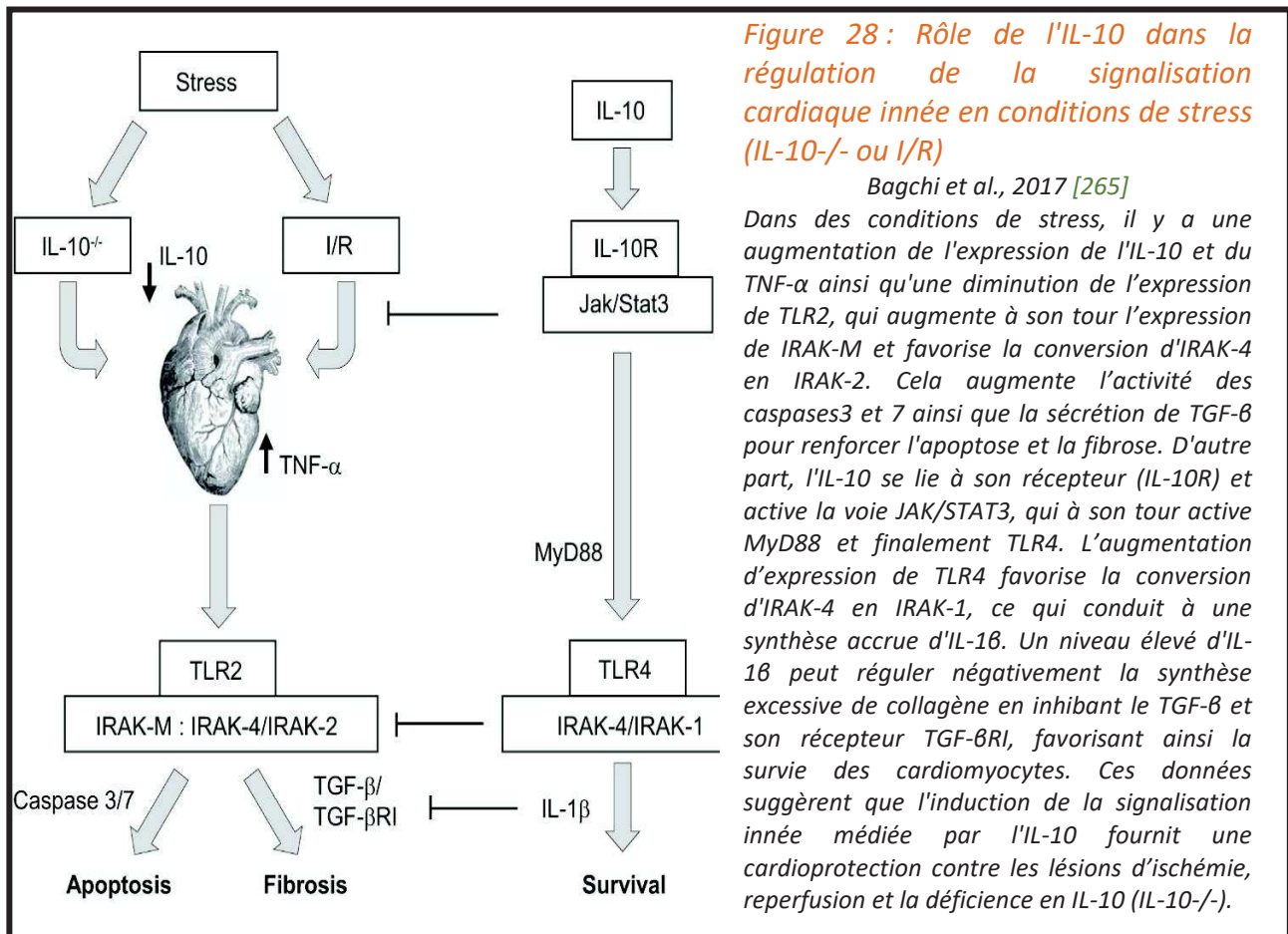
De même, Chen et collaborateurs [260], ont mis en évidence, que la cardioprotection dépendante de la voie Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)5, est associée à des niveaux élevés d'IL-10, dans les modèles d'ischémie du membre inférieur.

Par ailleurs, l'IL-10 est décrit comme un antagoniste fonctionnel du TNF α , qui comme nous l'avons vu précédemment joue un rôle important dans la progression de l'IC. Ainsi, un bon équilibre entre l'IL-10 et le TNF α est crucial pour préserver la fonction cardiaque suite à des lésions cardiaques [254]. La modulation par l'IL-10 de l'apoptose des cardiomyocytes, induite par le TNF α , pourrait être médiée par la Protéine Kinase B (PKB ou AKT) via l'activation de la voie de signalisation Janus Kinase (JAK)1/STAT3 [261] ou les voies p38-Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)/Extracellular signal-Regulated Kinase (ERK) et Nuclear Factor-kappa B (NFkB)/ERK [262, 263].

Les potentiels effets cardioprotecteurs de l'IL-10 pourraient aussi être liés à l'induction d'une signalisation anti-apoptotique impliquant une augmentation de protéines anti-apoptotiques via une suractivation du récepteur TLR4 liée à la protéine MyD88 [264].

Diminution des taux d'IL-10 et dysfonction cardiaque

En revanche, une diminution de l'expression de l'IL-10 conduit à la surexpression des récepteurs TLR2 et IRAK1 et entraîne l'activation des processus apoptotique et fibrotique. Il semble donc que l'IL-10 puisse maintenir la fonction cardiaque en modulant la balance de signalisation TLR2/ TLR4 [265] (*Figure 28*).



- IL-4

L'IL-4 est une cytokine principalement produite par les Lymphocytes T activés et les mastocytes. Au niveau cellulaire, elle participe à l'activation des Lymphocytes T Th0 en Lymphocytes T Th2 dits « T helper » (*Figure 29*).

Les principales fonctions biologiques de l'IL-4 sont : *i*) la régulation de la prolifération cellulaire, *ii*) la régulation de l'expression génique dans de nombreux types cellulaires.

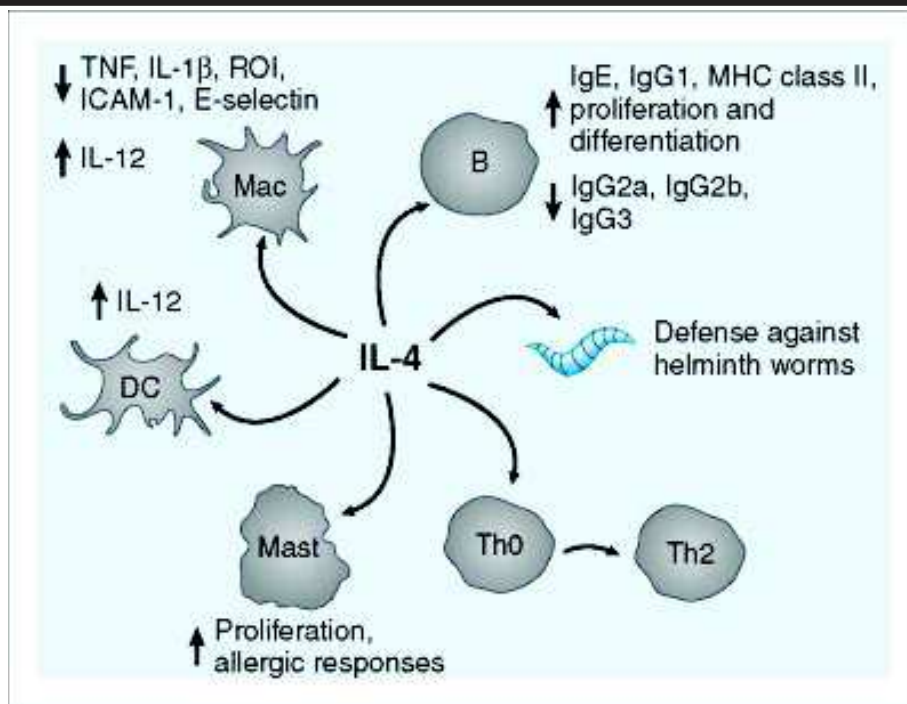


Figure 29 : Fonction de l'IL-4

(The Immune Response Basic and Clinical Principles 2006, Pages 463-516. Chapitre 17 - Cytokines and Cytokine Receptors Author links open overlay panelTak W.MakMary E.Saunders)

Rôle ambivalent de l'IL-4

L'IL-4 possède un rôle ambivalent, tantôt associé aux cytokines anti-inflammatoires [266, 267], tantôt associé à l'entretien de la réponse inflammatoire Th2 [268].

L'IL-4 exerce ses effets par son récepteur de type I, IL-4R α , spécifique de l'IL-4, et son récepteur de type II, IL-13R α 1, reconnaissant à la fois l'IL-4 et l'IL-13 [269].

IL-4 et pathologies cardiovasculaires

Les niveaux plasmatiques d'IL-4 sont élevés chez les patients atteints de maladies coronariennes [270] et post-IDM [271]. D'autre part, l'IL-4 est associé au développement de différentes cardiomyopathies comme la myocardite auto-immune [272], et l'IC [273, 274].

Il a été mis en évidence, dans des études expérimentales, que l'administration d'IL-4 recombinante est bénéfique pour la réparation cardiaque post-IDM par l'activation des macrophages M2, impliqués dans la réparation des tissus lésés notamment post-IDM [275, 276].

- TGF- β

La super famille des TGF- β

Chez l'homme, la superfamille TGF- β est composée de 33 membres, sous-classés en : les TGF- β s (TGF- β 1, - β 2, et - β 3), les Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), les facteurs de différenciation et de croissance (Growth Differentiation Factor, GDF), les activines, les inhibines et finalement l'hormone anti-mullérienne.

Ces cytokines contrôlent une large variété de processus cellulaires, ce sont des régulateurs essentiels de la prolifération, la différenciation, du phénotype et de la fonction des cellules [277]. Elles participent aussi bien aux processus physiologiques qu'à la pathogénèse de nombreuses pathologies.

Ces cytokines exercent leurs fonctions par liaison au récepteur membranaire du TGF- β (TGFR). La liaison du ligand, active une cascade de phosphorylation des protéines Smad permettant leur translocation dans le noyau pour réguler la transcription de gènes cibles [278, 279]. Des actions importantes des membres de la superfamille TGF- β peuvent également être médiées par l'activation de voies dépendantes de Smad (*Figure 30*).

Dans le contexte post-IDM, l'induction et l'activation des voies de signalisation du TGF- β endogène ont été suggérées pour moduler les lésions, réguler l'inflammation et orchestrer la réparation cardiaque [280].

TGF- β dans un myocarde normal

Le TGF- β est exprimé de façon constitutive dans le cœur des mammifères, tant chez l'embryon que chez l'adulte, avec une localisation principalement cardiomyocytaire, ou lié à la MEC [281]. Le TGF- β joue un rôle important dans le développement cardiaque et la perte de ses isoformes chez la souris, en période néonatale, est associée à un développement cardiaque anormal et des défauts de formation valvulaire [282, 283].

Dans le cœur adulte, en condition physiologique, le TGF- β est principalement retrouvé sous forme latente, mais une activité résiduelle est observée pour permettre l'homéostasie cardiaque. En effet, le ciblage, *in vivo*, de Smad 4, effecteur intracellulaire commun des réactions déclenchées par de nombreux membres de la superfamille TGF- β , dans les cardiomyocytes adultes a été associé à une altération de la fonction ventriculaire et à des perturbations de l'expression génétique des canaux ioniques [284].

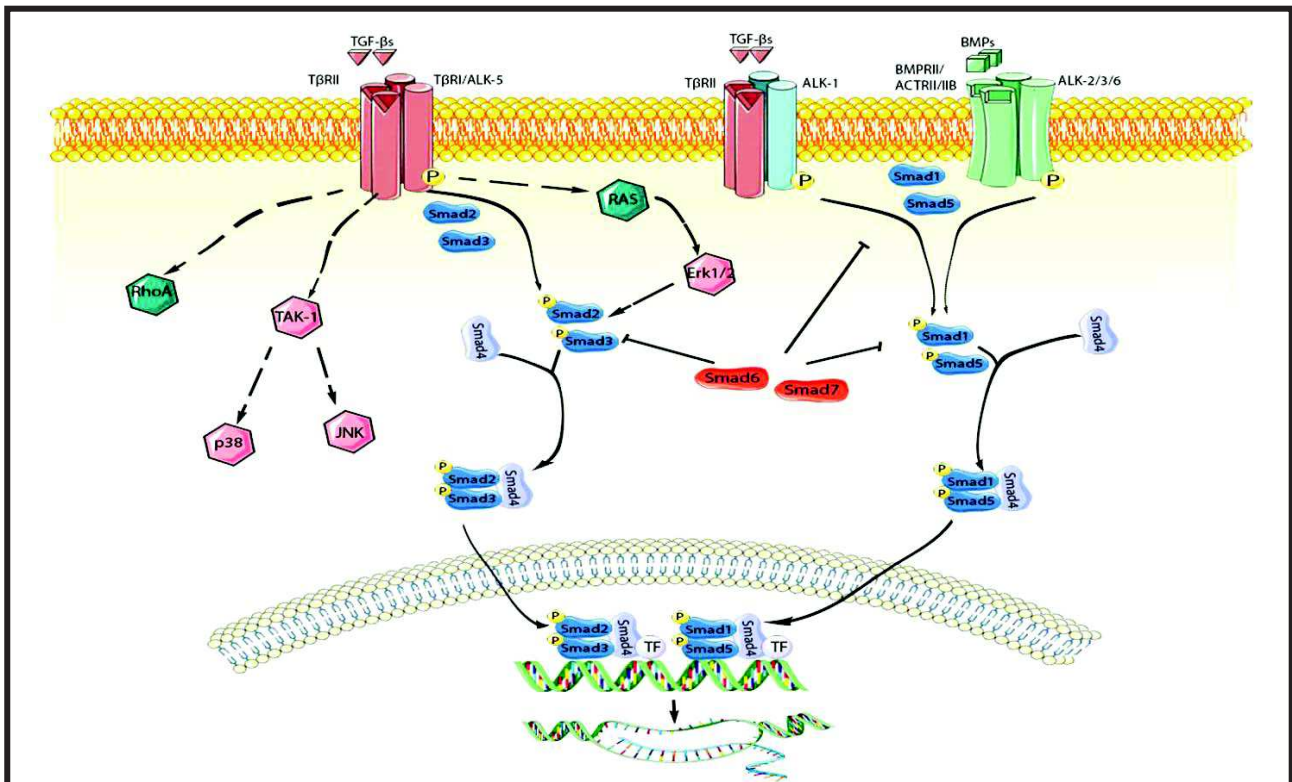


Figure 30 : Les membres de la superfamille TGF- β agissent par l'activation de voies de signalisation dépendantes et indépendantes de Smad

Hanna and Frangogiannis, 2019 [277]

Each member of the TGF- β superfamily signals by binding to distinct combinations of type II, and type I receptors. TGF- β dimers bind T β RII inducing transphosphorylation of the GS segments in the type I receptor (ALK-5). Activated ALK-5 phosphorylates the receptor-activated Smads (R-Smads) Smad2 and Smad3, which then form a heterotrimeric complex with the common Smad, Smad4, promoting the translocation of the Smad complex to the nucleus. Interactions between the Smad and transcriptional activators or repressors regulate transcription of target genes. In some cell types (such as endothelial cells), TGF- β s may act through the type I receptor ALK1, stimulating Smad1/5/8 signaling. BMP dimers on the other hand bind their specific type II receptors, subsequently activating type I receptors (ALK-2,-3,-6) and phosphorylating Smad1/5. Smad1 and Smad5 then bind to Smad4 and translocate to the nucleus regulating transcription. In addition, TGF- β superfamily members signal through non-canonical Smad-independent cascades. The inhibitory Smads (Smad6 and Smad7) negatively regulate TGF- β superfamily cascades.

TGF- β dans un myocarde normal

Le TGF- β est exprimé de façon constitutive dans le cœur des mammifères, tant chez l'embryon que chez l'adulte, avec une localisation principalement cardiomyocytaire, ou lié à la MEC [281]. Le TGF- β joue un rôle important dans le développement cardiaque et la perte de ses isoformes chez la souris, en période néonatale, est associée à un développement cardiaque anormal et des défauts de formation valvulaire [282, 283].

Dans le cœur adulte, en condition physiologique, le TGF- β est principalement retrouvé sous forme latente, mais une activité résiduelle est observée pour permettre l'homéostasie

cardiaque. En effet, le ciblage, *in vivo*, de Smad 4, effecteur intracellulaire commun des réactions déclenchées par de nombreux membres de la superfamille TGF- β , dans les cardiomyocytes adultes a été associé à une altération de la fonction ventriculaire et à des perturbations de l'expression génétique des canaux ioniques [284].

Induction, origine et activation du TGF- β dans le myocarde infarci

La surexpression des TGF- β s est bien documentée, dans de nombreux modèles animaux d'IDM [203, 281, 285-289]. Les différents isoformes du TGF- β semblent répondre de façon spécifique à différents stimuli. Ce point a été soulevé dans un modèle murin d'ischémie-reperfusion, où les taux d'ARNm du TGF- β 1 et 2 sont maximaux entre 6 et 72 heures après la reperfusion alors que le TGF- β 3 présente une expression prolongée augmentant jusqu'à 7 jours après la reperfusion [203]. Cette cinétique d'expression différentielle suggère en effet des profils d'expression liés à des types cellulaires spécifiques.

La plupart des cellules myocardiques sont capables de synthétiser et libérer des quantités importantes de TGF- β s, mais leur contribution relative reste mal définie. Dans un modèle porcin d'occlusion coronaire, les cardiomyocytes représentent la source majeure [285]. D'autres études sur des modèles murin d'IDM suggèrent, cette fois-ci, les macrophages comme les contributeurs clés du TGF- β [290]. En effet, chez les souris, déficientes en CCL2, médiateur crucial dans le recrutement tissulaire des monocytes/macrophages, l'expression de l'ARNm du TGF- β 2 et du TGF- β 3 est fortement réduite après l'IDM. Ceci démontre le rôle important des cellules mononuclées infiltrant le cœur post-IDM dans l'induction de la synthèse du TGF- β [291].

Dans le myocarde post-IDM, les cellules activées permettent la synthèse *de novo* des 3 isoformes de TGF- β . Le TGF- β est sécrété sous forme latente correspondant à l'association du dimère de TGF- β avec la protéine de latence Latency Associated Peptide (LAP) et la protéine de latence du TGF- β (Latent TGF- β Binding Protein, LTBP). LAP confère au TGF- β sa latence [292, 293] et LTBP sert à la séquestration du complexe au sein de la MEC [294].

Les résultats provenant de modèles animaux d'IDM suggèrent une activation rapide du TGF- β dans ce contexte [295] suivi par la stimulation de la voie de signalisation Smad dépendante (28H). Cependant, le signal moléculaire induisant l'activation du TGF- β n'est pas pleinement compris et plusieurs mécanismes semblent être impliqués. Premièrement, les

intégrines de la surface cellulaire pourraient interagir avec LAP, il en résulterait la formation du dimère de TGF- β [296]. Deuxièmement, une grande diversité de protéases sont impliquées dans cette activation post-IDM [297-299]. Troisièmement, les ROS générés rapidement dans les cœurs ischémiques pourraient participer à l'activation du TGF- β . Quatrièmement, les protéines spécialisées de la MEC, telles que la Thrombospondin-1 (TSP-1) [300-302] peuvent jouer un rôle important dans l'activation du TGF- β .

Les actions cellulaires du TGF- β dans l'IDM

Dans le cœur post-IDM, les trois isoformes du TGF- β régulent le phénotype et la fonction de tous les types de cellules impliquées dans les lésions et la réparation cardiaque.

L'IDM est associé à l'induction de plusieurs membres de la superfamille, dont les TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, la BMP-2, BMP-4, BMP-10, le GDF-8, GDF-11 et l'activine A. Ces membres de la famille des TGF- β modulent la survie des cardiomyocytes, les réponses hypertrophiques, régulent de manière critique la fonction des cellules immunitaires, activent les fibroblastes et stimulent un programme de préservation de la MEC. Il a été suggéré que les membres de la sous-famille des BMP exercent à la fois des actions pro-inflammatoires et anti-inflammatoires et peuvent également réguler la fibrose. De façon similaire, les membres de la sous-famille des GDF peuvent aussi moduler la survie et l'hypertrophie des cardiomyocytes et réguler l'inflammation (*Figure 31*).

Bien que le rôle essentiel des cascades de signalisation du TGF- β dans la réparation, le remodelage, la fibrose et la régénération cardiaques, place les membres de la famille du TGF- β comme des cibles thérapeutiques intéressantes pour les patients ayant subi un IDM, leurs actions pléiotropiques, spécifiques aux cellules et dépendantes du contexte posent des défis dans la mise en place d'une stratégie thérapeutique efficace.

Dans le cadre de ce projet de recherche, la caractéristique commune que partagent ces 3 types de cytokines anti-inflammatoires, l'IL-10, l'IL-4 et les TGF- β , est leur capacité à favoriser la polarisation des monocytes/macrophages vers le phénotype macrophage M2 pour promouvoir les processus angiogéniques, lymphangiogéniques et une meilleure réparation cardiaque post-IDM.

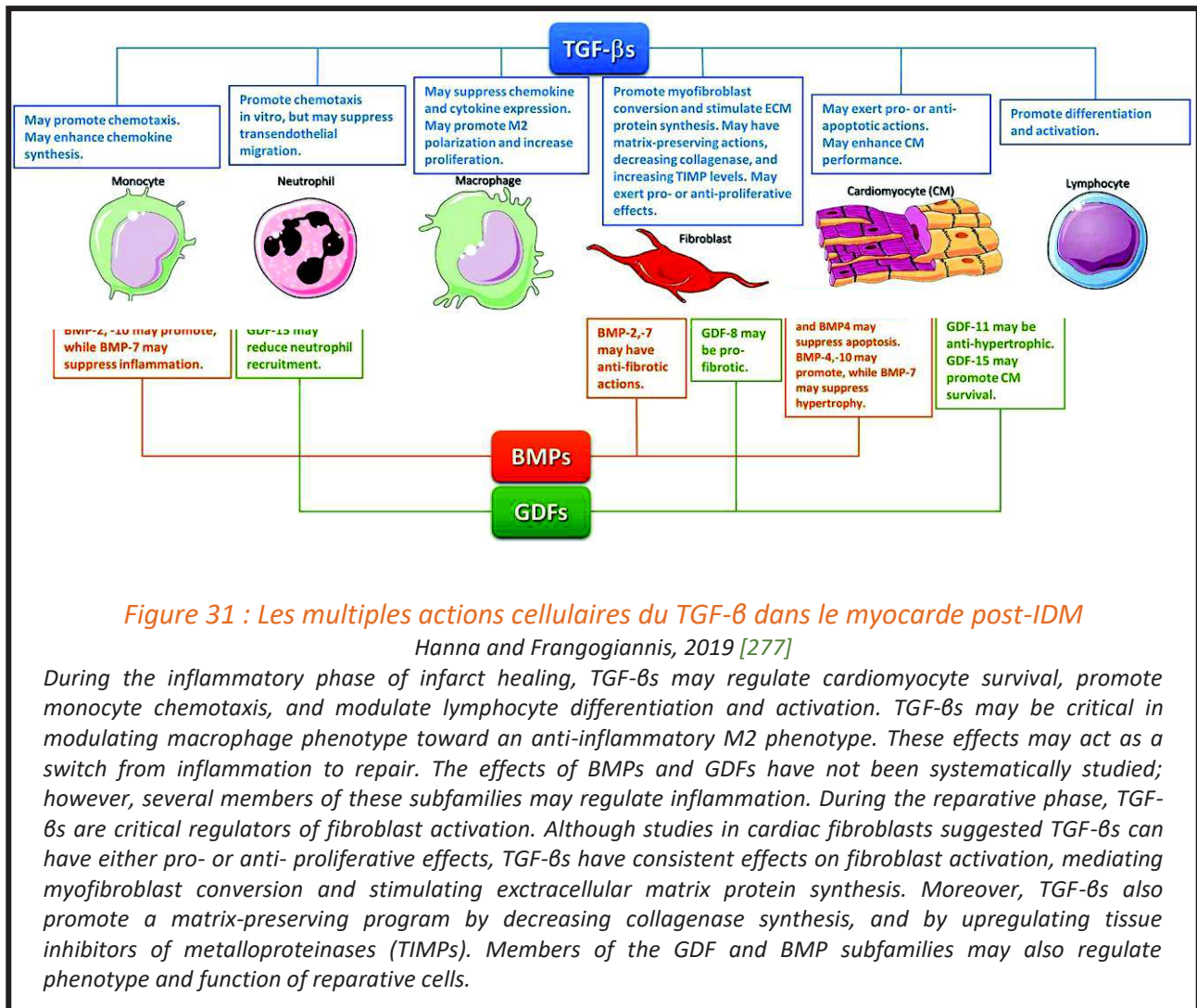


Figure 31 : Les multiples actions cellulaires du TGF-β dans le myocarde post-IDM

Hanna and Frangogiannis, 2019 [277]

During the inflammatory phase of infarct healing, TGF-βs may regulate cardiomyocyte survival, promote monocyte chemotaxis, and modulate lymphocyte differentiation and activation. TGF-βs may be critical in modulating macrophage phenotype toward an anti-inflammatory M2 phenotype. These effects may act as a switch from inflammation to repair. The effects of BMPs and GDFs have not been systematically studied; however, several members of these subfamilies may regulate inflammation. During the reparative phase, TGF-βs are critical regulators of fibroblast activation. Although studies in cardiac fibroblasts suggested TGF-βs can have either pro- or anti- proliferative effects, TGF-βs have consistent effects on fibroblast activation, mediating myofibroblast conversion and stimulating extracellular matrix protein synthesis. Moreover, TGF-βs also promote a matrix-preserving program by decreasing collagenase synthesis, and by upregulating tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). Members of the GDF and BMP subfamilies may also regulate phenotype and function of reparative cells.

2.2.3.3 Les chimiokines

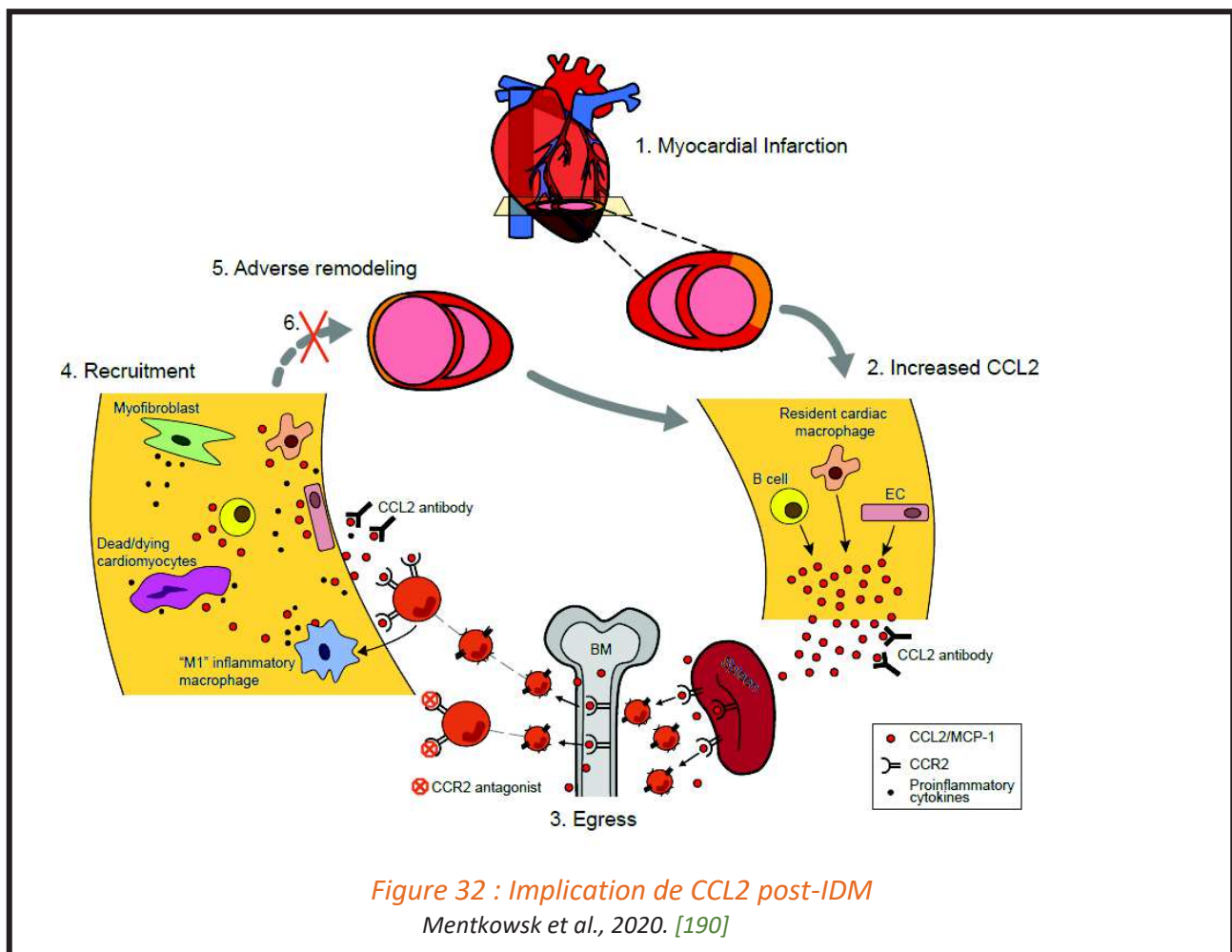
Les chimiokines sont de petites protéines impliquées dans le recrutement de différentes cellules par chimiotactisme [303]. Ces chimiokines médient notamment le recrutement cardiaque post-IDM des cellules immunitaires, qui expriment les récepteurs aux chimiokines. Les chimiokines sont classées en 4 sous familles, les chimiokines à motifs CC, CXC, CX3C ou XC, sur la base du nombre d'acides aminés présents entre les deux résidus clé cystéines [79]. L'action de ces chimiokines se fait via des récepteurs à sept segments transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG). Cette classification met en avant des différences fonctionnelles entre les sous types de chimiokines. En effet, les chimiokines CC

attirent principalement les monocytes, les chimiokines CXC à motif ELR (glutamate-leucine-arginine) attirent les neutrophiles, et les chimiokines CXC non-ELR recrutent les lymphocytes.

De nombreuses chimiokines sont libérées dans la zone lésée post-IDM et à proximité dans le but de maintenir une réponse inflammatoire bien orchestrée.

Les premières chimiokines exprimées au niveau cardiaque après l'ischémie sont CXCL8, CXCL1, CXCL2, CXCL6, CCL3 et CCL5. L'action conjointe de toutes ces chimiokines permet le recrutement rapide des neutrophiles, dès les premières 24h suivant l'ischémie. Leur blocage permet de réduire remarquablement la taille d'infarctus.

Ensuite, les chimiokines CCL2 et CX3CL1 contrôleront respectivement le recrutement cardiaque des monocytes classiques (en phase inflammatoire) et non classiques (en phase de prolifération). Il est intéressant de noter que l'utilisation d'un anticorps neutralisant CCL2 a des effets délétères post-IDM et retarde la cicatrisation de la zone lésée (*Figure 32*).



Enfin, la phase de prolifération est marquée par une expression accrue de la chimiokine CXCL10. Cette chimiokine aux effets angiostatiques, limite l'angiogenèse au niveau de la zone infarctée, permettant aux macrophages de phagocyter les débris cellulaires et favoriser la formation du collagène cicatriciel. De même, suite à la lésion ischémique, la chimiokine CXCL12 est impliquée dans de nombreuses actions. Elle participe au processus d'angiogenèse, au recrutement de progéniteurs cellulaires et de cellules inflammatoires et à la régulation de la survie des cardiomyocytes [304, 305].

L'action chimiotactique de ces différentes chimiokines dépend de leur immobilisation sur les glycosaminoglycanes présents à la surface des cellules endothéliales ou au sein de la MEC.

2.2.3.4 Les cytokines sont-elles de bonnes cibles thérapeutiques ?

Pour répondre à cette question, plusieurs éléments sont à prendre en considération. Premièrement, les cytokines exercent généralement, comme illustré précédemment, des effets variés, dépendant de l'environnement tissulaire, de la cellule sécrétrice et de la cellule cible. De nombreuses études ont mises en évidence l'action pléiotropique de beaucoup de cytokines rendant difficile la translation thérapeutique [108]. Deuxièmement, dans le contexte précis de l'IDM, ou l'exacerbation du profil pro-inflammatoire induit un remodelage cardiaque défavorable, il serait attrayant d'envisager une thérapie anti-inflammatoire visant à désengrener cette boucle pro-inflammatoire. Malheureusement, la mise en place d'une telle stratégie pourrait s'avérer néfaste, puisque les cytokines pro-inflammatoires restent absolument nécessaires à la mise en place de réponse inflammatoire précoce permettant d'éliminer les cardiomyocytes morts et les débris cellulaires. Troisièmement, la communication entre les différentes cytokines et acteurs cellulaires présents tend à souligner l'intérêt d'une stratégie thérapeutique à cibles multiples.

Finalement, une telle stratégie est envisageable et prometteuse uniquement dans un environnement bien connu et contrôlé (connaissance des acteurs cellulaires et moléculaires présents dans le micro-environnement concerné) tel qu'une zone articulaire.

Néanmoins, ces cytokines peuvent servir d'outils, permettant d'influencer le devenir d'autres cellules. En effet, dans le cadre de ce projet de recherche, les cytokines permettent d'influencer la polarisation des monocytes en faveur du phénotype de macrophages M2, dans le but d'obtenir une meilleure réparation cardiaque post-IDM.

2.2.4 Importance de la cinétique de recrutement des monocytes macrophages post-IDM

Comme décrit au début de ce chapitre, la réparation cardiaque post-IDM résulte d'une série d'événements complexes et finement orchestrés, initiés par une intense inflammation et une infiltration de cellules immunitaires qui servent à digérer et à éliminer les cellules endommagées et le tissu de la MEC, suivie d'une phase réparatrice avec résolution de l'inflammation, prolifération des myofibroblastes, formation de cicatrices et angiogenèse (*Figure 16, 33 et 34*).

Il est important de souligner que cette cinétique associée est un paramètre crucial pour permettre une bonne réparation cardiaque. Toute perturbation de cette cinétique aboutit à des modifications délétères de la structure du ventricule gauche, avec des retentissements sur la fonction cardiaque.

2.2.5 Résolution de l'inflammation et cicatrisation

Comme évoqué précédemment, suite à l'IDM, une série d'évènements moléculaires et cellulaires est déclenchée pour préserver le reste du myocarde et remplacer les cardiomyocytes nécrosés. Les cardiomyocytes ayant perdu leur capacité proliférative après la naissance [306], le remplacement de la zone nécrosée par du tissu fibrotique reste la seule alternative.

La mise en place de cette « cicatrice » fibrotique est nécessaire au maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle du cœur, permettant d'éviter la rupture de sa paroi et de maintenir sa fonction contractile.

Néanmoins, en condition inflammatoire persistante, le processus de cicatrisation peut devenir excessif et délétère, favorisant le remodelage du cœur pouvant conduire à l'IC.

2.2.5.1 *Résolution de l'inflammation : transition de la phase inflammatoire à la cicatrisation*

La bonne réussite de la transition de la phase initiale pro-inflammatoire vers la phase réparatrice anti-inflammatoire est la condition *sine qua none* pour permettre la formation d'une cicatrice stable prévenant la rupture cardiaque.

Des interactions complexes entre différents acteurs cardiaques (dont cardiomyocytes, cellules endothéliales, fibroblastes et interstitium) et les composants du système immunitaire (neutrophiles, monocytes, macrophages, cellules dendritiques et lymphocytes) régulent cette transition. La transition vers la phase de résolution est favorisée par la libération de cytokines anti-inflammatoires dans le tissu mais aussi par la diminution de la libération de cytokines pro-inflammatoires. En effet, l'étude de Prabhu *et al.*, en 2004 [135] et Ong *et al.*, en 2018 [137] insiste sur l'importance de la diminution de l'IL-6 permettant de réduire l'inflammation. Parmi les autres acteurs moléculaires, d'ores et déjà évoqués, le TGF- β représente un lien moléculaire essentiel entre la phase d'inflammation et celle de granulation/cicatrisation [204] au cours de laquelle le tissu nécrosé est progressivement remplacé par du tissu cicatriciel.

Une quelconque perturbation soit de l'équilibre ou de la transition entre la phase pro-inflammatoire et la phase réparatrice peut exacerber l'inflammation locale et systémique entraînant une cicatrisation excessive et le remodelage ventriculaire post-IDM.

2.2.5.2 *Cicatrisation physiologique de la lésion post-IDM : rôle des principaux acteurs cellulaires*

Au cours de la phase de cicatrisation, les fibroblastes deviennent les cellules majoritaires de la zone nécrosée et adoptent un phénotype myofibroblastique : phénotype sécrétoire (sécrétion de MEC [307]) ou prolifératif [308]. Le dépôt de collagène de type III augmente la résistance de la paroi ventriculaire protégeant de la rupture [308]. La formation de nouveaux vaisseaux sanguins par les cellules endothéliales permet d'assurer un apport suffisant en oxygène et en nutriments aux myofibroblastes. D'autre part, l'hypertrophie des

cardiomyocytes, dans la zone bordante et aussi des zones distantes (remote), est mise en place pour compenser la baisse de contractilité [309].

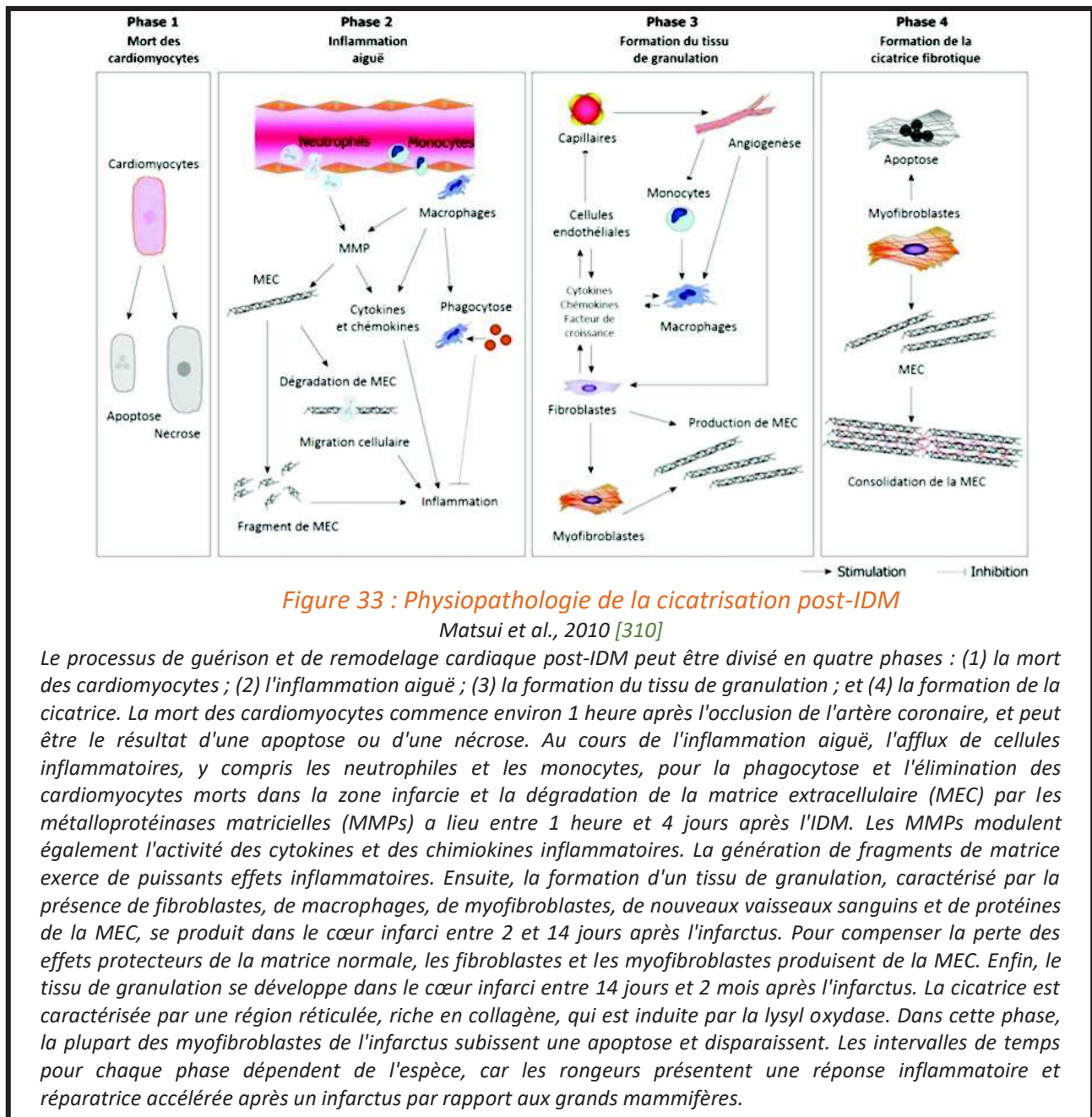


Figure 33 : Physiopathologie de la cicatrisation post-IDM

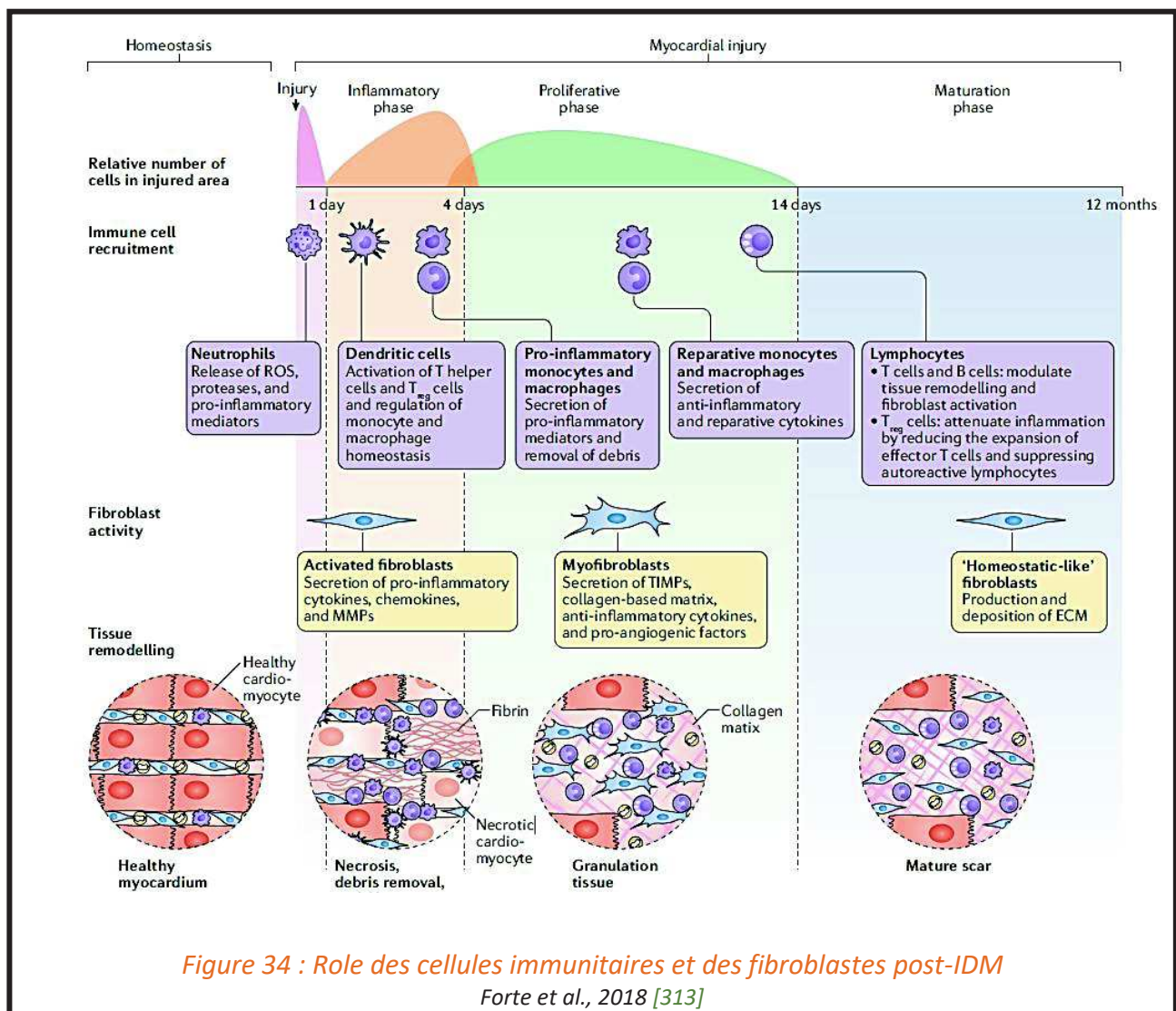
Matsui et al., 2010 [310]

Le processus de guérison et de remodelage cardiaque post-IDM peut être divisé en quatre phases : (1) la mort des cardiomyocytes ; (2) l'inflammation aiguë ; (3) la formation du tissu de granulation ; et (4) la formation de la cicatrice. La mort des cardiomyocytes commence environ 1 heure après l'occlusion de l'artère coronaire, et peut être le résultat d'une apoptose ou d'une nécrose. Au cours de l'inflammation aiguë, l'afflux de cellules inflammatoires, y compris les neutrophiles et les monocytes, pour la phagocytose et l'élimination des cardiomyocytes morts dans la zone infarctée et la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) par les métalloprotéinases matricielles (MMPs) a lieu entre 1 heure et 4 jours après l'IDM. Les MMPs modulent également l'activité des cytokines et des chimiokines inflammatoires. La génération de fragments de matrice exerce de puissants effets inflammatoires. Ensuite, la formation d'un tissu de granulation, caractérisé par la présence de fibroblastes, de macrophages, de myofibroblastes, de nouveaux vaisseaux sanguins et de protéines de la MEC, se produit dans le cœur infarcté entre 2 et 14 jours après l'infarctus. Pour compenser la perte des effets protecteurs de la matrice normale, les fibroblastes et les myofibroblastes produisent de la MEC. Enfin, le tissu de granulation se développe dans le cœur infarcté entre 14 jours et 2 mois après l'infarctus. La cicatrice est caractérisée par une région réticulée, riche en collagène, qui est induite par la lysyl oxydase. Dans cette phase, la plupart des myofibroblastes de l'infarctus subissent une apoptose et disparaissent. Les intervalles de temps pour chaque phase dépendent de l'espèce, car les rongeurs présentent une réponse inflammatoire et réparatrice accélérée après un infarctus par rapport aux grands mammifères.

2.2.5.3 Dernière phase de réparation : Maturation du collagène et implication des myofibroblastes

La maturation du collagène caractérise la dernière phase de la réparation. Cette maturation consiste au remplacement du collagène de type III par du collagène de type I [311], mais également une augmentation de la réticulation des molécules de collagène et

élastines. Ce processus met en jeu les Lysyles Oxydases (LOX) [312], exprimés par les myofibroblastes résiduels. L'expression de ces enzymes est augmentée entre le 3^{ème} et le 7^{ème} jours post-IDM dans la zone bordant la lésion [311] (Figure 34). La maturation des fibres de collagène permet d'obtenir un tissu cicatriciel plus résistant au stress mécanique et plus élastique [308].



Le deuxième élément qui caractérise généralement la dernière phase de réparation tissulaire suite à une lésion est la mort des myofibroblastes. Le cœur est un environnement singulier constamment exposé au stress mécanique dû aux contractions cardiaques. Contrairement aux autres organes, comme la peau, les myofibroblastes cardiaques peuvent survivre après la cicatrisation et persister des décennies après l'IDM [307]. Les

myofibroblastes sont requis pour maintenir la MEC qui est constamment exposée au stress mécanique engendré par la contraction cardiaque [314].

Les myofibroblastes jouent donc un rôle primordial dans le processus de cicatrisation à travers la sécrétion de la MEC [307]. L'activité des myofibroblastes est soutenue par l'activité des cellules endothéliales, formant de nouveaux vaisseaux sanguins permettant un apport suffisant en oxygène et nutriments [309].

2.3 Remodelage et régénération cardiaque

2.3.1 Remodelage cardiaque délétère post-IDM

En réponse aux signaux mécaniques, biochimiques et moléculaires, le cœur peut changer de taille et de forme. On parle alors de remodelage cardiaque dont l'ampleur dépend de l'étendue des dommages et de leurs localisations. L'hypertrophie des cardiomyocytes de la zone bordante et des zones non-lésées permet initialement de compenser la baisse de contractilité [309]. Comme cette hypertrophie est associée non pas à une réponse angiogénique adéquate, mais plutôt à une raréfaction capillaire, cette augmentation de la masse cardiaque perd vite son aspect compensateur et devient rapidement l'hypertrophie mal adaptative ou pathologique liée à une aggravation de la dysfonction cardiaque.

Suite à l'IDM, on estime que le remodelage cardiaque se développe chez 30% des patients [107].

Le tissu cicatriciel de l'infarctus est non contractile et entraîne une augmentation du stress subit par la paroi, induisant : *i)* l'hypertrophie des cardiomyocytes dans la zone frontière, *ii)* l'altération de la structure du cytosquelette des cardiomyocytes, *iii)* l'amincissement et la rigidité de la paroi, et *iv)* la dilatation de la chambre du ventricule gauche.

Ces modifications vont conduire à une augmentation anormale de la taille du cœur, se traduisant par l'augmentation des volumes télédiastoliques et télésystoliques et à la diminution de la fraction d'éjection [315].

2.3.2 Remodelage cardiaque et modification de la morphologie du cœur

La taille de la zone infarctée est l'un des facteurs principaux qui détermine la sévérité du remodelage et l'altération consécutive de la fonction systolique [316] (Figure 35).

Ce remodelage entraîne donc une modification de morphologie du cœur, qui évolue de sa forme elliptique caractéristique vers une forme plus sphérique [317]. Cette modification morphologique est associée à un risque élevé d'IC.

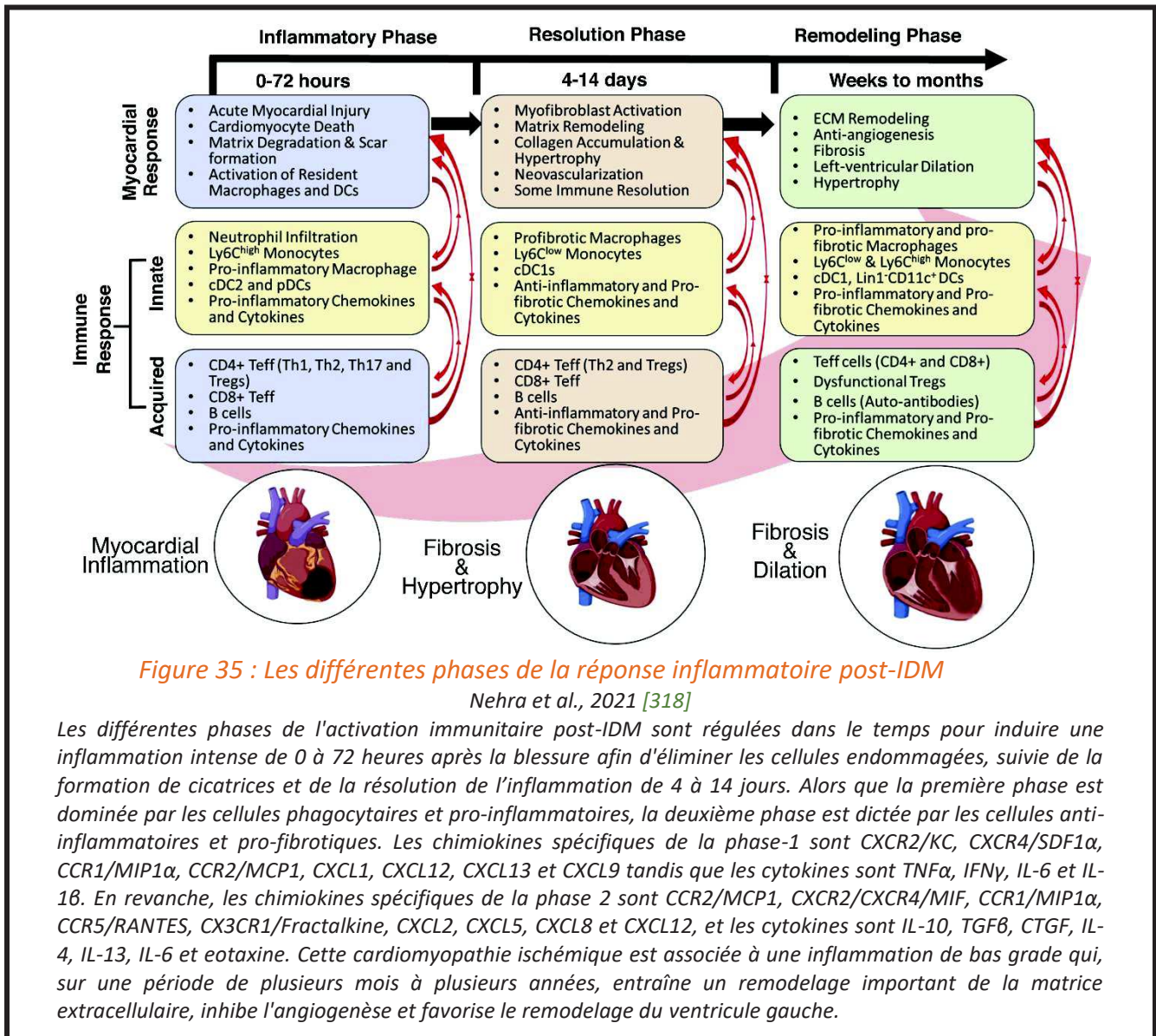


Figure 35 : Les différentes phases de la réponse inflammatoire post-IDM

Nehra et al., 2021 [318]

Les différentes phases de l'activation immunitaire post-IDM sont régulées dans le temps pour induire une inflammation intense de 0 à 72 heures après la blessure afin d'éliminer les cellules endommagées, suivie de la formation de cicatrices et de la résolution de l'inflammation de 4 à 14 jours. Alors que la première phase est dominée par les cellules phagocytaires et pro-inflammatoires, la deuxième phase est dictée par les cellules anti-inflammatoires et pro-fibrotiques. Les chimiokines spécifiques de la phase-1 sont CXCR2/KC, CXCR4/SDF1 α , CCR1/MIP1 α , CCR2/MCP1, CXCL1, CXCL12, CXCL13 et CXCL9 tandis que les cytokines sont TNF α , IFN γ , IL-6 et IL-18. En revanche, les chimiokines spécifiques de la phase 2 sont CCR2/MCP1, CXCR2/CXCR4/MIF, CCR1/MIP1 α , CCR5/RANTES, CX3CR1/Fractalkine, CXCL2, CXCL5, CXCL8 et CXCL12, et les cytokines sont IL-10, TGF β , CTGF, IL-4, IL-13, IL-6 et eotaxine. Cette cardiomyopathie ischémique est associée à une inflammation de bas grade qui, sur une période de plusieurs mois à plusieurs années, entraîne un remodelage important de la matrice extracellulaire, inhibe l'angiogenèse et favorise le remodelage du ventricule gauche.

2.3.3 Remodelage cardiaque, fibrose et hypertrophie des cardiomyocytes

Le remodelage cardiaque, s'accompagne également d'un dépôt excessif de MEC. On parle alors de fibrose cardiaque interstitielle ou périvasculaire [308].

L'hypertrophie des cardiomyocytes, en réponse à l'augmentation de la tension mécanique du myocarde et à la baisse de contractilité [308] se traduit par un épaissement de la paroi ventriculaire, qui combiné à la fibrose, entraîne la rigidité du tissu cardiaque, altérant d'abord la fonction diastolique du cœur.

La fibrose est également corrélée avec la survenue de troubles du rythme [297], d'arythmies et d'arrêts cardiaques post-IDM [319]. La fibrose cardiaque demeure, parallèlement à l'inflammation cardiaque, une des cibles thérapeutiques majeures pour mieux prévenir le développement de l'IC qu'elle soit de type de fraction d'éjection réduite ou préservée [320].

2.4 Cibler les populations de monocytes/macrophages : potentiel thérapeutique pour une meilleure réparation cardiaque

2.4.1 Echec des thérapies anti-inflammatoires et pro-angiogéniques

Les complications survenant post-IDM associent inflammation persistante et raréfaction vasculaire.

2.4.1.1 Intérêts de l'angiogenèse thérapeutique

Malgré les traitements médicamenteux ou chirurgicaux, un grand nombre de patients atteints d'IC se retrouvent dans une impasse thérapeutique.

Une collatéralisation importante chez les patients atteints d'une maladie coronarienne est bénéfique chez les patients atteints d'IC avec un risque de mortalité diminué de 36% par rapport à ceux ayant une faible collatéralisation [321]. De plus, un réseau collatéral bien développé est associé à une taille réduite de la zone lésée suite à un IDM [322], mais également à un moindre risque d'événements cardiovasculaires [323] et à une baisse de la mortalité par cause cardiovasculaire [324]. A l'inverse, une dysfonction ou une raréfaction microvasculaire au niveau cardiaque empêche une reperfusion efficace du cœur [325] menant à la mort des cardiomyocytes et à la dilatation du ventricule gauche entraînant alors l'IC [326].

Selon cette logique, les études sur l'angiogenèse thérapeutique, ayant pour but de stimuler le développement de vaisseaux collatéraux, se sont développées. Trois types d'approches sont principalement étudiés : la thérapie basée sur des facteurs de croissance sous forme de protéines recombinantes, la thérapie génique et la thérapie cellulaire. Malheureusement, à ce jour, aucune de ces stratégies n'ont démontré clairement leur efficacité dans des essais thérapeutiques chez l'Homme. Une autre piste récente sera la thérapie pro-lymphangiogénique qui permettra de limiter l'intensité et la durée de la réponse pro-inflammatoire post-IDM par une évacuation plus efficace de cellules immunitaires via les vaisseaux lymphatiques du cœur [141, 142].

2.4.1.2 Intérêts des thérapies anti-inflammatoires

Considérant les effets délétères d'un mécanisme inflammatoire exacerbé, sur la fonction cardiaque, entraînant une réaction inflammatoire persistante dans la zone infarctée, de nombreuses stratégies thérapeutiques ciblant différents médiateurs de l'inflammation, se sont développées. Malheureusement, les effets pléiotropiques de ces acteurs moléculaires rendent la translation thérapeutique compliquée et ont conduit à l'échec de nombreuses études cliniques. Bien que ces stratégies thérapeutiques, comme les anti-TNA- α , soient d'ores et déjà utilisées en clinique pour les pathologies auto-immunes (polyarthrite rhumatoïde ou maladie de Crohn), l'apport constant, *via* la circulation sanguine, de nouveaux médiateurs cellulaires ou moléculaires sur le site lésé dans le cadre de l'IDM met en péril l'efficacité de ces stratégies. L'exception de ces échecs est la révélation récente de l'effet prometteur du blocage de l'IL-1 β avec le Canakinumab, l'Anakinra, ou encore le Gevokizumab [1], [216]. Pourtant, il faut noter que les patients démontraient un risque accru de maladies infectieuses, démontrant le danger potentiel de cibler des molécules ubiquitaires et essentielles pour la régulation de la réponse immunitaire.

2.4.2 Intérêt de moduler le phénotype des cellules inflammatoires : promouvoir la résolution de l'inflammation par thérapie cellulaire utilisant les macrophages

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous proposons de tirer avantage de la capacité inhérente des macrophages M2 à favoriser les processus angiogéniques,

lymphangiogéniques et immuno-régulateurs. En effet, comme décrit précédemment, les macrophages M2 participent à la résolution de l'inflammation et promeuvent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et lymphatiques. Ils représentent donc une cible intéressante afin de promouvoir une cicatrisation et réparation cardiaque plus efficace chez des patients âgés ou atteints de plusieurs facteurs de risque associés à des défauts de réparation tissulaire.

Chapitre 3 : Mécanismes épigénétiques de régulation de la fonction et de la polarisation des macrophages

1 Généralités

1.1 Définition et concept d'épigénétique

Le terme épigénétique a été inventé par le généticien et embryologiste Conrad Waddington en 1942. Ce néologisme combinant « epigenesis » (développement embryonnaire) et « genetics », fut suggéré pour nommer la discipline qui étudie l'interaction entre les gènes et leur environnement étant à l'origine d'un phénotype particulier. En effet, avant Waddington, l'embryologie et la génétique étaient deux disciplines complètement distinctes, empêchant à la fois les embryologistes d'expliquer les similarités observées entre les parents et la descendance et les généticiens d'expliquer le développement de phénotypes particuliers. Waddington abroge donc la distinction entre l'embryologie et la génétique et définit l'épigénétique comme étant « the branch of biology which studies the causal interactions between genes and their products which bring the phenotypes into being » [327]. Ce concept s'est ensuite étendu pour expliquer les différences observées entre le génotype et le phénotype d'un individu. Waddington définit alors l'épigénotype comme étant « the set of organizers and organizing » impliqués dans la création d'un phénotype particulier au cours du développement. Le préfixe « épi » reflète l'implication de cet ensemble d'éléments « organisateurs » sur et autour du gène.

Cet épigénotype n'est donc pas strictement déterminé par le génotype mais est également le résultat de l'action de l'environnement et est donc sujet à certaines variations. Ainsi, un unique génotype peut être associé à plusieurs épigénotypes et aboutir à différents phénotypes (plasticité phénotypique). Ce qui explique aussi la diversité cellulaire à partir du même génome. C'est la manière dont le génome est interprété qui crée les différents types cellulaires. Nous avons ainsi un génome mais plusieurs épigénomes.

Les lois de l'hérédité, décrites par Gregor Mendel, expliquent comment certains caractères héréditaires se maintiennent à la descendance et stipulent que les différences phénotypiques sont liées à des différences génotypiques. La naissance de l'épigénétique montre que la diversité génétique n'est plus la seule source de diversité phénotypique.

De plus, l'épigénétique n'essaie pas uniquement de répondre à la question comment un génotype mène à un phénotype précis mais aussi pourquoi souvent le phénotype ne concorde pas avec le génotype. Par exemple, comment des jumeaux monozygotes peuvent présenter des phénotypes discordants dus aux variations épigénétiques ou l'apparition de pathologies telles que les pathologies cardiovasculaires [328].

Depuis les avancées sur le séquençage complet du génome et jusqu'à maintenant, l'épigénétique définit l'étude des modifications héritables et réversibles de l'expression des gènes sans faire appel à des changements de la séquence d'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) ni de modifications du nombre de copies d'un gène et correspond ainsi à l'ensemble des voies moléculaires modulant l'expression d'un génotype vers un phénotype particulier.

1.2 La chromatine, support de l'information génétique

1.2.1 Composition et structure de la chromatine

Dans les cellules eucaryotes, l'information génétique siégeant sur la molécule d'ADN en double hélice identifiée par Watson et Crick dans les années 1950, est stockée dans des noyaux de 5 à 20 μm de diamètre. Un brin d'ADN mesurant environ 2 mètres ($6,6 \cdot 10^9 \text{pb}$) [329], doit donc être condensé pour être stocké dans le noyau. Cette condensation fait intervenir de petites protéines basiques : les histones. Découvertes par Albrecht Kossel en 1884, les histones sont des protéines basiques de 11 à 22 KDa de charge positive pouvant ainsi interagir avec l'ADN chargé négativement. Ainsi, la structure nucléoprotéique sous laquelle se présente l'ADN, est appelée chromatine, elle a été mise en évidence par Walter Flemming en 1882 et constitue la forme physique de notre information génétique et consiste en l'association de l'ADN et des protéines histones.

Au niveau moléculaire la chromatine est organisée en unités répétées [330] et l'unité de base de cette chromatine est le nucléosome. Il correspond à un segment de 147pb [331] enroulé 1.7 fois autour d'un noyau protéique constitué de 8 protéines basiques histones. Ce noyau protéique comprend deux copies des histones H2A, H2B, H3 et H4 [332-334]. Les nucléosomes sont reliés entre eux par une séquence d'ADN « linker », cette séquence est un segment libre d'ADN d'environ 20-60 pb sur lequel se fixe l'histone H1 [335-337] qui scelle le nucléosome permettant ainsi sa stabilisation [338].

1.2.2 Structure de la chromatine et activité transcriptionnelle

La structure de la chromatine est représentative de son activité transcriptionnelle. En effet, le degré de compaction de l'ADN joue un rôle primordial dans la régulation de l'expression génique puisqu'il détermine l'accessibilité à l'ADN de la machinerie transcriptionnelle et constitue donc l'un des mécanismes clefs de contrôle de l'expression des gènes.

L'ensemble des travaux menés par Miescher, Flemming, Kossel ou encore Heitz entre 1869 et 1928 ont conduit à la distinction cytologique entre l'euchromatine et l'hétérochromatine [339]. En effet, la chromatine se présente sous deux formes en fonction de critères fonctionnels et structuraux : l'euchromatine et l'hétérochromatine. L'euchromatine de structure globalement décondensée, laissant ainsi accéder les éléments de la machinerie transcriptionnelle à l'ADN, est permissive à la transcription. A l'inverse l'hétérochromatine, correspond à des régions d'ADN condensées, principalement transcriptionnellement inactives.

Différents mécanismes permettent de réguler cet état de compaction de la chromatine et concourent à l'ouverture ou à la fermeture de la chromatine. Les différents régulateurs épigénétiques déposent donc des marques stables et réversibles sur l'ADN ou sur les protéines liées à l'ADN.

2 Modifications épigénétiques et enzymes épigénétiques

2.1 Les principales modifications épigénétiques

Chez les organismes eucaryotes, les principales modifications épigénétiques étudiées sont : la modification covalente de l'ADN via la méthylation des cytosines, les longs Acides RiboNucléiques (ARN) non codants et les modifications post-traductionnelles des histones que je développerai par la suite (*Figure 36*). Ces modifications épigénétiques sont capables de moduler l'état de compaction local de la chromatine et par conséquent l'état de transcription et l'expression de gènes cibles.

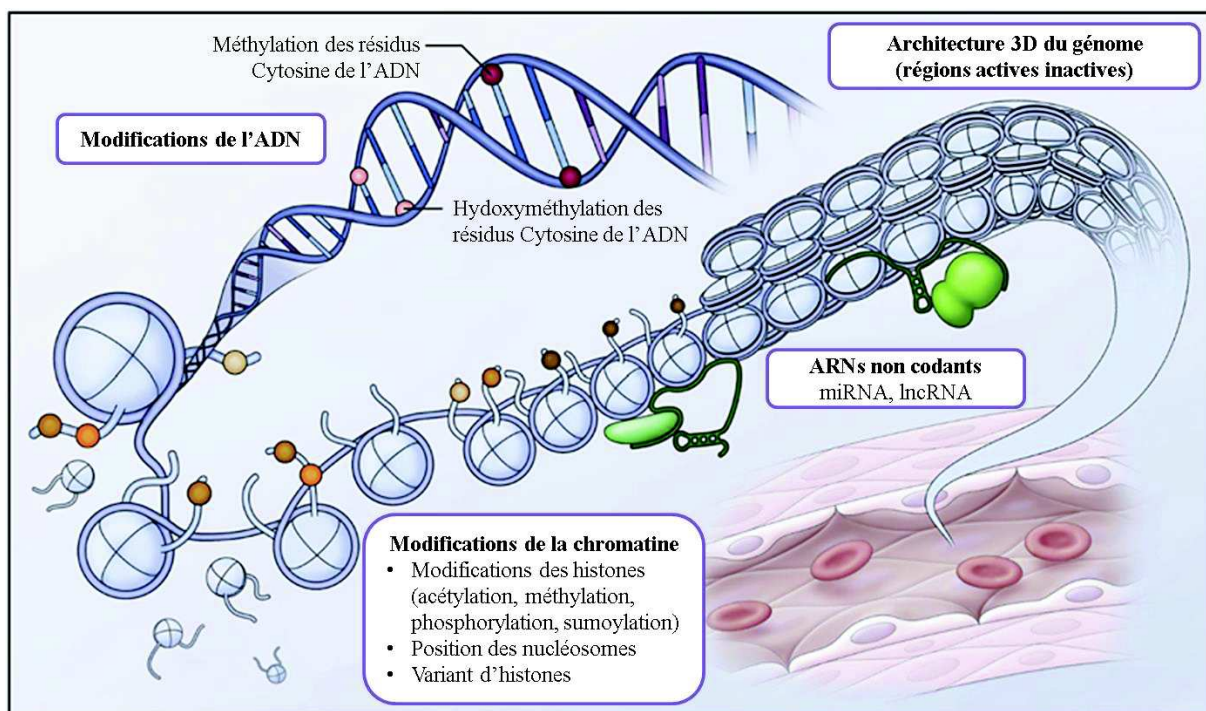


Figure 36 : principales modifications épigénétiques

Modifié d'après Turgeon et al., 2015 [340]

Ces modifications épigénétiques sont connues pour agir conjointement sur la séquence d'ADN, pour stabiliser le programme d'expression génique et par conséquent canaliser l'identité cellulaire. L'importance du contrôle épigénétique de l'expression des gènes est depuis longtemps reconnue, mais le fonctionnement des enzymes intervenant dans la mise en place de ces états compactés ou non de la chromatine est moins documenté.

J'aborderai l'importance des enzymes régulant la mise en place et le retrait des modifications épigénétiques : dans un premier temps, je discuterai du mécanisme de méthylation de l'ADN puis je me focaliserai sur les cellules intervenant dans la régulation de la présence des modifications post-traductionnelles des histones.

2.2 La méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est une modification covalente d'une cytosine appartenant à un dinucléotide CpG [341]. Elle consiste en l'ajout d'un groupement méthyl (CH_3) sur le carbone 5 du cycle pyrimidine d'un résidu cytosine résultant en une 5-méthyl-cytosine (5mC). Le dinucléotide CpG constitue une séquence palindromique ou généralement les cytosines de chaque brin sont méthylés. Il est, par ailleurs, estimé que 80% des résidus C des dinucléotides CpG sont méthylés. En dehors de ces dinucléotides CpG, les Cytosines sont toujours non méthylés.

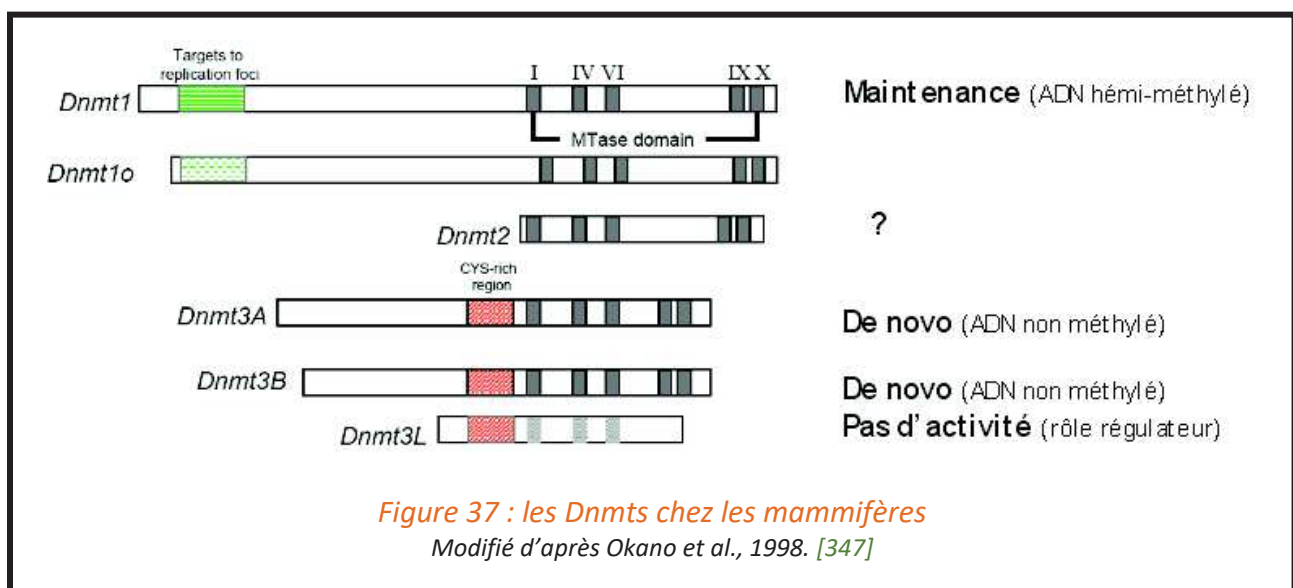
Le produit de cette méthylation, la 5mC, est sujette à la désamination spontanée en thymine, ainsi les dinucléotides CpG méthylés représentent des sites privilégiés de mutation et sont éliminés lentement au cours de l'évolution. Par conséquent, dans de grandes parties du génome des mammifères, les dinucléotides CpG se produisent à une fréquence beaucoup plus faible que ce qui est attendu de la fréquence relative des résidus C et G.

Il existe, cependant, des régions de l'ADN enrichies en séquences CpG (5 à 10 CpG répartis sur une centaine de paires de bases) portant le nom d'îlots CpG [342]. Les dinucléotides CpG présents dans ces régions, retrouvés au niveau du promoteur et du premier exon d'un gène, sont généralement non méthylés. La régulation de la transcription des gènes cibles peut se faire via la méthylation de ces îlots CpG. En effet, normalement hypométhylés et permissifs à la transcription [343, 344], la méthylation de ces îlots CpG entraîne une répression stable de la transcription de ce gène. Cette méthylation est notamment impliquée dans l'inactivation du chromosome X ou des gènes soumis à empreinte parentale [341].

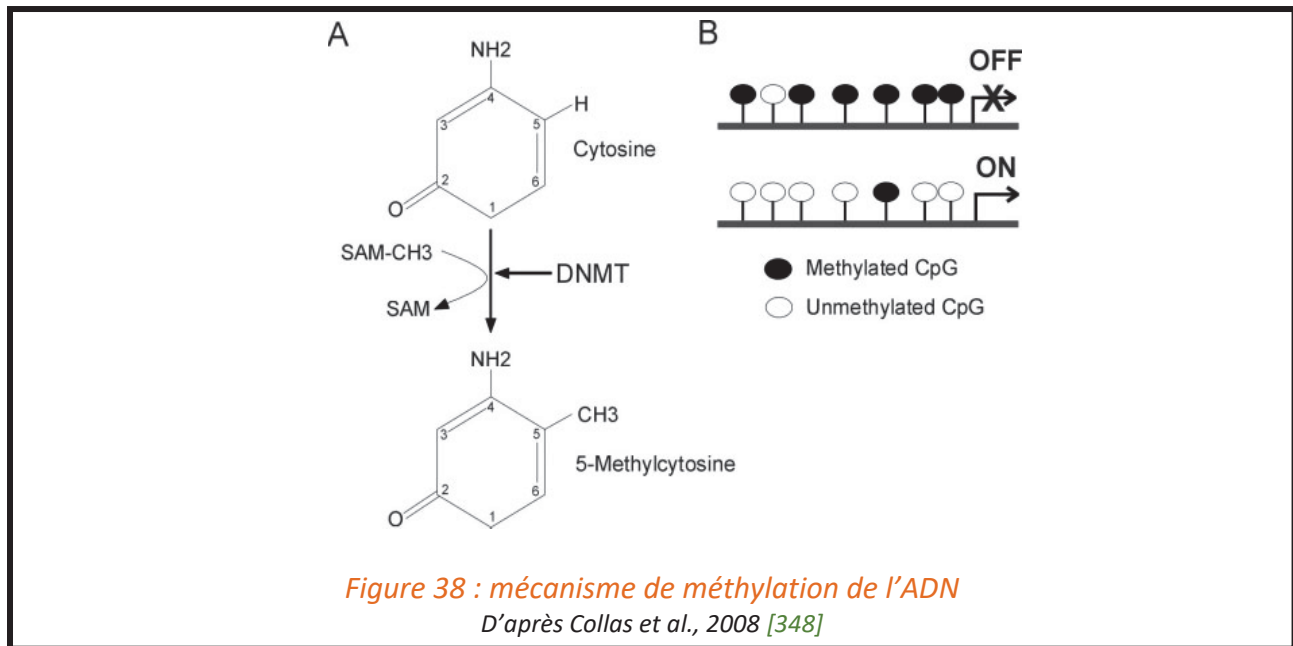
2.2.1 Les méthyltransférases de l'ADN sont responsables de la mise en place de méthylation de l'ADN

La 5mC n'est pas incorporée dans la séquence d'ADN par l'ADN polymérase mais est le résultat d'une modification biochimique. Cette addition covalente du groupement méthyl sur le résidu cytosine est catalysée par les méthyltransférases de l'ADN, les Dnmts [345]. Sur la base de l'homologie de séquence, 5 membres ont été identifiés dans la famille des Dnmts : Dnmt1, Dnmt2, Dnmt3a, Dnmt3b et Dnmt3L [346]. Toutes les méthyltransférases utilisent la S-adenosyl-méthionine comme donneur de méthyl.

Chez les mammifères, les Dnmts possèdent 2 domaines principaux : la région N-terminale et la région C-terminale. La région N-terminale, de taille variable, qui possède des fonctions de régulation, guide la localisation nucléaire des enzymes et permet les interactions avec d'autres protéines, l'ADN et la chromatine. La région C-terminale est responsable de l'activité catalytique de l'enzyme et est hautement conservés. (Retrouvée également dans les méthyltransférases de l'ADN des procaryotes) (Figure 37).



Toutes ces enzymes méthyltransférases de l'ADN partagent un même mécanisme catalytique déclenché par la reconnaissance du substrat. L'enzyme forme alors un complexe covalent avec le carbone 6 de la cytosine et entraîne la bascule de la cytosine ciblée hors de la double hélice d'ADN. Le groupement méthyl est ensuite transféré du cofacteur, la S-adenosylméthionine (SAM) sur le carbone 5 de la cytosine induisant ainsi la formation de la 5-méthylcytosine (5mC) et la libération de la S-adenosylhomocystéine (SAH) (Figure 38).



Depuis leur découverte, le rôle et les fonctions de ces différentes enzymes ont été en partie élucidés. Ainsi, les profils de méthylations sont initialement établis lors du développement embryonnaire dans les cellules germinales et embryonnaires par les *de novo* Dnmts *de novo* : Dnmt3a et Dnmt3b [349] très largement exprimées dans les cellules embryonnaires et dont le taux d'expression est significativement diminué dans les cellules différenciées des tissus adultes [350].

Ces profils de méthylations sont perpétués de cellules en cellules par l'action de la méthyltransférase de maintenance Dnmt1. En effet, après la phase de réplication, l'ADN est hémiméthylé, avec un brin parental possédant les marques établies et un brin nouvellement synthétisé dépourvu de méthylation. Dnmt1, exprimée de façon ubiquitaire, permet de copier le patron de méthylation du brin parental sur le brin nouvellement synthétisé pérennisant ainsi les profils de méthylation au cours des divisions cellulaires le reste de la vie. Dnmt1 présente donc une préférence pour l'ADN héli-méthylé par rapport à l'ADN

non-méthylé et représente la Dnmt la plus abondamment retrouvée dans les cellules somatiques proliférantes. Son affinité pour l'ADN est augmentée grâce à son interaction avec Proliferative Cell Nuclear Antigene (PCNA) [351, 352] au sein de la pince de réplication de l'ADN.

Dnmt3L, la troisième méthyltransférase appartenant aux Dnmt3s et ressemblant grandement à Dnmt3a et Dnmt3b est dépourvue de motif catalytique empêchant la liaison du cofacteur et lui confère une faible affinité pour l'ADN. Néanmoins, Dnmt3L coopère avec Dnmt3a et Dnmt3b et stimule ainsi leur activité enzymatique, certainement via l'induction d'un changement de conformation qui faciliterait l'interaction du cofacteur S-AdenosylMethionine (SAM) avec l'ADN [353]. Cette interaction est notamment importante dans le processus de mise en place de l'empreinte génomique parentale [345, 353].

La dernière méthyltransférase de l'ADN Dnmt2 possède une activité catalytique très faible au regard de l'ADN et semble catalyser préférentiellement la méthylation de l'ARNt [354, 355].

2.2.2 La génération de profils de méthylation aberrants génère de nombreuses pathologies

De nombreux liens ont été établis entre altérations du système de méthylation de l'ADN au niveau des promoteurs de gènes et les maladies neurologiques (syndrome de Rett, Syndrome ATRX, maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson, l'ataxie de Friedreich, l'amyotrophie spinale, ou encore la sclérose en plaques) [356]. La perte de l'empreinte génomique parentale peut également être associée à certaines pathologies neurologiques, pour une même région soumise à empreinte, la perte de l'expression des gènes paternels entraîne le développement du syndrome de Prader-Willi et la perte de l'expression des gènes maternels entraîne le développement du syndrome d'Angelman [356].

Les altérations de la méthylation de l'ADN, sont également la source de certaines pathologies auto-immunes. L'exemple le plus connu est le syndrome ICF pour « Immunodeficiency, Centromeric instability and Facial anomalies » caractérisé par une immunodéficience et des déformations faciales, elle est générée par des mutations du gène qui code pour Dnmt3b responsables d'une hypométhylation des séquences répétitives péri-centromériques aboutissant à l'instabilité de l'hétérochromatine centromérique. Cet

exemple souligne l'importance de ces enzymes méthyltransférases de l'ADN et de ce mécanisme épigénétique de régulation de l'expression des gènes. Il existe des modèles murins de mutations des Dnmts induisant des défauts de méthylation. Les études sur ces modèles montrent que les mutations sur les gènes codant pour Dnmt1, Dnmt3a et Dnmt3b entraînent des défauts majeurs de développement se traduisant par une mortalité périnatale. Les mutations impliquant le gène codant pour Dnmt3L compromettent la mise en place de l'empreinte parentale et le déroulement d'une gaméto-genèse normale.

2.2.3 La déméthylation active de l'ADN fait intervenir différentes familles d'enzymes

La méthylation de l'ADN est considérée comme une modification stable en raison de la transmission des profils de méthylation de l'ADN au cours des divisions cellulaires. Néanmoins, la perte de ces derniers lors de la reprogrammation épigénétique post-fécondation soulève l'existence de mécanismes de déméthylation et montre le caractère dynamique de la méthylation de l'ADN.

La 5mC peut être retirée de façon passive à la suite d'un déficit de méthylation de maintenance lors de la réplication de l'ADN induisant la perte progressive des méthylations au cours des divisions cellulaires successives, ou actives faisant intervenir des enzymes spécifiques indépendamment de la réplication de l'ADN.

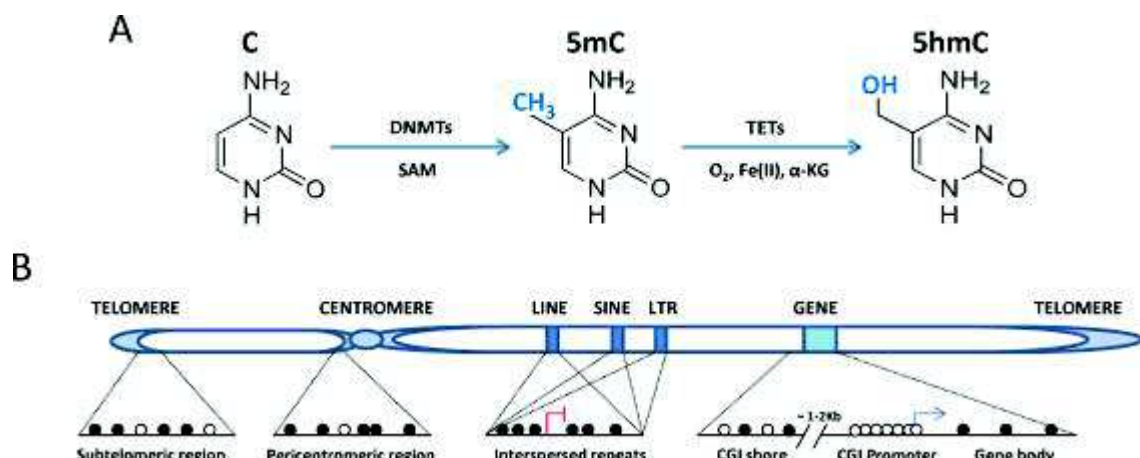


Figure 39 : Mécanismes actifs de méthylation et de déméthylation de l'ADN

D'après Zampieri et al., 2015 [357]

Ainsi, l'action synergique de trois familles d'enzymes est responsable de déméthylation de l'ADN. Les enzymes de la famille Tet (Ten-Eleven-Translocation) agissent par hydroxylation suivie d'oxydations successives de la 5mC, les enzymes de la famille AID/APOBEC désaminent la 5mC et la 5-hydroxymethyl-cytosine (5hmC) et les glycosylases activent le système de réparation de l'ADN Base Excision Repair (BER) permettant l'excision de la m5C et le remplacement par une cytosine (*Figure 39*) [358, 359].

La 5hmC intermédiaire de certaines voies de déméthylation, pourrait également constituer une marque épigénétique. Elle possède des profils de répartition sur le génome différents de ceux de la 5mC. La 5hmC peut être perdue de façon passive au cours des divisions cellulaires. Sa présence altère le recrutement des régulateurs de la chromatine tels que les protéines Methyl-CpG Binding Proteins (MBPs) ou les complexes répresseurs polycombs [359, 360]. Par ailleurs, la 5hmC pourrait empêcher l'action de Dnmt1 au niveau hydroxyméthylés et ainsi favoriser la déméthylation passive [360]. Certaines stratégies thérapeutiques envisagent l'utilisation d'inhibiteurs de Dnmt1, les expérimentations *in vitro* permettent d'obtenir une déméthylation passive. L'inhibiteur le plus couramment utilisé est la 5-aza-cytidine.

La régulation épigénétique de l'expression génique par ce mécanisme de méthylation de l'ADN est impliquée dans toutes les fonctions de la cellule, dès le développement embryonnaire et participe à la formation et au maintien de la chromatine dans un état répressif. Les enzymes impliquées dans la mise en place ou le retrait de ces profils de méthylation sont multiples compliquant l'utilisation d'une stratégie thérapeutique basée sur la modulation de la méthylation via la régulation de l'action des enzymes responsables de la mise en place ou du retrait de ces marques épigénétiques. Les enzymes épigénétiques restent néanmoins de bonnes cibles thérapeutiques dans le cas des modifications post-traductionnelles des histones où un couple d'enzymes est responsable de l'ajout et du retrait d'une modification épigénétique.

2.3 Modifications Post-traductionnelles des histones

Comme nous avons pu l'évoquer, la modification de la structure de la chromatine et de fait l'accessibilité à la séquence d'ADN permet de moduler/réguler l'expression de gènes cibles. Cette modification de la structure peut faire intervenir deux types d'activité enzymatique : l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP pour altérer les liaisons histone-ADN à l'intérieur du nucléosome et la modification covalente de certains acides aminés de la queue des histones résultant en une chromatine plus ouverte ou plus condensée selon le type de modifications subies [361].

La diversité de ces modifications d'histones rend compte de la difficulté d'appréhender l'état transcriptionnel de la chromatine en un locus donné. En effet, si la méthylation de l'ADN est toujours associée à la répression génique, les modifications post-traductionnelles des histones peuvent, elles, entraîner soit l'activation soit la répression génique. Ce processus complexe est appelé code des histones.

Le caractère réversible des différentes modifications épigénétiques fait d'elles des cibles thérapeutiques prometteuses.

2.3.1 Structure des histones et code des histones

Les histones constitutifs des nucléosomes, possèdent une partie C-terminale globulaire hydrophobe et une partie N-terminale débordante, correspondant respectivement au corps (très conservé au cours de l'évolution) et à la queue de la protéine (plus variable) [337].

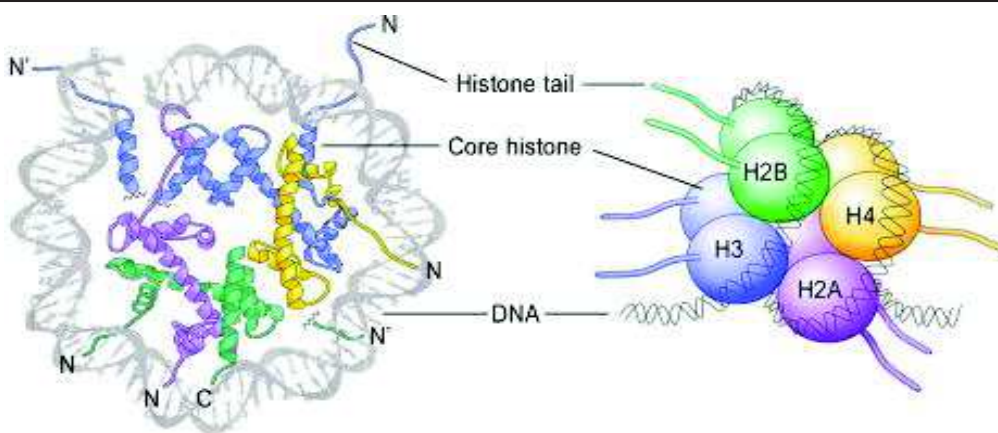
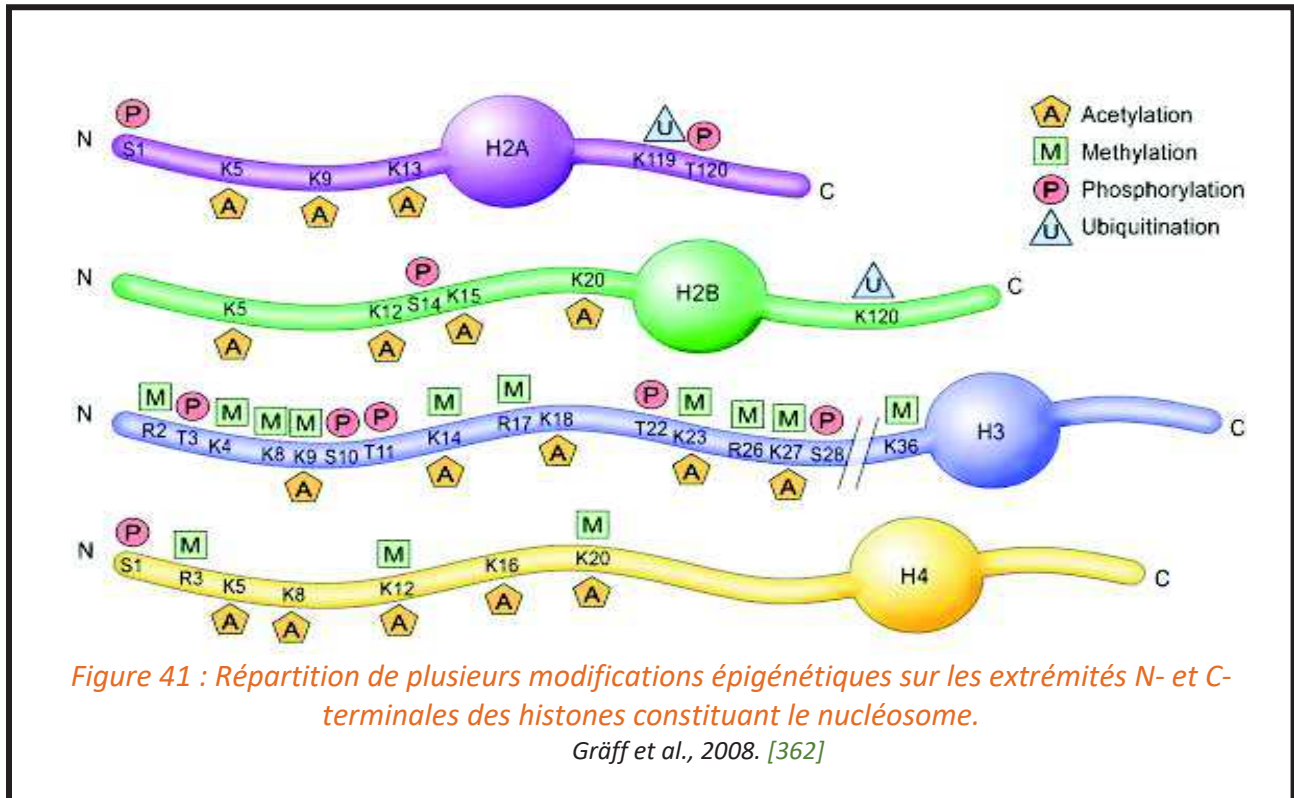


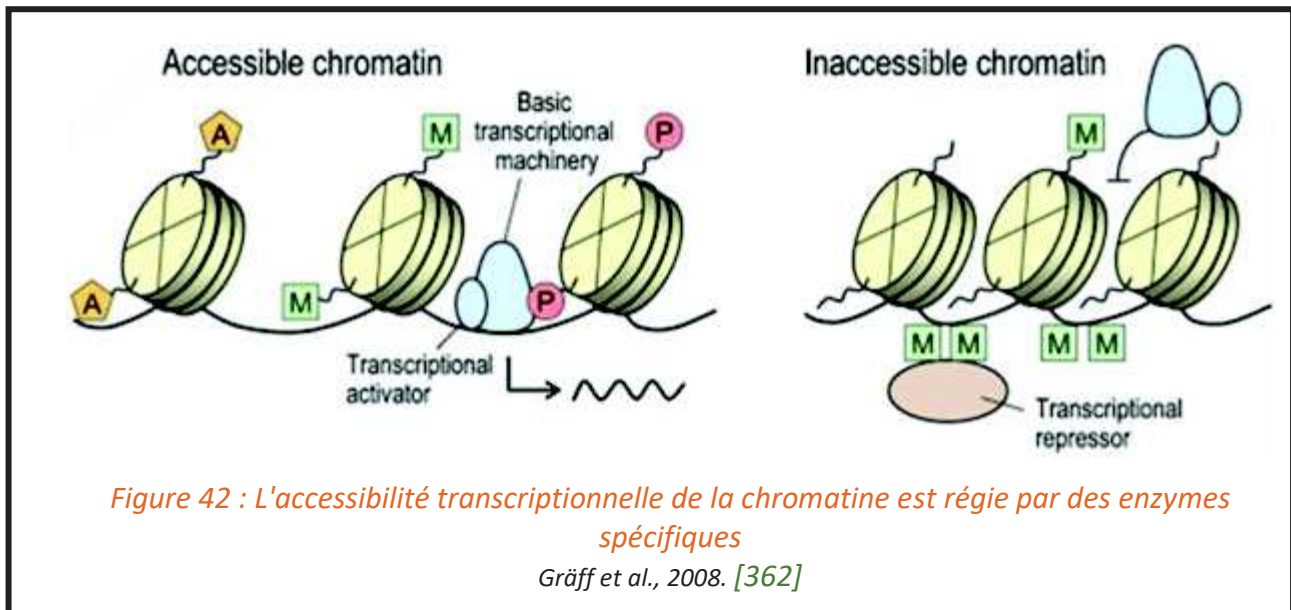
Figure 40 : Structure d'un nucléosome

Gräff et al., 2008. [362]

Les histones sont soumises à des modifications covalentes post-traductionnelles au niveau des acides aminés présents sur leur queue. Les principales modifications post-traductionnelles des histones sont : l'acétylation, la méthylation des résidus arginine (R) ou lysine (K), la phosphorylation des résidus sérine ou thréonine, l'ubiquitination, la sumoylation ou encore l'ADP ribosylation [334, 356, 363-366](Figure 41)



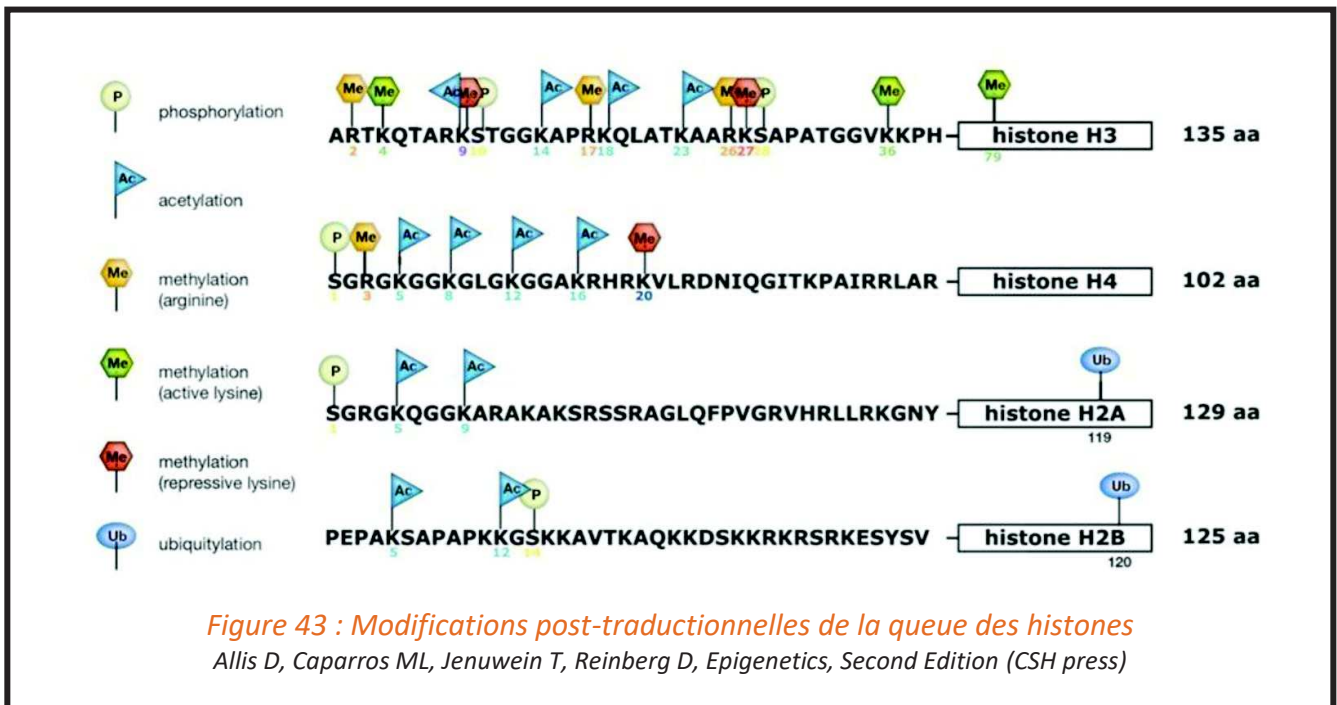
Ces modifications représentent un processus clé de régulation épigénétique puisqu'elles vont permettre directement de réguler l'accessibilité des FTs à l'ADN et créer ou effacer des sites de liaisons spécifiques pour d'autres protéines ou complexes enzymatiques [364, 365]. La localisation sur un acide aminé en particulier et l'emplacement de l'histone sur la séquence d'ADN déterminera le caractère permissif ou répressif de la modification (Figure 42).



Toutes les histones constitutives du cœur (noyau) des nucléosomes sont sujettes aux modifications post-traductionnelles et l'association des différentes marques/modifications constituent le code des histones, régulant ainsi l'état de la chromatine autour d'un locus ou d'un gène/l'accessibilité de l'ADN et par conséquent l'établissement, le maintien et la propagation des profils d'expression de gènes. En effet, les différentes combinaisons des modifications formant ce code des histones sont lues par la suite par des protéines régulatrices et sont transformées en un état particulier de la chromatine. Le code des histones tend à prédire en fonction des différentes modifications épigénétiques présentes l'état de la chromatine autour d'un locus ou d'un gène et ainsi son état de transcription. Ceci suppose la caractérisation des différentes modifications des histones. Certaines modifications telles que la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me), la méthylation de la lysine 36 de l'histone H3 (H3K36me) ou la méthylation de la lysine 79 de l'histone H3 (H3K79me) sont associées à un état transcriptionnellement actif de la chromatine et sont dites permissives, alors que les modifications dites répressives telles que la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me) et la méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me) sont présentes au niveau de gènes réprimés. Néanmoins, le rôle de certaines modifications quant à leur caractère permissif ou répressif reste encore non résolu, étant associé dans certaines études à l'activation génique et dans d'autres à la répression génique (H3K27me1, H4K20me1)[367].

Les modifications post-traductionnelles des histones ont lieu au niveau de régions spécifiques du génome et génèrent des plages ou enrichies ou dépourvues de modifications caractéristiques. L'euchromatine présente donc un niveau élevé d'acétylation et de triméthylation sur H3K4, H3K36 et H3K79 et l'hétérochromatine est hyperméthylée et hypoacétylée sur H3K9, H3K27 et H4K20 [356, 368].

Il est intéressant de relever que la méthylation des histones, contrairement à l'acétylation, n'altère pas la charge de la protéine. Ainsi, la méthylation des histones n'a pas d'effet direct sur la structure de la chromatine [365, 369]. La méthylation des histones constitue des sites de fixation pour des complexes spécifiques ou des protéines, entraînant parfois l'activation ou la répression de la transcription génique [334, 364, 365, 369, 370]. La queue des histones est particulièrement riche en résidus lysine et arginine, résidus sujets à la méthylation, nous aborderons donc plus précisément les mécanismes de méthylation des histones. Par ailleurs, ces méthylations des histones sont principalement retrouvées sur les queues des histones H3 et H4 (*Figure 43*).



2.3.2 Méthylation des queues des histones et enzymes de modification des histones

2.3.2.1 La méthylation des histones concerne les résidus lysine et arginine

L'équipe de docteur Murray décrit pour la première fois en 1964 le mécanisme de méthylation des histones. Les méthylations des histones se produisent sur les résidus lysines et arginine des extrémités N-terminales débordantes. La méthylation des résidus lysine peut être simple, double ou triple générant des résidus mono-, di-, ou triméthylés (me1, me2 ou me3) [365, 371, 372] et la méthylation des arginines peuvent être simple ou double générant des résidus mono- ou diméthylés. La méthylation des histones sur les résidus lysines est généralement associée à une répression génique mais ceci dépend du résidu en cause et du degré de méthylation.

2.3.2.2 Les méthylations des histones sont catalysées par des enzymes spécifiques

La méthylation des résidus d'histones est un processus dynamique et réversible qui requiert l'action d'enzymes antagonistes : *i)* les Histones MéthylTransférases (HMTs) sont responsables de la mise en place de la marque épigénétique et *ii)* les histones déméthylases (HDMs) catalysent le retrait de ces modifications (*Figure 44*).

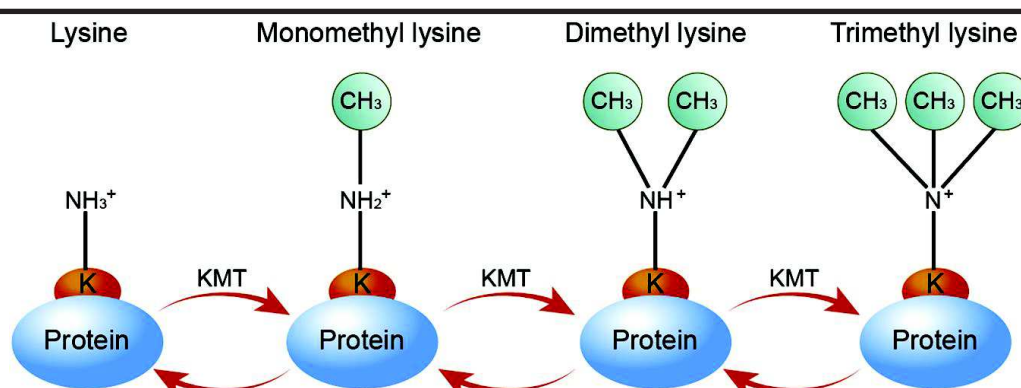


Figure 44 : Méthylation et déméthylation des résidus lysine

Han et al., 2019 [373]

La méthylation de la lysine (K) est une modification post-traductionnelle (PTM) dynamique et réversible des protéines. En général, les groupes ϵ -amine de la lysine peuvent accepter jusqu'à trois groupes méthyle, ce qui donne lieu à la mono-, di- ou triméthyllysine. Les lysine méthyltransférases (KMT) catalysent l'ajout de groupes méthyles aux substrats, tandis que les lysine déméthylases (KDM) éliminent les groupes méthyles. K, lysine ; PTM, modification post-traductionnelle ; KMTs, lysine méthyltransférases ; KDMs, lysine méthyltransférases.

On distingue deux types d'HMTs selon l'acide aminé modifié : *i)* les arginines sont méthylées par les *Protein arginine methyltransferase* (PRMT) et *ii)* les Protein lysine méthyltransférases (PKMT) sont capables de méthyler les lysines [374].

De la même manière que pour la méthylation de l'ADN, le domaine Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax (SET) de ces enzymes est responsable de leur activité catalytique [375], permettant le transfert d'un groupement méthyl du cofacteur SAM vers le groupement ϵ -aminé de la chaîne latérale de résidus lysine (PKMTs) ou le groupement ω -guanidine de résidus arginines (PRMTs). Ces enzymes sont relativement conservées chez les eucaryotes [374]. La première HKMT décrite chez l'homme est Suppressor Of Variegation 3-9 Homolog 1 (SUV39H1) qui méthyle H3K9 [376]. Toutes ces lysines méthyles transférases possèdent un domaine catalytique SET, excepté Disruptor Of Telomeric silencing-1 (DOT1) [375], qui appartient à une nouvelle classe d'HKMT, étant responsable de la méthylation d'une lysine située dans le domaine globulaire de l'histone H3 [377, 378].

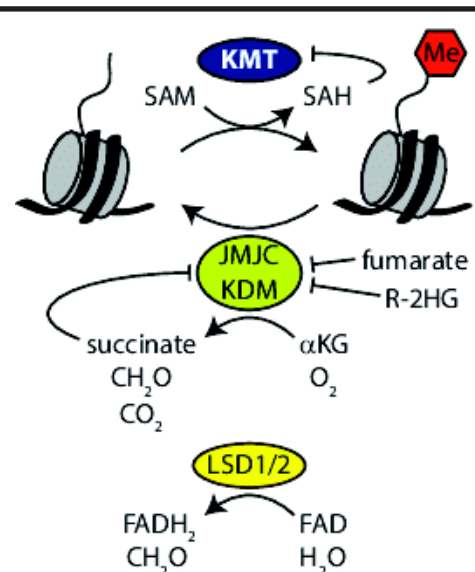
2.3.2.3 Les déméthylations des histones sont catalysées par des enzymes antagonistes des HMTs

Le retrait des groupements méthyls met en jeu deux familles d'enzymes : *i)* la famille Jumonji des déméthylases dépendantes du 2-oxoglutarate et *ii)* les déméthylases des lysines dépendantes des flavines (LSD, "lysine-specific histone demethylase") [369] (Figure 45).

Figure 45 : Méthylation et déméthylation des histones.

Zhang et al., 2001. [373, 374]

Les histones sont méthylées par les KMTs, qui ont besoin de la SAM comme cosubstrat. Deux classes différentes de KDMs peuvent enlever un groupe méthyle. Les LSD1/2 ont besoin de FAD comme accepteur d'électrons. Les KDMs contenant le domaine JmjC utilisent l' α KG comme cosubstrat. Le fumarate, le succinate et le R-2HG sont des inhibiteurs compétitifs. (FADH₂ FAD, réduit ; (Me) méthyle



2.3.2.4 *H3K4me3 et H3K27me3*

Mon projet de thèse s'est intéressé essentiellement à deux modifications épigénétiques bien caractérisées, la première, H3K4me3 est une modification post-traductionnelle des histones permissive à la transcription génique et la seconde H3K27me3 est retrouvée au niveau des gènes réprimés.

Ces méthylations des histones correspondent donc à un mécanisme réversible permettant de réguler finement l'expression génique. Dans le cadre de mon projet de thèse, ces enzymes épigénétiques permettant le dépôt ou le retrait de cette méthylation ont été identifiées comme des cibles/points de leviers plausibles pour réguler l'expression de gènes cibles, notamment les gènes impliqués dans la différenciation et la polarisation des cellules myéloïdes (monocytes) vers les macrophages M2.

3 Régulation épigénétique de la transcription des gènes : cas Particuliers de H3K4me3 et H3K27me3

3.1 Concept de gènes bivalents

3.1.1 Degrés de transcription d'un gène et méthylation des résidus lysines

L'utilisation d'anticorps spécifiques dirigés contre une modification épigénétique précise et le séquençage de l'ADN permettent l'identification des gènes portant ces modifications. L'usage de ces techniques a permis de mettre en avant une corrélation entre le degré de transcription d'un gène et son statut de méthylation d'un résidu lysine d'une histone. Ceci a permis de déterminer les marques de méthylation dites permissives ou activatrices de la transcription et celles dites répressives [379, 380] (Tableau 6). *Tableau 6 : Modification épigénétiques et transcription*

Modifications	Transcription
Acétylations	
H3 (K9,K14,K18,K56)	ACTIVATION
H4 (K5,K8K112,K16)	ACTIVATION
H2A	ACTIVATION
H2B(K6,K7,K16,K17)	ACTIVATION
Phosphorylations	
H3 (S10)	ACTIVATION
Méthylations	
H3 (K4,K36,K79)	ACTIVATION
H3 (K9,K27)	REPRESSION
H4 (K20)	REPRESSION

3.1.2 H3K4me3/H3K27me3 et discrimination des gènes transcriptionnellement actifs ou non

De manière intéressante, les premières études établissant un lien entre le profil de méthylation des histones et l'expression de gènes cibles ont mis en avant que la discrimination entre les gènes exprimés et ceux réprimés pouvait se faire avec uniquement deux modifications d'histones : H3K4me3 et H3K27me3. Ces résultats obtenus dans des cellules souches embryonnaires (ES) de souris [381] ont été confirmés par la suite dans les cellules souches embryonnaires chez l'Homme [382, 383]. En effet, il existe une corrélation inverse entre ces deux modifications épigénétiques le long des domaines des chromosomes. La H3K4me3 est associée aux domaines chromatiniens actifs tandis que la H3K27me3 est associée aux domaines chromatiniens inactifs.

3. Régulation épigénétique de la transcription des gènes : cas Particuliers de H3K4me3 et H3K27me3

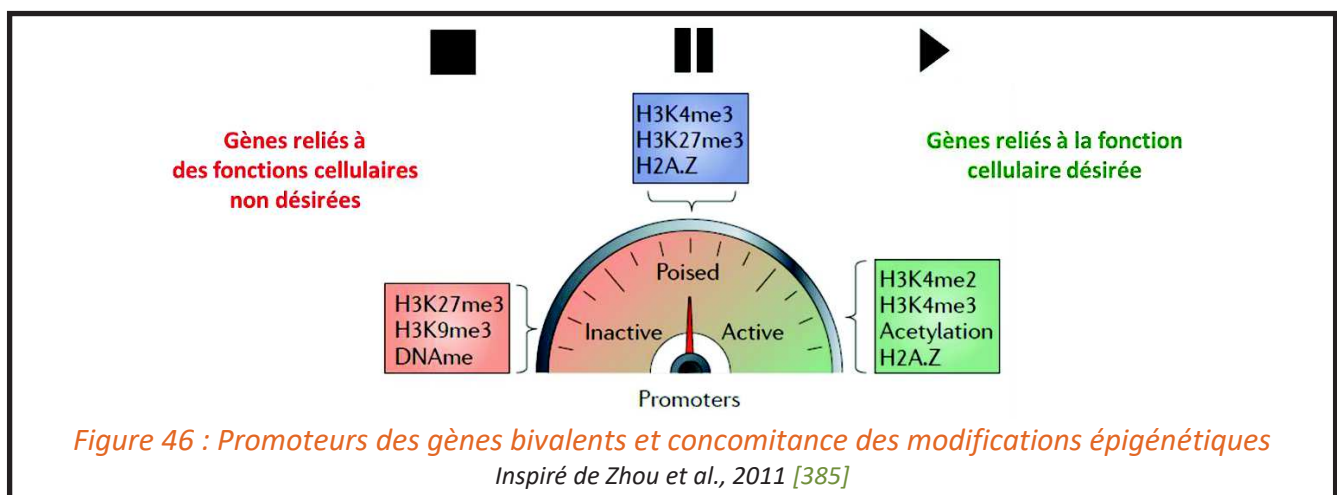
Ainsi, la H3K27me3 est associée à différents processus parmi lesquels l'inactivation du chromosome X, l'inactivation des gènes homéostatiques, la plasticité des cellules souches et également la prolifération, différenciation et le maintien de l'identité cellulaire.

La H3K4me3, présente dans les régions promotrices des gènes, est associée à une activité transcriptionnelle permissive de ces derniers.

Cette vision ON-OFF simpliste de l'expression génique a évolué avec la documentation par l'équipe de Docteur Lander en 2006 d'une catégorie de gènes qu'ils nomment « poised » dans les cellules (ES) [384]. Ces gènes présentent au niveau de leur promoteur à la fois des marques répressives et des marques permissives.

3.1.3 Concomitance des marques : gènes bivalents

Les marques H3K27me3 et H3K4me3 ne sont donc pas mutuellement exclusives, ces deux marques peuvent être concomitantes au niveau des promoteurs de gènes importants impliqués dans le développement des cellules ES. Ces gènes, dits « poised » ou encore « bivalents » sont dans un état épigénétique, permettant soit l'activation de la transcription par retrait de la marque H3K27me3 répressive, soit la répression de la transcription par retrait de la marque permissive H3K4me3, régulant ainsi notamment l'engagement dans une lignée cellulaire (*Figure 46*).



La chromatine bivalente n'est pas spécifique des cellules ES et est bien documentée dans les autres types cellulaires (par exemple les ECFCs).

3. Régulation épigénétique de la transcription des gènes : cas Particuliers de H3K4me3 et H3K27me3

3.1.4 Mécanismes de méthylation et déméthylation de H3K4 et H3K27

La formation des marques H3K4me3 et H3K27me3 requiert l'ajout de 3 groupements méthyles sur les lysines 4 et 27 de l'histone H3. Comme je l'ai évoqué précédemment, cette action est gouvernée par des enzymes spécifiques, qui apposent ces groupements méthyles : les lysines méthyltransférases (KMTs). Ces marques étant réversibles, les enzymes antagonistes responsables de la déméthylation de ces résidus lysine sont les lysines déméthylases (KDMs). On dénombre, à ce jour, plus de 50 KMTs et 30 KDMs [369, 386]. Les *tableaux 7 et 8* présentent un résumé de la classification des KMTs et KDMs.

Famille	Enzyme	Autre nom	Substrats	
			Histone	Non-Histone
KMT1	KMT1A	SUV39H1	H3K9me3	
	KMT1B	SUV39H2	H3K9me3	
	KMT1C	G9a/EHMT2	H3K9me2	p53, G9a, C/EBPβ, Reptin, RARα, DNMT1
			H3K27me2	CDYL1, WIZ, ACINUS
			H1.4k26me2	
	KMT1D	GLP/EHMT1	H3K9me2	p53
	KMT1E	ESET/SETDB1	H3K9me3	Tat
KMT1F	SETDB2	H3K9me3		
KMT2	KMT2A	MLL	H3K4me3	
	KMT2B	MLL2	H3K4me3	
	KMT2C	MLL3	H3K4me3	
	KMT2D	MLL4	H3K4me3	
	KMT2E	MLL5	H3K4me3	
	KMT2F	hSET 1A	H3K4me3	Dam1 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
	KMT2G	hSET 1B	H3K4me3	
	KMT2H	ASH2	H3K4me3	
KMT3	KMT3A	SET2	H3K36me3	
	KMT3B	NSD1	H3K36me2	NFκB
			H3K20me2	
	KMT3C	SMYD2	H3K36me2	p53, RB
			H3K4me	
KMT3D	SMYD1	H3K4me		
KMT3E	SMYD3	H3K4me3	VEGFR	
KMT4	KMT4	DOT1L	H3K79me2/3	
KMT5	KMT5A	SET8	H4K20me1	p53
	KMT5B	SUV420H1	H4K20me20	
	KMT5C	SUV420H2	H4K20me20	
KMT6	KMT6A	EZH2	H3K27me3	
	KMT6B	EZH1	H3K27me3	
KMT7	KMT7	SET7/9	H3K4me1	p53, TAF7, TAF10, ERα, AR, DNMT1, NFκB, PCAF, RB, E2F1, STAT3, Tat
KMT8	KMT8	PRDM2/RIZ1	H3K9me3	

Tableau 7 : Classification des KMTs
Zhang et al., 2012 [387]

3. Régulation épigénétique de la transcription des gènes : cas Particuliers de H3K4me3 et H3K27me3

Famille	Enzyme	Autre nom	Substrats	
			Histone	Non-Histone
KDM1	KDM1A	LSD1	H3K4me1/2	p53, DNMT1, STAT3, MYPT1
			H3K9me1/2	
	KDM1B	LSD2	H3K4me1/2	
			H3K9me1/2	
KDM2	KDM2A	JHDM1A	H3K36me1/2	NFκB
	KDM2B	JHDM1B	H3K36me1/2	
KDM3	KDM3A	JHDM2A	H3K9me1/2	
	KDM3B	JHDM2B	H3K9me1/2	
KDM4	KDM4A	JMJD2A	H3K9me2/3	
			H3K36me2/3	
	KDM4B	JMJD2B	H3K9me2/3	
			H3K36me2/3	
	KDM4C	JMJD2C	H3K9me2/3	
			H3K36me2/3	
KDM4D	JMJD2D	H3K9me2/3		
KDM5	KDM5A	JAR1D1A	H3K4me2/3	
	KDM5B	JAR1D1B	H3K4me2/3	
	KDM5C	JAR1D1C	H3K4me2/3	
	KDM5D	JAR1D1D	H3K4me2/3	
KDM6	KDM6A	UTX	H3K27me2/3	
	KDM6B	JMJD3	H3K27me2/3	
KDM7	KDM7A	JHDM1D	H3K9me1/2	
			H3K27me1/2	
	KDM7B	PHF2	H3K9me1/2	
			H3K27me1/2	
	KDM7C	PHF8	H3K9me1/2	
H4K20me1				

Tableau 8 : Classification des KDMs

Zhang et al., 2012 [387]

3.1.5 Equilibre H3K4me3 et H3K27me3 et engagement dans une lignée cellulaire

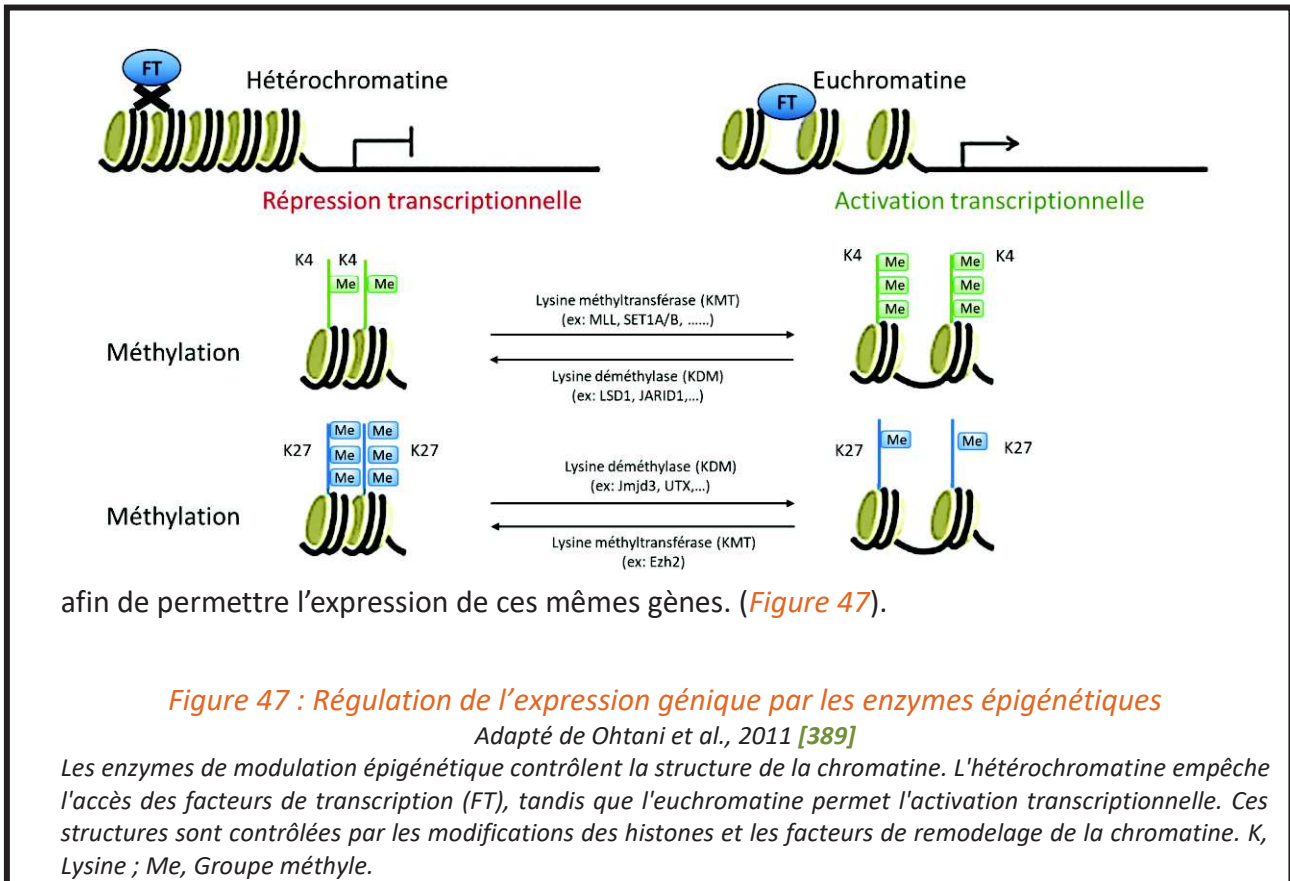
La coordination des KMTs et KDMs permet de maintenir un équilibre de méthylation des résidus lysine. Cette coordination est donc primordiale pour la régulation de l'expression des gènes bivalents.

Concernant la marque H3K4me3, son ajout est réalisé par l'action de l'enzyme Mixed Lineage Leukemia (MLL) et est retirée par action de LSD1 et Jumonji AT-Rich Interactive Domain (JARID)1.

Dans le cas précis de la marque H3K27me3, la protéine à domaine SET responsable du dépôt de cette marque épigénétique dite répressive chez l'homme est Enhancer of Zest Homologue 2 (EZH2)). Cette enzyme épigénétique appartient au complexe PRC2 (pour

3. Régulation épigénétique de la transcription des gènes : cas Particuliers de H3K4me3 et H3K27me3

Polycomb Repressive Complex 2)[388]. Une fois ajoutée par EZH2, la marque H3K27me3 va induire une compaction locale de la chromatine et ainsi inhiber l'expression de gènes cibles. Cette modification épigénétique peut être retirée par deux autres enzymes Jumonji domain-containing protein D3 (JMJD3) et Ubiquitously Transcribed Tetatricopeptide Repeat X (UTX),



L'expression de certains gènes est ainsi finement régulée par un équilibre entre l'expression et l'activité de ces enzymes.

Dans le cadre de mon projet de recherche, ces enzymes apparaissent comme un outil potentiel permettant de favoriser l'expression de certains gènes. Nous aborderons cette stratégie dans la partie suivante, où l'expression des gènes de polarisation en macrophages de type M2 pourrait être favorisée via inhibition de EZH2. En effet, dans une telle situation, il est stratégiquement préférable de lever l'inhibition exercée par un inhibiteur plutôt que d'essayer d'amplifier le signal activateur.

3. Régulation épigénétique de la transcription des gènes : cas Particuliers de H3K4me3 et H3K27me3

3.2 EZH2 et le complexe PRC2

3.2.1 Protéines du Groupe Polycomb (PcG)

3.2.1.1 Découverte et fonction des PcG

Les protéines appartenant au groupe Polycomb (PcG) sont un groupe de protéines diverses et conservées qui fonctionnent comme des modificateurs épigénétiques et des régulateurs de la transcription. Ces protéines ont initialement été découvertes chez la drosophile où elles jouent un rôle de répresseur transcriptionnel des gènes homéotiques (HOX) [390-393]. A ce jour, elles sont connues pour être essentielles au cours du développement embryonnaire, lors de la différenciation des cellules souches et de l'homéostasie tissulaire [394, 395].

Ces protéines, conservées de la drosophile à l'Homme, favorisent le dépôt de certaines marques épigénétiques et permettent le maintien d'un état transcriptionnel réprimé de gènes cibles au cours du développement. Ces facteurs chromatinien agissent sous forme de larges complexes multimériques, les Polycomb Repressor Complex (PRC).

3.2.1.2 Fonctionnement général des complexes PRCs et répression génique

Ces complexes se fixent sur l'ADN au niveau des séquences régulatrices PcG Response Element (PRE). Le recrutement des complexes au niveau de ces PRE peut faire intervenir des FTs précoces. La fixation des complexes au niveau des PREs entraîne le dépôt de certaines modifications épigénétiques particulières.

3.2.2 PcG chez les mammifères

Contrairement au PcG décrits chez la drosophile, il a été décrit deux complexes différents chez les mammifères : Polycomb Repressor Complex 1 (PRC1) [159] et Polycomb Repressor Complex 2 (PRC2). Pour chacun des complexes, il est possible de distinguer des complexes canoniques et des complexes non canoniques (comme l'ont examiné Schwartz et Pirrotta, 2013 [160]). En effet, les complexes PRC1 et la PRC2 possèdent un noyau, composé de sous unités protéiques, dites essentielles, auquel s'ajoutent des sous unités non essentielles. Le complexe dit canonique correspond au complexe dont le noyau est composé de sous unités protéiques homologues à celles retrouvées chez la drosophile.

3. Régulation épigénétique de la transcription des gènes : cas Particuliers de H3K4me3 et H3K27me3

3.2.3 PRCs, modifications épigénétiques et répression transcriptionnelle

A ce jour, la compréhension de ces protéines suggère que les PcGs possèdent chacun la capacité d'effectuer une modification épigénétique spécifique [396, 397]. Ils ajoutent des modifications épigénétiques répressives telles que, l'ubiquitination de H2A et la triméthylation de H3K27 respectivement pour PRC1 et PRC2 (Figure 48). Ces modifications aboutissent à la compaction locale de la chromatine entraînant l'incapacité pour d'autres complexes protéiques ou facteurs de croissance d'accéder à la séquence d'ADN correspondant donc à un état transcriptionnel inactif. Un troisième complexe a été identifié, le complexe Polycomb Repressive DeUBiquitinase (PR-DUB), dont l'action s'oppose à celle de PRC1.

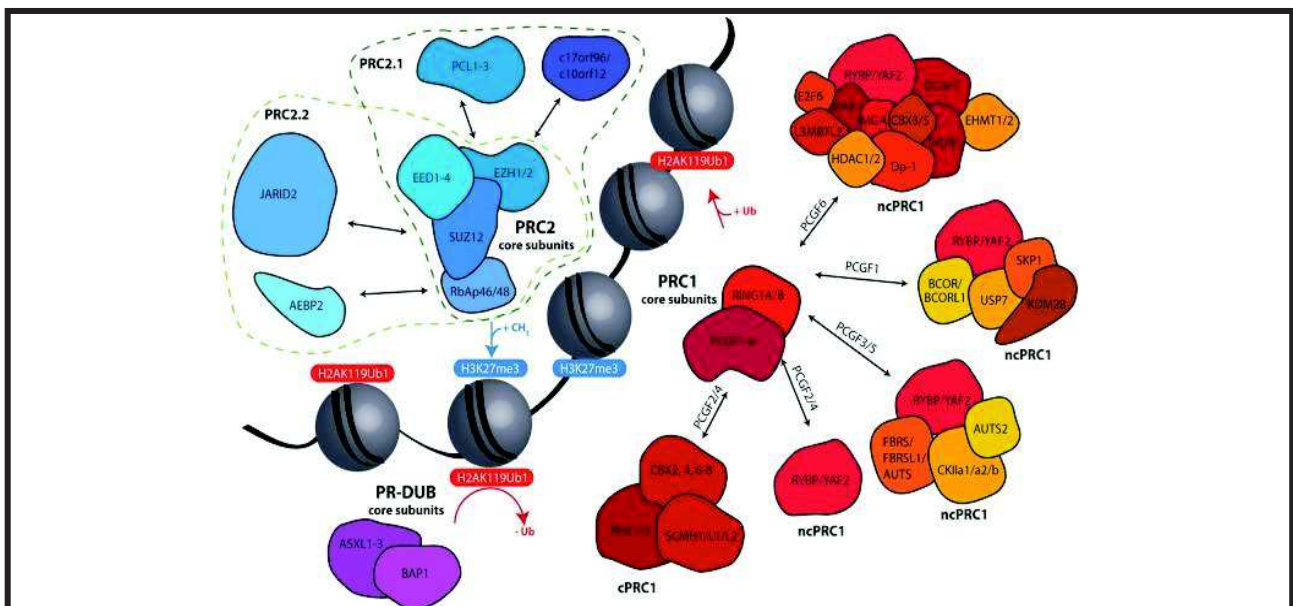


Figure 48 : Complexes polycombs humains et régulation de la triméthylation de H3H27 et l'ubiquitination de H2AK119

Chittock et al., 2017 [398]

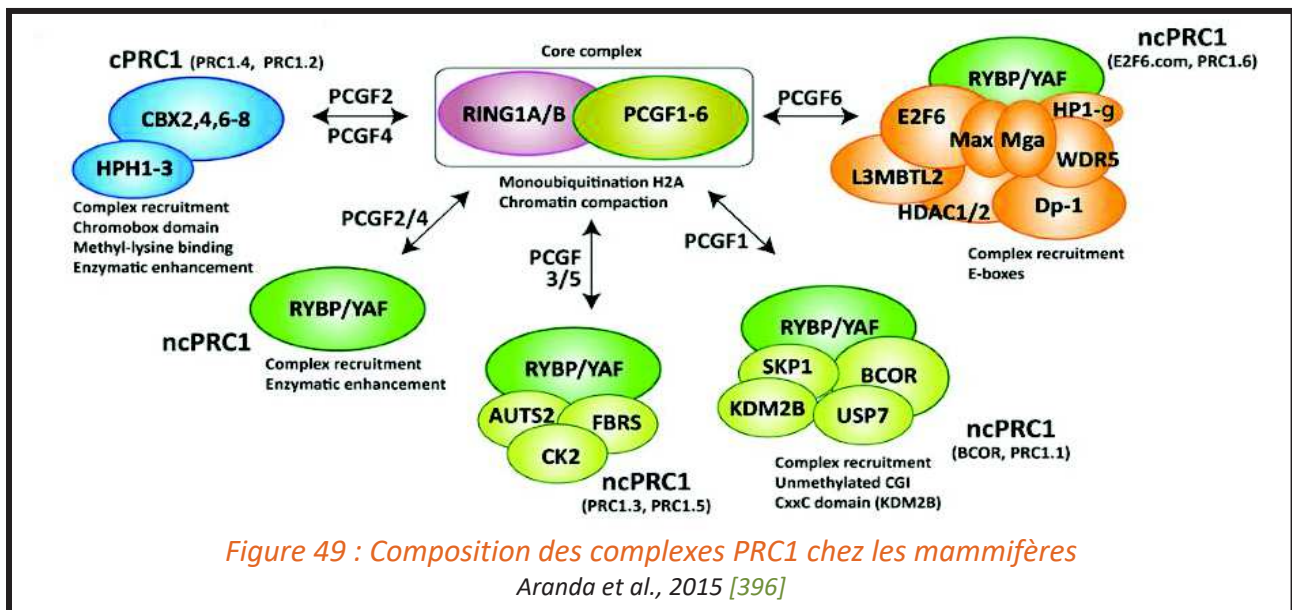
Les protéines polycombes sont caractérisées par un composant enzymatique qui interagit avec des facteurs centraux ou accessoires supplémentaires pour réguler l'activité enzymatique ou le ciblage génomique, modulant ainsi la production biologique de complexes spécifiques. Les complexes PRC1 déposent l'ubiquitination de H2AK119, ce qui stimule l'activité de PRC2-JARID2-AEBP2, tandis que PRC2 dépose H3K27me3, ce qui stimule également PRC2 et PRC1. Cela produit une boucle d'anticipation qui amplifie les signaux polycombes sur de grandes régions génomiques afin d'induire la répression transcriptionnelle. En revanche, PR-DUB supprime l'ubiquitination de H2AK119 déposée par PRC1 et assure la répression de la cible polycombe par un mécanisme distinct, encore inconnu. PCL, polycomblike; PHC1, polyhomeotic-like protein 1; SCMH, sex combs on midleg homologue; RYBP, RING1 and YY1 binding protein; YAF, YY1-associated factor; FBRS, probable fibrosin-1; FBRSL, FBRS-like; RING, really interesting new gene; AUTS, autism susceptibility; CKII, casein kinase II; BCOR, BCL6 (B cell lymphoma 6) co-repressor; BCORL1, BCOR-like 1; USP, ubiquitin-specific protease; SKP, S-phase kinase-associated protein; HDAC, histone deacetylase; L3MBTL, lethal (3) malignant brain tumour-like; MGA, MAX gene-associated; MAX, myc-associated factor X; WDR, WD-repeat containing; Dp-1, DRFT1 polypeptide-1; EHMT, euchromatic histone methyltransferase; E2F6, E2F (E2 factor) transcription factor 6.

3. Régulation épigénétique de la transcription des gènes : cas Particuliers de H3K4me3 et H3K27me3

3.2.4 Polycomb Repressive Complexe 1 (PRC1)

Cette famille de complexes contribue à la répression de l'activité transcriptionnelle de gènes cibles en : *i*) déposant la marque épigénétique H2AK119ub1 [399, 400], *ii*) modifiant par action directe la structure de la chromatine (compaction) [400] ou en *ii*) interagissant directement avec la machinerie transcriptionnelle [399, 401-404].

Tous les complexes PRC1 contiennent un noyau commun composé : *i*) d'une E3 ubiquitine ligase de type RING (Ring1B également connu sous le nom de RNF ou Ring1A), *ii*) d'une protéine PCGF (PCGF1-6), ainsi que des sous-unités supplémentaires qui définissent la PRC1 canonique (sous-unités CBX et PHC) et la PRC1 non canonique (RYBP/YAP2) [388, 395, 396, 405] (Figure 49). De fait, historiquement, chez les mammifères deux types de complexes PRC1 sont décrits. D'une part, les complexes PRC1 canoniques (cPRC1) pour lesquels les sous unités composant le complexe sont homologues à celle du complexe chez la drosophile et d'autre part les complexes PRC1 non canoniques. Plus récemment, une classification basée sur l'identité de la protéine PCGF a été proposée [396].



L'association hétérodimérique de la sous unité RING et de la sous unité PCGF forme la base du complexe et sert de structure de base, à laquelle s'ajoutent les autres sous unités, par interaction avec les domaines Ring finger And WD40 Ubiquitin Like (RAWUL) présents dans la partie C terminale de RING et PCGF [406, 407].

Ainsi, le domaine RAWUL de la sous unité RING interagit soit avec CBX (2, 4, 6, 7, 8), soit avec RYBP (ou son homologue YAF2), de façon mutuellement exclusive.

3. Régulation épigénétique de la transcription des gènes : cas Particuliers de H3K4me3 et H3K27me3

La sous unité PCGF établit des interactions sélectives avec des partenaires de liaison spécifiques, influençant la composition du complexe PRC1, le niveau d'activité vis-à-vis de l'ubiquitination de H2AK119 et la localisation génomique du complexe [408, 409] (Figure 50). Ainsi, la composition des sous-unités affecte à la fois le recrutement de PRC1 au niveau des gènes cibles et l'activité catalytique du complexe [395, 396].

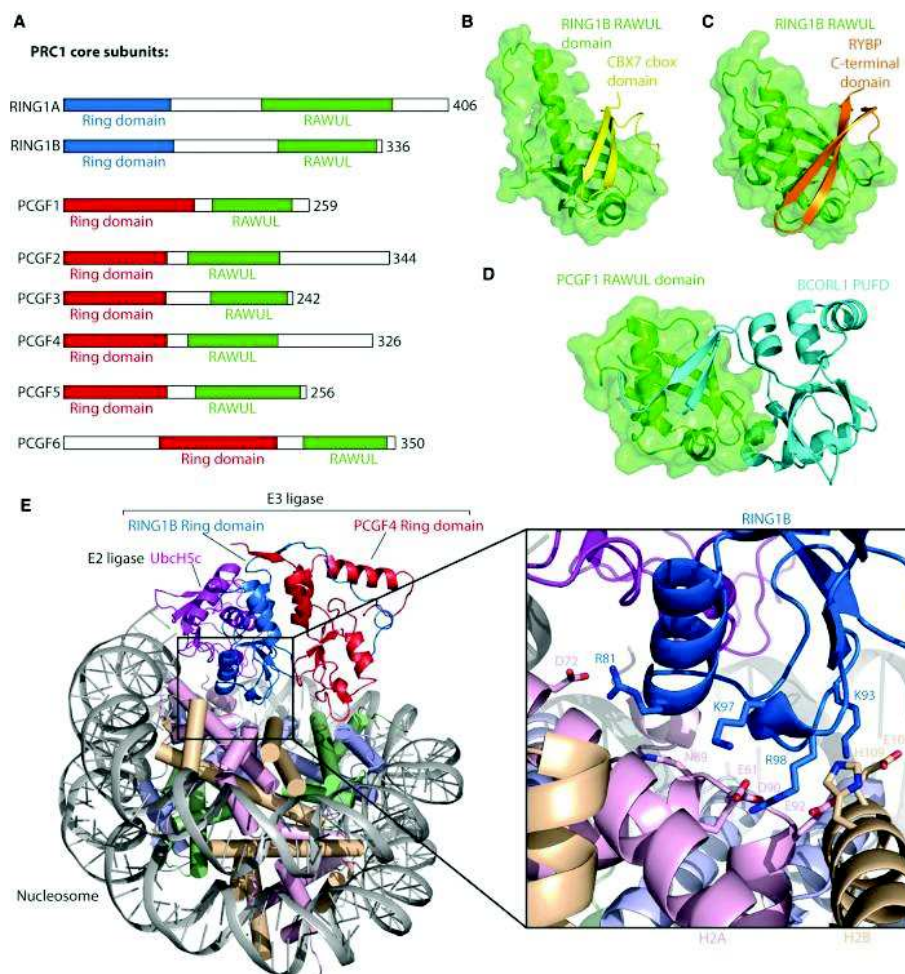


Figure 50 : Complexe PRC1

Chittock et al., 2017 [398]

(A) Domain architecture of the PRC1 core proteins: the RING1 proteins and the PCGF proteins. (B) Structure of the RING1B RAWUL domain/CBX7 cbox domain (PDB: 3GS2). (C) Structure of the RING1B RAWUL domain/RYPB C-terminal domain (PDB: 3IXS). (D) Structure of the PCGF1 RAWUL domain/BCORL1 PFUD domain (PDB: 4HPL). (E) Structure of the RING1B ring domain-UBch5c fusion/PCGF4/nucleosome complex (PDB: 4R8P). Single E2-E3 ligase shown for clarity.

3. Régulation épigénétique de la transcription des gènes : cas Particuliers de H3K4me3 et H3K27me3

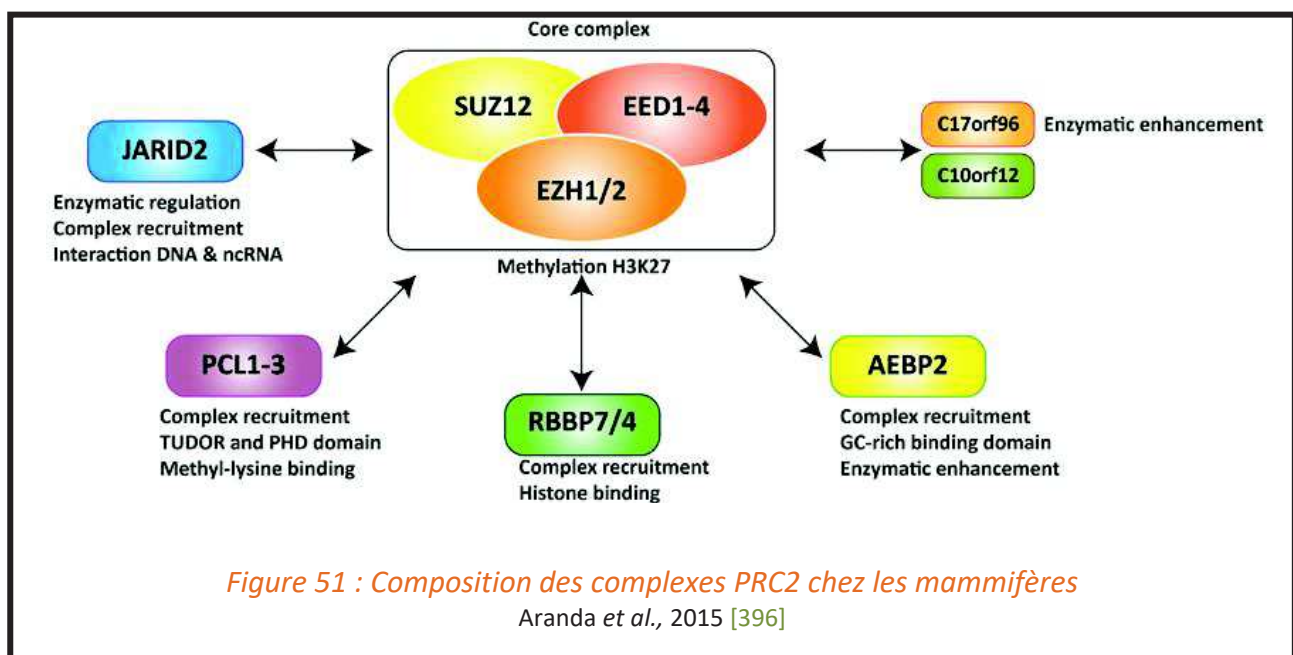
3.2.5 Polycomb Repressive Complexe 2 (PRC2)

3.2.5.1 Fonctions du complexe PRC2

Comme nous l'avons évoqué précédemment, le complexe PRC2 possède une activité histone méthyltransférase dépendante de la SAM et catalyse la mono, di et triméthylation de H3K27 [410-413]. Tout comme PRC1, PRC2 a initialement été identifié chez la drosophile comme répresseur des gènes HOX [391, 414]. Le complexe PRC2 est maintenant reconnu pour être impliqué dans une série de processus biologiques tels que : la prolifération cellulaire, la plasticité des cellules souches, la carcinogenèse ou encore l'inactivation du chromosome X.

3.2.5.2 Composition du complexe PRC2

PRC2, de la même manière que PRC1 est composé d'un noyau protéique, constitué de 3 sous unités protéiques essentielles : *i*) Suppressor of Zeste 12 Homolog (SUZ12), *ii*) Embryonic Ectoderm Development (EED) et *iii*) Enhancer of Zest Homologue 1 ou 2 (EZH1 ou EZH2) [410, 411, 415], auxquelles s'ajoutent des sous unités protéiques non essentielles (*Figure 51*).



3. Régulation épigénétique de la transcription des gènes : cas Particuliers de H3K4me3 et H3K27me3

SUZ 12 est une protéine possédant un domaine à doigt de zinc essentielle au fonctionnement enzymatique du complexe. EED possède un domaine WD qui reconnaît les peptides triméthylés et est responsable notamment de la propagation de la marque épigénétique H3K27me3 lors du cycle cellulaire. EZH1 ou EZH2 sont les enzymes qui possèdent l'activité catalytique du complexe grâce à leur domaine SET.

Ces trois composants sont présents dans une stœchiométrie 1 : 1 :1 [416] et sont suffisants pour induire la détection *in vitro* de l'activité HMT [417]. Il existe un nombre important d'isoformes de EZH et EED se traduisant par la possibilité d'assembler plusieurs complexes trimériques (*Figures 51, 52*).

EZH2 en soi ne présente pas d'activité méthyltransférase, l'activité catalytique de cette protéine requiert la présence minimale des deux membres du noyau de PRC2 (EED et SUZ12). D'autres partenaires peuvent s'ajouter et stimuler l'activité enzymatique de EZH2 tels que AEBP2 ou RBBP4 chez l'homme.

3.2.5.3 Partenaires et cofacteurs de PRC2

Le complexe trimérique central de PRC2 peut s'associer à différents polypeptides à des niveaux sous stœchiométriques aboutissant à la formation de complexes PRC2 différents dans un même type cellulaire. A ce jour, les cofacteurs identifiés de PRC2 sont : *i*) Retinoblastoma binding proteins 4 an 7 (Rbbp4/7), *ii*) Adipocyte enhancer binding protein 2 (Aebp2), *iii*) Juno AT-rich interactive domain 2 (Jarid 2), *iv*) PolyComb-Like 1 protein (PCL1) aussi connu sous le nom PHD Finger protein 1 (PHF1), *v*) PCL2 (aussi connu sous le nom MTF2 pour Metal response element binding Transcription Factor 2), *vi*) PCL3 (nommée également Phf19 pour PHD Finger protein 19) et *vii*) deux protéines spécifiques des mammifères C17orf96 et C10orf12. Certaines de ces sous unités peuvent être présentes dans le même complexe PRC2.

L'ajout des sous unités non essentielles permet de réguler l'activité enzymatique de PRC2 et/ou son recrutement vers des loci génomiques spécifiques.

Outre des partenaires protéiques, il a été démontré que Ezh2 peut interagir avec des longs ARNs non codants (lncARNs). Une étude récente d'immunoprécipitation d'ARN sur divers tissus a permis d'identifier un grand nombre de lncARNs interagissant avec EZH2

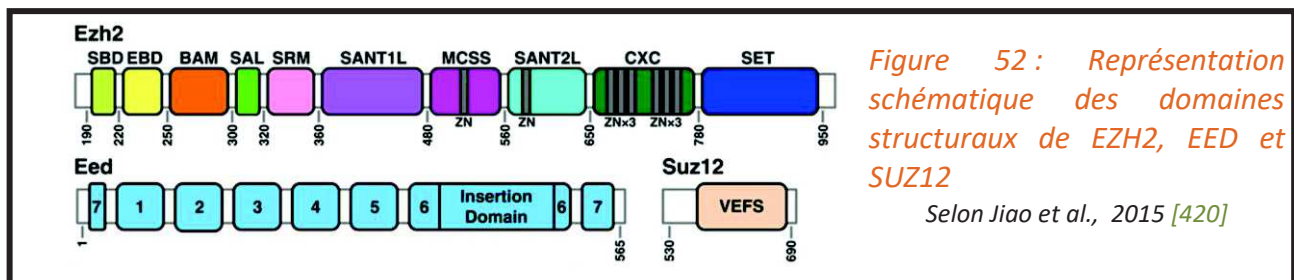
3. Régulation épigénétique de la transcription des gènes : cas Particuliers de H3K4me3 et H3K27me3

dont certains sont tissus spécifiques [418]. Parmi ces derniers, certains sont spécifiques du tissu cardiaque tel que Cardiac Hypertrophy Associated Epigenetics Regulator (CHAER) [418, 419] et HOx Transcript Antisense RNA (HOTAIR) [419].

3.2.5.4 Structure du complexe PRC2

Les sous unités principales du complexe PRC2 (EZH2, EED et SUZ12) possèdent différents domaines protéiques permettant leur interaction, la formation et la stabilisation du complexe.

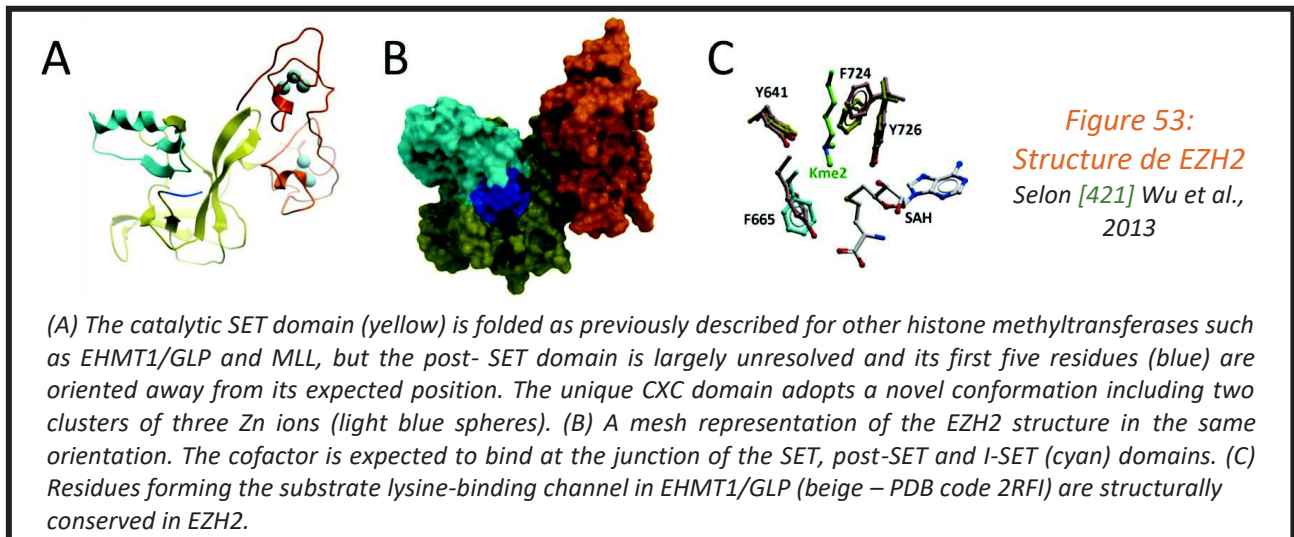
EZH2 possède un domaine SET dans sa partie C terminale lui conférant son activité enzymatique méthyltransférase. Ce domaine est une caractéristique conservée et partagée par les méthyltransférases (Figure 52).



Nom du domaine	Nom complet du domaine	Fonction et structure
SBD	SANT1L Binding Domain	Liaison au domaine SANT1L au niveau de la partie N-terminal Element en hélice
EBD	EED Binding Domain	Interaction avec la surface d'EED au niveau du domaine β -propeller Petites hélices suivies d'une région flexible en boucle
BAM		
SAL	SET Activation Loop	Connecte SET, MCSS et VEFS de SUZ12
SRM	Stimulation-Responsive Motif	Hélice mobile fonctionnelle en présence de H3K27me3.
SANT1L		Intéraction avec SBD pour former une boucle autour de EED
MCSS	Motif Connecting SANT1 and SANT2	Domaine contenant des motifs de liaison au zinc
SANT2L		Liaison avec VEFS de SUZ12 Domaine contenant des motifs de liaison au zinc
CXC	Cysteine rich domain	Contact direct avec SVEFS de SUZ 12, MCSS, SANT2L
SET	Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax	Activité méthyltransférase

Tableau 9 : Domaines structuraux de EZH2

3. Régulation épigénétique de la transcription des gènes : cas Particuliers de H3K4me3 et H3K27me3

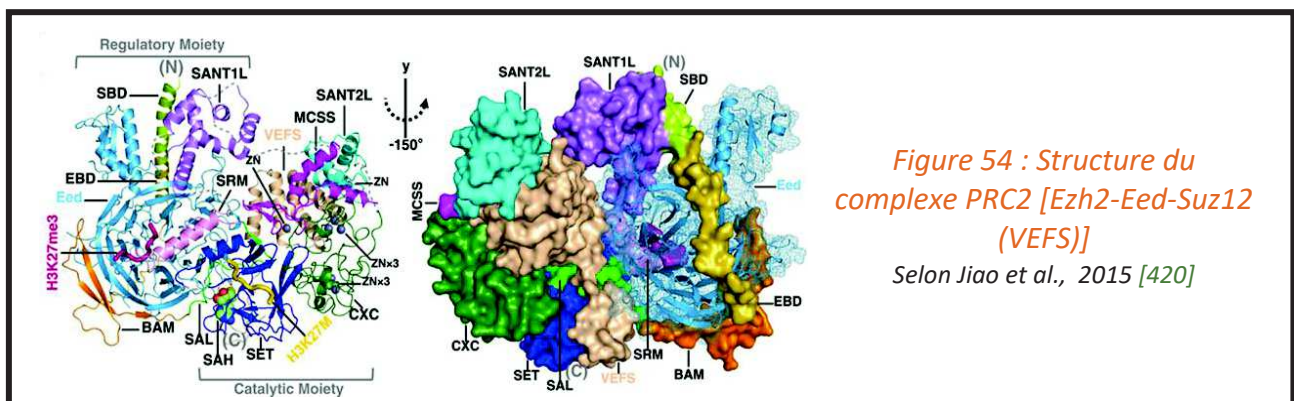


Selon les études de Jiao et collaborateurs chez le champignon filamentueux [420], la **protéine EZH2** est composée de différents domaines : *i)* SBD pour SANT1L Binding Domain, *ii)* EBD pour EED Binding Domain, *iii)* BAM pour β -Barrel Assembly Machinery, *iv)* SAL pour SET Activation Loop, *v)* SRM pour Stimulation-Responsive Motif, *vi)* SANT1L, *vii)* MCSS pour Motif Connecting SANT1 and SANT2, *viii)* SANT2L, *ix)* CXC pour Cysteine rich domain et *x)* SET (*Figure 52, 53 et Tableau 9*).

La **protéine EED** est composée de β -propeller, structures tertiaires qui composent le domaine WD40. Les β -propeller sont organisés en β feuillettes en forme de lame autour d'un axe central.

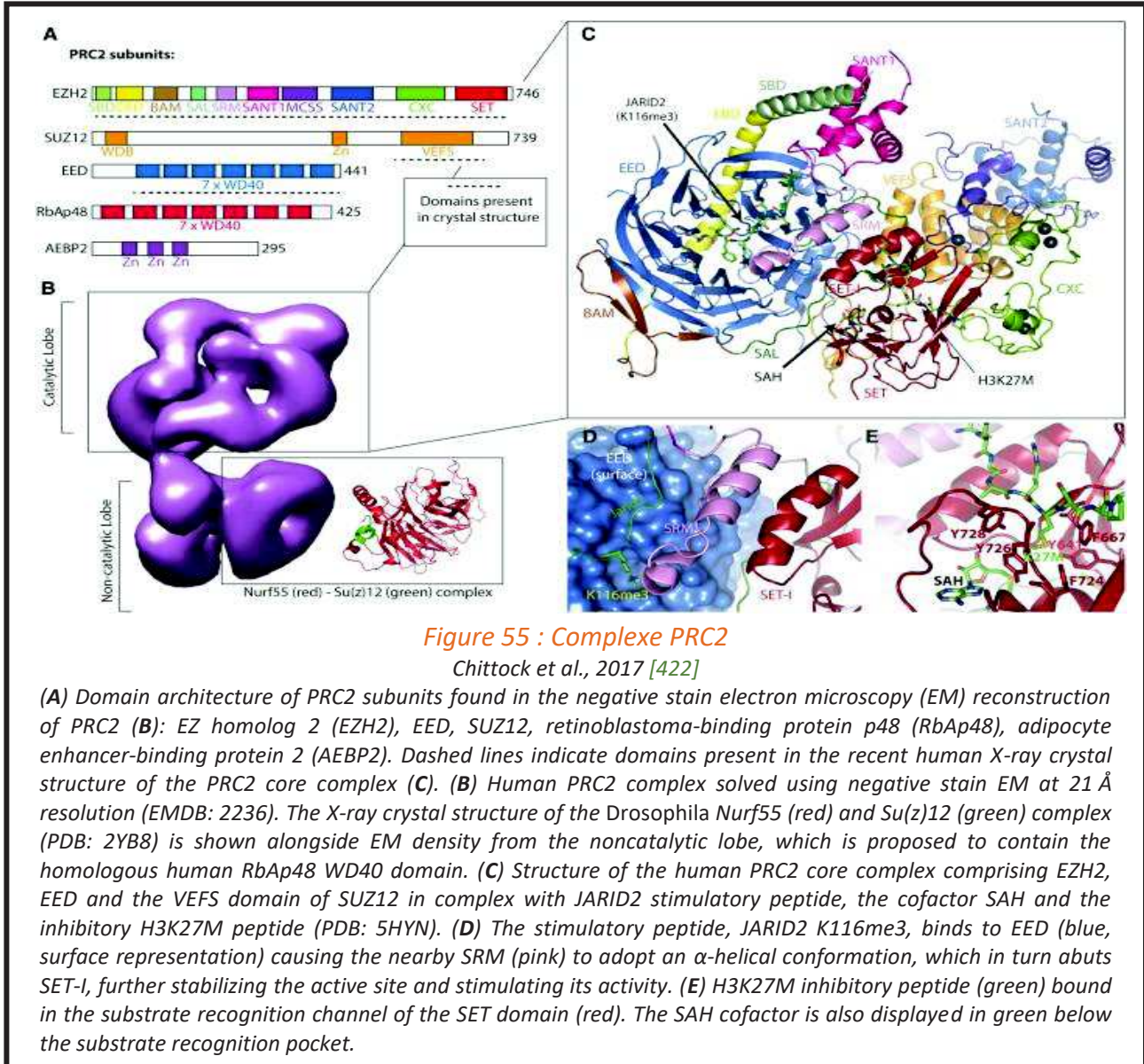
La **protéine SUZ12** est composée d'un domaine VRN2-EMF2-FIS2-SU(Z)12 (VEFS) de 160 acides aminés proches du domaine C-terminal, formé de 5 hélices, indispensable à la conformation correcte de EZH2.

La structure du complexe PRC2 a été mise en évidence par des études de cristallographie chez le champignon filamentueux *Chaetomium thermophilum* en 2015 par Jiao et collaborateurs [420] (*Figure 54*).



3. Régulation épigénétique de la transcription des gènes : cas Particuliers de H3K4me3 et H3K27me3

Au sein du complexe PRC2, la partie N-terminale de EZH2 entoure les domaines WD 40 de EED et sa partie C terminale forme un arrangement compact à la surface de SUZ12 (*Figure 55*).



La protéine EZH2 est codée par le gène *EZH2* situé sur le locus 7q36.1 du chromosome 7 chez l'Homme et le gène *Ezh2* sur le chromosome 6 chez la souris. Elle est exprimée par une large variété de types cellulaires parmi lesquels se trouvent les cardiomyocytes. Chez l'Homme et la souris, le domaine Nuclear Localization Sequence (NLS) s'ajoute aux différents domaines précédemment énoncés et décrits chez le champignon. Ce domaine permet l'importation nucléaire de la protéine EZH2. Elle possède une activité histone-méthyltransférase sur la lysine 27 de l'histone H3.

3. Régulation épigénétique de la transcription des gènes : cas Particuliers de H3K4me3 et H3K27me3

3.2.5.5 Importance de la sous unité EZH2 pour la mise en place de H3K27me3 :
PRC2-Ezh1 et PRC2-Ezh2

Comme abordé ci-dessus, deux HMTs peuvent composer le noyau du complexe PRC2. EZH1 et EZH2 sont ainsi mutuellement exclusives, et semblent présenter une expression complémentaire. EZH2 est fortement exprimé dans les tissus embryonnaires et les cellules en division alors que EZH1 semble plutôt exprimé dans les tissus adultes et les cellules quiescentes [396].

PRC2-Ezh2 méthyle efficacement H3K27, en revanche PRC2-Ezh1 n'a qu'une activité mineure de méthylation de cette lysine tant *in vitro* que *in vivo*. Ceci explique pourquoi la fonction de PRC2-Ezh2 dans la médiation de la répression génique est bien caractérisée tandis que celle de PRC2-Ezh1 est controversée.

Par ailleurs, cette incertitude sur la similitude entre EZH1 et EZH2 semble dépendre du contexte cellulaire. En effet, EZH2 et EZH1 ciblent tous les 2 les mêmes gènes et répriment la transcription dans les cellules de carcinome de souris. En revanche, dans les cellules musculaires, EZH2 et EZH1 ciblent des gènes différents : EZH2 est associé à la marque H3K27me3 et aux gènes dont la transcription est réprimée, alors que EZH1 est présent au niveau de la chromatine transcriptionnellement active où une majorité de modifications H3K4me3 est présente.

Une autre étude montre que PRC2-Ezh2 est remplacé par EZH1 au cours de la différenciation des myofibroblastes [423]. Ceci appuie l'hypothèse selon laquelle l'assemblage alternatif de composants centraux de PRC2 peut aboutir à des fonctions différentes, plutôt qu'à des complexes actifs complémentaires.

Par ailleurs, les modèles murins de souris KO-*Ezh2* se traduisent par une létalité embryonnaire. Ceci attire l'attention sur le fait que EZH1 ne semble pas être capable de compenser la perte d'expression de EZH2 et d'assurer correctement ou complètement la triméthylation de H3K27, mécanisme nécessaire au bon déroulement du développement embryonnaire.

3. Régulation épigénétique de la transcription des gènes : cas Particuliers de H3K4me3 et H3K27me3

3.2.6 Mécanismes de recrutement des PRCs à la chromatine

Aranda et collaborateurs [396] proposent trois grands mécanismes de recrutement (*Figure 56*). Le premier correspond à l'interaction des complexes PRCs avec des séquences spécifiques de l'ADN appelées DBD, tel que Kdm2b et Aebp2. L'interaction transitoire des complexes PRCs avec des FTs peut également médier le recrutement de ces derniers au niveau de séquences spécifiques de l'ADN. Le second mécanisme de recrutement fait intervenir les modifications d'histones d'ores et déjà déposées sur la chromatine qui peuvent « attirer » les complexes PRCs contenant des sous unités, telles que CBX ou PCL, capables de détecter ces modifications. Le troisième mécanisme, fait lui, référence au lncARNs, précédemment décrits, qui peuvent interagir avec les complexes PRCs et qui sont requis pour leur recrutement au niveau de la chromatine.

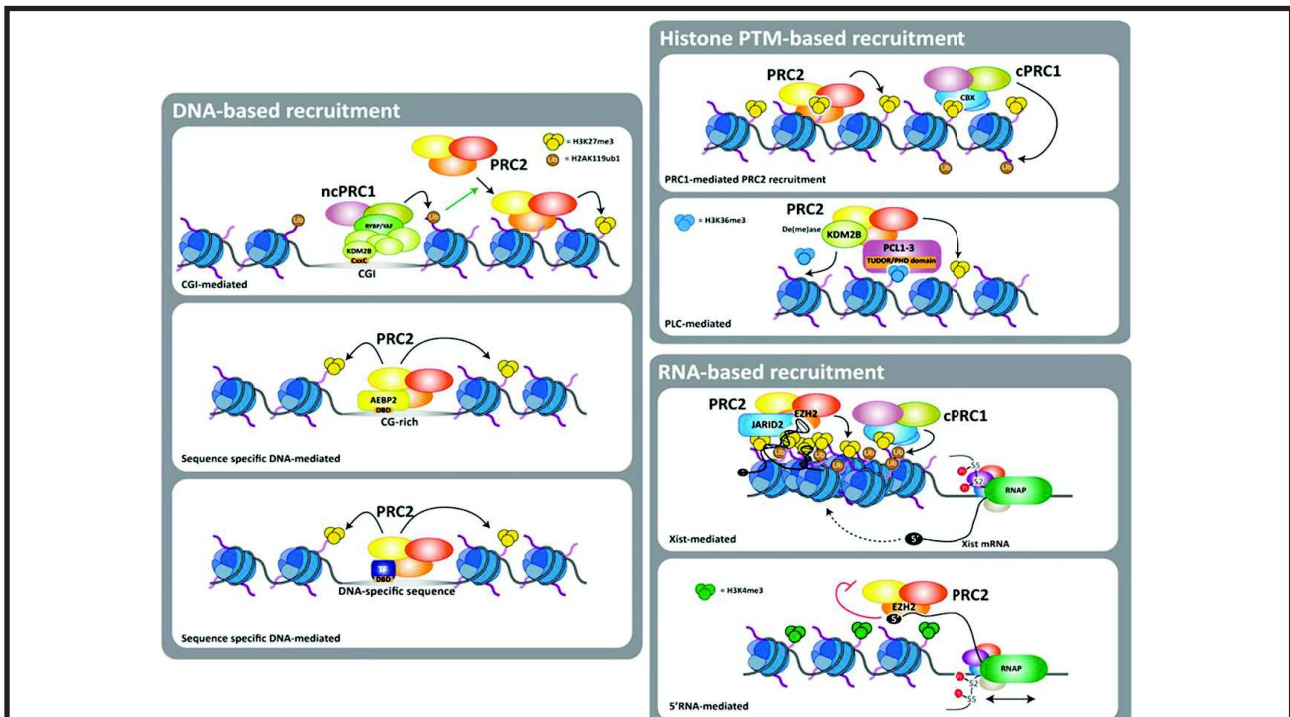


Figure 56 : Mécanisme de recrutement des PRCs à la chromatine

Aranda et al., 2015 [396]

(A à C) Trois mécanismes majeurs de recrutement des complexes PcG ont été proposés : (A) un mécanisme basé sur l'ADN dans lequel les complexes PcG sont ciblés sur des séquences d'ADN définies. Les domaines de liaison à l'ADN (DBD) présents dans différents complexes PcG, tels que Kdm2b ou Aebp2, peuvent servir de médiateur pour le recrutement vers les CGI des régions riches en CG. Une interaction transitoire avec des facteurs de transcription (TF), tels que Snail, peut également servir de médiateur au recrutement de PcG sur des séquences spécifiques de l'ADN ; (B) les modifications des histones peuvent également servir de médiateur au recrutement de PcG par leur interaction avec les "lecteurs" de chromatine présents dans les complexes PcG, tels que les protéines Cbx et PCL ; (C) les ARN non codants interagissent également avec les complexes PcG et sont nécessaires à leur recrutement sur la chromatine. Deux exemples de ceci sont le recrutement de PRC2 médié par Xist pendant XCI et par les transcriptions naissantes courtes des promoteurs actifs. Dans ce dernier cas, l'interaction avec les ARN 5'-nascents régule négativement l'activité méthyltransférase de PRC2.

3. Régulation épigénétique de la transcription des gènes : cas Particuliers de H3K4me3 et H3K27me3

3.2.7 Mécanismes de la régulation négative de la transcription par les PRCs

Chez les mammifères, trois mécanismes ont été proposés pour expliquer la répression de l'activité transcriptionnelle par les protéines PcGs (*Figure 57*).

Premièrement, dans les promoteurs bivalents présentant à la fois la marque H3K27me3 et H3K4me3, où les complexes PRCs maintiennent l'ARNpolII en équilibre au niveau du TSS et inhibent ainsi sa libération.

Deuxièmement, les complexes PRCs peuvent compacter la chromatine, bloquant l'accessibilité des complexes de remodelage de la chromatine, comme SWI/SNF, nécessaires lors de l'activation de la transcription. Notons que pour PRC1 cette activité de compaction de la chromatine semble indépendante de son activité catalytique.

Dernièrement, la désubiquitination et la déméthylation de l'histone H3 au niveau du corps des gènes, respectivement catalysé par PRC1 et PRC2, sont requises lors de l'élongation de la transcription. De cette façon, les modifications des histones apposées par les PRCs pourraient empêcher la progression de l'ARNpolII pendant l'élongation de la transcription.

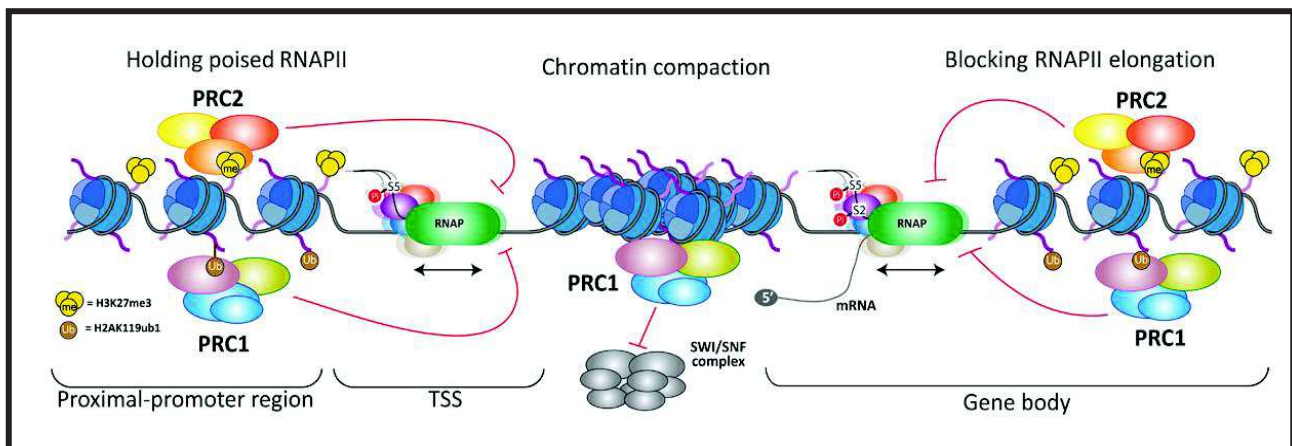


Figure 57 : Mécanisme de régulation négative de la transcription

Aranda et al., 2015 [396]

Trois mécanismes majeurs de répression ont été proposés. Premièrement, dans les promoteurs bivalents marqués par des PTMs d'histones à la fois répressifs (H3K27me3) et actifs (H3K4me3), les complexes PcG retiennent l'ARN pol II au site d'initiation de la transcription (TSS), inhibant ainsi sa libération. Deuxièmement, les complexes PcG peuvent compacter la chromatine. Quant à PRC1, sa capacité à compacter la chromatine semble être indépendante de son activité catalytique. Il est proposé que la compaction de la chromatine bloque l'accessibilité des complexes de remodelage de la chromatine, tels que le complexe SWI/SNF, qui est nécessaire pendant l'activation de la transcription. Troisièmement, la désubiquitination et la déméthylation de l'histone H3 au niveau des corps des gènes sont nécessaires pour une élongation efficace de la transcription par l'ARN pol II. Ainsi, les modifications des histones imposées par PcG au niveau des corps des gènes pourraient empêcher la progression de l'ARN pol II pendant l'élongation de la transcription.

3. Régulation épigénétique de la transcription des gènes : cas Particuliers de H3K4me3 et H3K27me3

Les protéines PcGs sont donc impliquées dans les mécanismes de régulation de la transcription, et les défauts d'expression de celles-ci sont associés à la survenue de plusieurs types de cancers, tant chez l'homme que chez la souris. Ceci suggère un rôle de ces protéines dans la différenciation et l'identité cellulaire. Ainsi, la communauté scientifique s'est tournée vers l'étude des mécanismes impliquant ces protéines PcGs tant dans le contexte de la différenciation des cellules souches que celui de la transformation en cellules cancéreuses.

4 PRC2, EZH2 et engagement dans une voie de différenciation cellulaire

4.1 PRC2 et différenciation des cellules souches embryonnaires

Les cellules souches (CSs) sont définies par leur capacité à se diviser et donner naissance à de multiples lignées de cellules différenciées. Les cellules souches embryonnaires (ES) sont pluripotentes, c'est à dire capables d'engendrer un grand nombre de types cellulaires chez l'embryon. Au cours de leur différenciation, la reprogrammation des CSs, implique une altération dynamique de l'état épigénétique de leur programme d'expression génique qui impliquerait les protéines PcGs.

Il est important de souligner que, chez l'Homme, il est impossible d'établir des lignées de cellules ES suite à des mutations de l'enzyme EZH2.

L'utilisation des techniques d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP pour Chromatine ImmunoPrecipitation) associées à des puces à ADN génomique a permis d'établir une cartographie de la distribution des protéines PcGs sur le génome. Il est important de noter que malgré l'utilisation de modèles biologiques variés (CS humaines, murines, de drosophile, cellules cancéreuses ou animaux entiers) une concordance des résultats a été obtenue.

Dans les cellules ES, 80% des gènes associés aux protéines PcGs ne sont pas transcrits. Ces gènes fixés par les protéines PcGs sont majoritairement des FTs impliqués dans les voies de régulation majeure contrôlant la différenciation et la prolifération cellulaire ou encore la morphogénèse [424].

Au fur et à mesure, les études ont mis en évidence que ces gènes réprimés dans les cellules ES deviennent actifs au cours de la différenciation cellulaire. Cette activation est accompagnée d'une perte de la fixation des protéines PcGs ainsi que la diminution la présence de la modification épigénétique répressive H3K27me3, et associée à la réoccupation de leurs promoteurs par l'ARN pol II et la présence de la modification épigénétique H3K4me3.

Le mécanisme de répression génique via les protéines PcGs pourrait permettre une certaine plasticité au cours du développement. En effet, certains gènes, les gènes bivalents portant, dans leurs régions régulatrices, simultanément les marques épigénétiques H3K27me3 et H3K4me3, sont maintenus à un niveau d'expression faible ou nulle par les

protéines PcGs mais prêts à être activés ou complètement inhibés selon l'engagement des cellules dans une voie de différenciation désirée [384].

4.2 PRC2, EZH2 et développement cardiaque

Les modifications épigénétiques sont extrêmement importantes au cours de l'organogenèse. Le complexe PRC2, responsable de la triméthylation de H3K27 favorise la différenciation spécifique des tissus inhibant les programmes d'expression de gènes ectopiques. De plus, EZH2 est indispensable à l'embryogenèse murine normale, comme le démontre la létalité embryonnaire précoce des embryons *Ezh2*^{-/-} [425]. En effet, EZH2 contribue au développement d'un certain nombre de tissus/organes (développement des cellules B, des follicules pileux et des membres). La détection par Caretti et collaborateur [426] de l'ARNm de EZH2 dans le cœur embryonnaire de souris en développement (E9,5) met en évidence son rôle potentiel dans la cardiogenèse. Le rôle de EZH2 au cours du processus de développement cardiaque n'est pas encore complètement élucidé et fait l'objet de multiples études dans des modèles murins d'inactivation/ inhibition cardiaque (tissus spécifique) de EZH2. La différenciation et le développement cardiaque sont des processus très organisés qui nécessitent l'interaction de plusieurs FTs. Les facteurs de modification de la chromatine, étroitement associés à ces processus de régulation de la transcription, sont impliqués dans la différenciation et le développement cardiaque physiologique, via leur action avec les FTs cardiaques et leurs cibles

4.2.1 Méthylation des histones et différenciation vasculaire

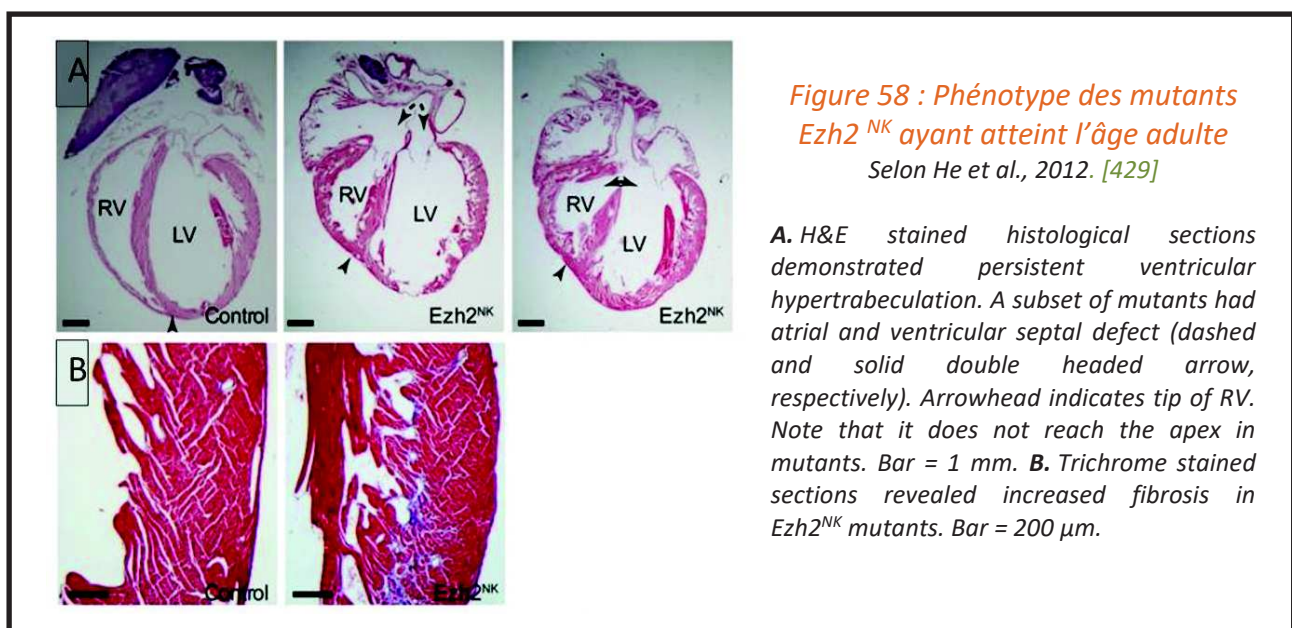
La méthylation des histones régule de façon importante l'expression des gènes et notamment de ceux impliqués dans la différenciation des cellules endothéliales. En effet, plusieurs études suggèrent l'implication de EZH2 dans la différenciation des cellules endothéliales. Plus précisément, l'inactivation de certains composants de PRC2 dont EZH2 induit la répression du récepteur Ephrin B2 et la répression d'autres gènes endothéliaux dans une lignée de cellules tumorales (A673). De plus, l'inactivation de EZH2 est associée dans plusieurs lignées de cellules tumorales à la formation du tube endothélial. Ceci suggère que EZH2 maintient les cellules tumorales dans un état épigénétique proche de celui des

cellules souches et régule négativement l'engagement endothélial et l'angiogenèse dans ce contexte [427]. Néanmoins d'autres études montrent que le VEGFA augmente l'expression de EZH2 dans les cellules endothéliales. Ceci réduit l'expression de la vasohibine 1, un inhibiteur de l'angiogenèse et ainsi stimule l'angiogenèse tumorale [428]. Ces résultats contradictoires soutiennent l'hypothèse d'un rôle différent de EZH2 dans les cellules tumorales par rapport aux cellules endothéliales. Ainsi, dans les cellules tumorales, EZH2 contribuerait au maintien de l'état souche et bloquerait la transdifférenciation endothéliale alors que EZH2 inhiberait les capacités angiogéniques des cellules endothéliales différenciées.

4.2.2 EZH2 et différenciation cardiaque

La fonction de EZH2 dans le développement du cœur a été étudiée par He et collaborateurs en utilisant une stratégie d'inactivation conditionnelle tissu spécifique chez la souris [429] (Figure 58). Ainsi, chez la souris EZH2 régule le développement normal du cœur de la souris.

L'inactivation de la sous-unité catalytique de PRC2, EZH2, par Nkx2-5(Cre) ($Ezh2^{NK}$) provoque des malformations cardiaques congénitales (hypoplasie myocardique, hypertrabéculatation, communication inter auriculaire/ventriculaire) [430].



Les analyses de CHIP couplées au séquençage des ARNm sur les cœurs des animaux $Ezh2^{NK}$ ont permis d'identifier les gènes directement réprimés par Ezh2. Parmi ceux-ci, se trouvent les inhibiteurs des kinases 4A et 4B dépendant des cyclines, *Ink4a/b*. Ce sont de puissants inhibiteurs du cycle cellulaire, et l'augmentation de leur expression dans les cœurs de souris $Ezh2^{NK}$ est associée à une diminution de la prolifération des cardiomyocytes. Ezh2 est également nécessaire à la régulation spatio-temporelle appropriée de l'expression des gènes cardiaques. Ainsi, l'inactivation précoce de Ezh2 dans les cardiomyocytes inhibe leur prolifération et donc le développement du cœur [429].

Une autre étude menée par Chen et collaborateur met également en évidence le rôle essentiel de EZH2 dans la formation de l'endocarde, la prolifération et la survie des cardiomyocytes. Chen et collaborateur utilisent un modèle murin d'inactivation cardiaque conditionnelle de EZH2 (*Nkx2.5-cre*) [431]. Le KO homozygote de EZH2 dans le cœur de ces souris entraîne des malformations cardiovasculaires létales avec sous-développement de l'endocarde, une diminution de la prolifération des cardiomyocytes et une augmentation de l'apoptose (*Figure 59*).

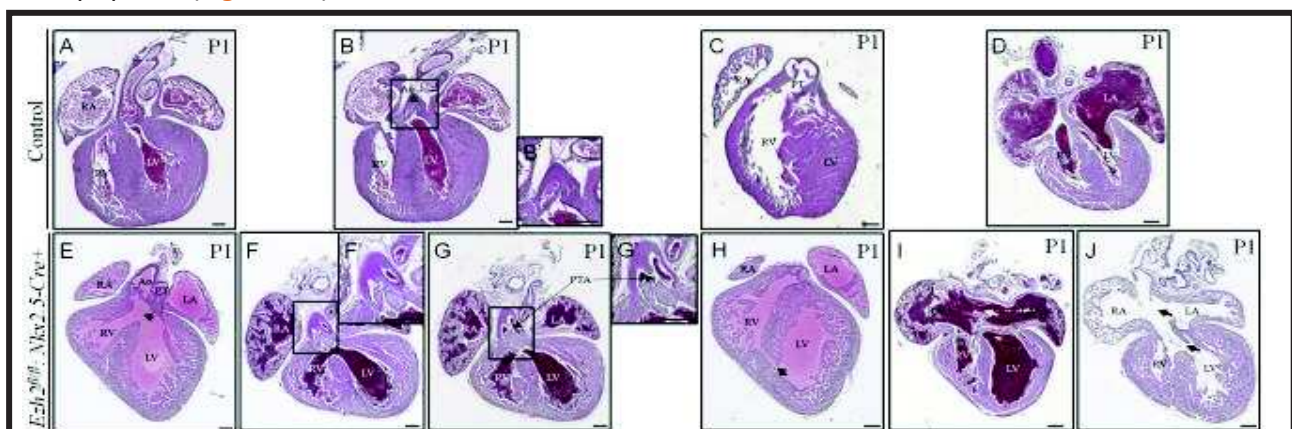


Figure 59 : caractérisation du phénotype cardiaque des souris $Ezh2$ -cKO

Selon Chen et al., 2012 [431]

(A–D) H&E staining of the coronal sections of the control mouse hearts at P1 showed normal structure of heart and great vessels. (E–J) H&E staining of the coronal sections of the $Ezh2$ -cKO ($Ezh2^{fl/fl};Nkx2.5-cre+$) hearts at P1 showed a variety of cardiovascular defects: E, double outlet right ventricle (DORV) and perimembranous ventricular septal defect (VSD, arrow); F & G, two serial sections showing the transition of persistent truncus arteriosus (PTA). F' and G' are the amplification of the boxed region in F and G, respectively. Arrows in G and G' indicate the septal opening; H, muscular VSD (arrow); I, atrial septal defect (ASD, arrow); J, atrioventricular canal defects (AVCD, upper arrow) and membranous VSD (lower arrow).

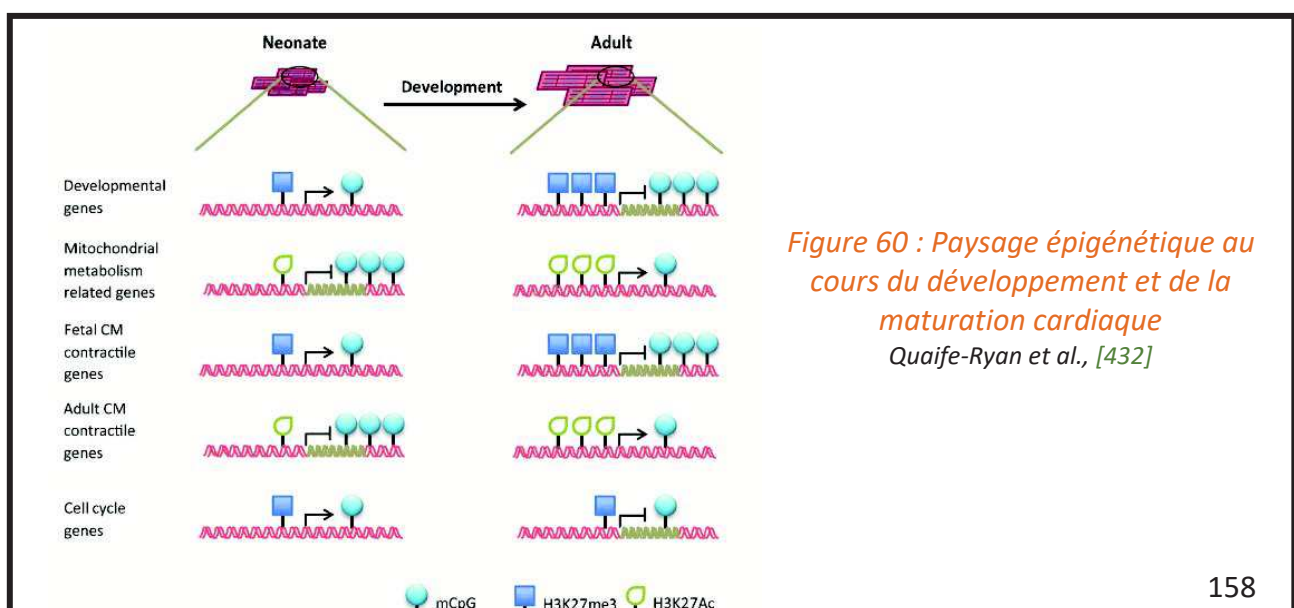
Ainsi, bien que l'expression de EZH2 soit requise pour la cardiogenèse physiologique, elle a aussi été corrélée avec le développement de pathologies cardiovasculaires chez l'adulte.

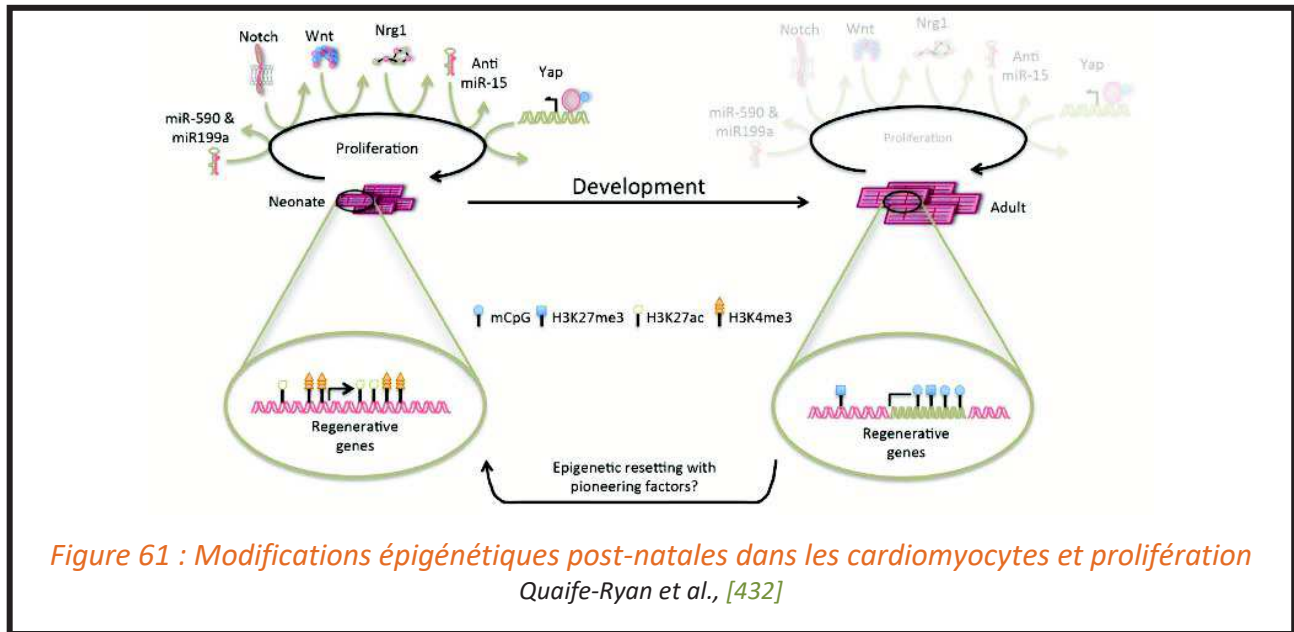
4.3 EZH2, pathologies cardiovasculaires et régénération cardiaque

La voie de signalisation Notch est impliquée dans la stimulation de la prolifération des cardiomyocytes au cours du développement embryonnaire et en période périnatale. Chez le poisson zèbre, la réactivation de cette voie de signalisation est essentielle au bon déroulement de la régénération cardiaque à la suite d'une lésion.

En période post-natale, les cardiomyocytes stoppent leur prolifération suite à la compaction de la chromatine pour les gènes de la voie de signalisation Notch qui se traduit par une diminution de celle-ci. La compaction de la chromatine est due le recrutement de EZH2 ajoutant la modification épigénétique H3K27me3 sur les régions promotrices des gènes codants pour des membres de la voie de signalisation Notch [432, 433] (Figure 60). L'activation provoquée de la voie Notch, à l'aide d'AAV par surexpression d'une forme activée du récepteur Notch1 ou son ligand Jagged1, étend la capacité proliférative des cardiomyocytes néonataux tout en maintenant la chromatine en conformation ouverte *i.e.* permissive à la transcription autour des promoteurs des gènes de la voie de signalisation Notch. Cette même stratégie adénovirale n'a cependant pas été suffisamment efficace dans les modèles murins (adultes) malgré une durée prolongée de l'expression du transgène [433].

Ainsi, la voie de signalisation Notch est cruciale pour réguler la prolifération des cardiomyocytes précocement après la naissance, mais semble inefficace pour permettre la régénération cardiaque chez l'adulte, dû au cumul de marques épigénétiques permanentes au niveau des promoteurs [432] (Figure 61).





Il semble donc primordial, dans les contextes pathologiques nécessitant la régénération cardiaque, d'intervenir le plus précocement possible dans la différenciation cellulaire. Il a récemment été démontré que l'inhibition de l'activité enzymatique d'EZH2 permet d'améliorer le potentiel régénératif de cellules progénitrices endothéliales dans le cadre de pathologies ischémiques [434]. En effet, dans le contexte des pathologies ischémiques les Endothelial Colony-Forming Cells (ECFCs) humaines représentent une source prometteuse de cellules souches, à condition de réussir à améliorer leurs capacités régénératives, en levant la répression exercée sur les voies de signalisation pro-angiogéniques. Dans cette étude, Fraineau et collaborateurs, ont mis en évidence que les principales voies de signalisation pro-angiogéniques sont réprimées dans les ECFCs par la présence de modifications épigénétiques H3K27me3. Dans ce contexte, le traitement épigénétique *ex vivo* réduit la présence de la modification épigénétique H3K27me3 sur le promoteur des gènes bivalents et confère un état transcriptionnellement actif à la chromatine augmentant le recrutement de la machinerie transcriptionnelle et notamment de l'ARN polIII. Ce traitement conduit à l'activation simultanée de plusieurs voies de signalisation pro-angiogéniques (VEGFR, CXCR4, WNT, NOTCH, SHH) aboutissant à l'amélioration de la capacité des ECFCs à former des réseaux capillaires *in vitro* et *in vivo* (Figure 62).

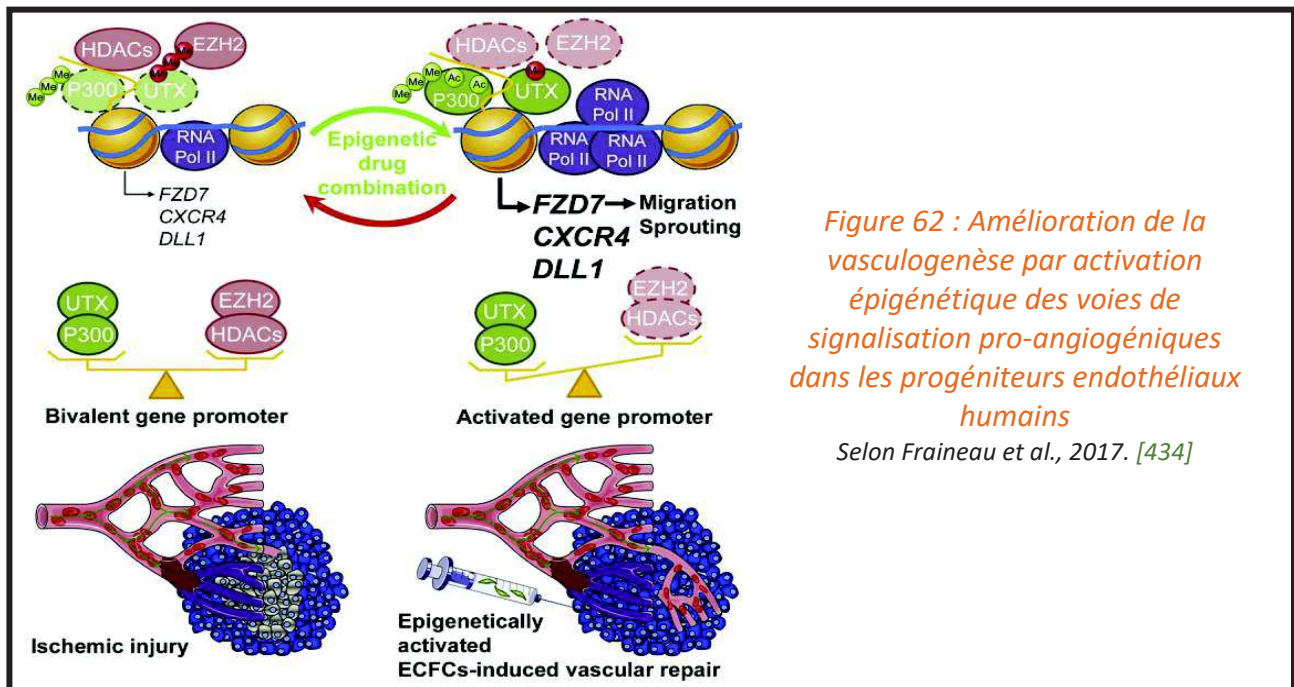


Figure 62 : Amélioration de la vasculogénèse par activation épigénétique des voies de signalisation pro-angiogéniques dans les progéniteurs endothéliaux humains

Selon Fraineau et al., 2017. [434]

Ainsi, l'activation transitoire des voies de signalisation pro-angiogéniques par un traitement épigénétique *ex vivo* des ECFCs augmente les propriétés de réparation vasculaire de ces dernières.

4.4 Dérégulation de EZH2 et activité oncogénique

De nombreuses études sur le génome des cellules cancéreuses ont révélé l'implication de EZH2 et de H3K27me3 dans le processus de tumorigénèse. En effet, EZH2 est fortement exprimé dans de nombreux cancers, comprenant les cancers du poumon, du sein, du côlon, de la prostate, de la vessie, du pancréas, les sarcomes et les lymphomes. La surexpression de EZH2 est, par ailleurs, corrélée avec les stades avancés de la progression tumorale et à un mauvais pronostic vital. De façon chiffrée, les mutations somatiques et les délétions de EZH2 sont observées dans 22% des lymphomes diffus à grandes cellules B, dans 7% des lymphomes folliculaires et dans 12 à 23% des patients atteints de troubles myélodysplasiques. Ainsi, la dérégulation de EZH2 est devenue un élément de la progression des cancers. De même, les mutations de certains régulateurs épigénétiques fonctionnellement liées à EZH2 sont associées au développement et à la progression des cancers. Ainsi, une mutation inactivatrice de UTX (enzyme antagoniste de EZH2 permettant

la déméthylation de H3K27me3) est souvent associée au développement de cancer signifiant une régulation positive de EZH2 [435].

Récemment, la communauté scientifique s'intéresse principalement à EZH2 dans le cadre du cancer tel que l'hépatocarcinome, où son inhibition induit la mort de cellules cancéreuses [436]. De plus, la surexpression d'EZH2 est associée à la répression de gènes suppresseurs de tumeurs ainsi qu'à la levée de l'inhibition de l'expression des gènes impliqués dans les métastases. Cette enzyme est aussi impliquée dans les phénomènes de résistance dans le cadre des traitements contre le cancer [436, 437].

Le complexe PRC2 est aussi impliqué dans diverses fonctions immunitaires. Gunawan et collaborateurs ont démontré l'implication de EZH2 dans 1) la régulation de l'activation des lymphocytes, 2) la modulation de la signalisation des intégrines, 3) la dynamique d'adhésion des neutrophiles et des cellules dendritiques [438]. Bantug et Hess attribuent un rôle à EZH2 lors de la stimulation des lymphocytes T et lors de la réponse anti-tumorale [439]. Enfin, selon Zhao et collaborateurs l'activation de EZH2, stimule l'expression de cytokines par les lymphocytes T, favorisant la survie des lymphocytes T et celle des patients [440].

Ainsi, l'inactivation de EZH2 s'est imposée comme une stratégie thérapeutique prometteuse dans le cadre des cancers et a conduit au développement d'inhibiteurs de PRC2 plus ou moins spécifiques de l'enzyme EZH2.

4.5 Découverte des inhibiteurs de EZH2

Compte tenu des preuves de l'activité oncogénique des mutations de EZH2 et de sa surexpression, EZH2 est devenu une cible thérapeutique intéressante dans le cadre du traitement des cancers. Trois groupes d'inhibiteurs du complexe PRC2 peuvent ainsi être décrits : *i*) les inhibiteurs non ciblés sur EZH2 (DZNep), *ii*) les inhibiteurs directs de petites molécules (GSK126, GSK-343, EPZ6438 et UNC1999) et *iii*) les inhibiteurs peptidiques (*Tableau 10*).

4.5.1 Les inhibiteurs non-ciblés

Le DZNep, un analogue cyclopentanyle de la 3-désazaadénosine, interfère avec la S-adénosyl-I-homocystéine hydrolase (SAH), entraîne une augmentation des niveaux de SAH cellulaire (*Tableau 10*). La SAH est le produit du transfert de méthyle de la SAM et un

puissant produit inhibiteur des méthyltransférases. Le traitement au DZNep a un effet anti-tumoral important dans différents types de cancer. La SAH elle-même peut être utilisée comme inhibiteur naturel en étant isolée à partir de cultures de *Streptomyces spp.* La sinéfungine est un autre inhibiteur, analogue naturel de la SAM et de la SAH. Cependant, il a été démontré par de nombreuses études que le DZNep induit la destruction du complexe PRC2 entraînant des effets secondaires non liés directement à l'inhibition de EZH2.

4.5.2 Les inhibiteurs directs de petites molécules

Le GSK126, GSK-343, EPZ6438 et UNC1999 sont des inhibiteurs de PRC2 compétitifs pour la SAM inhibant ainsi de manière spécifique l'activité catalytique de EZH2 (*Tableau 10*). Ils sont tous plus ou moins spécifique de EZH2 mais présentent au moins une affinité 60 fois supérieure pour celle-ci que pour EZH1.

Compound	Mechanism and potency	Selectivity	Indication and clinical status
DZNep	SAH hydrolase inhibitor	Non-selective	Various cancers/ Preclinical
SAH	Product of the reactions catalyzed by PMTs IC50 is 0.1 to 20 µmol/L	Non-selective	Preclinical
Sinefungin	Natural product analogue of SAM and SAH IC50 is 0.1 to 20 µmol/L	Non-selective	Preclinical
GSK126	SAM-competitive inhibitor of PRC2 Ki=0.5–3 nmol/L	>1000-fold over 20 other HMTs ~150-fold over EZH1	NHL or potentially other solid tumors
EPZ005687	SAM-competitive inhibitor of PRC2, Ki=24 nmol/L	>500-fold over 15 other HMTs ~50-fold over EZH1	Preclinical
E11	SAM-competitive inhibitor of PRC2 IC50=15 nmol/L, Ki=13 nmol/L	>10 000-fold over other HMTs ~90-fold over EZH1	NHL or potentially other solid tumors/ Preclinical
UNC1999	IC50<10 nmol/L	Non-selective for EZH1 ~10-fold	DLBCL/ Preclinical
GSK343	IC50=4 nmol/L	EZH2 selective, >1000 fold selectivity against other HMTs	Breast cancer and prostate cancer
EPZ6438*	Ki=2.5 nmol/L	EZH2 selective ~35-fold versus EZH1>4 500-fold relative to other HMTs tested	Advanced solid tumors or B-cell lymphoma Clinical Phase II
CPI360	IC50=0.5 nmol/L for wtEZH2 IC50=2.5 nmol/L for Y641N EZH2	EZH2 selective	NHL Preclinical
GSK503	IC50=8 nmol/L	EZH2 selective	DLBCL/ Preclinical
DCE_42	IC50=22.6 µmol/L	Not determined	DLBCL/ Preclinical
DCE_254	IC50=10.3 µmol/L	Not determined	DLBCL/ Preclinical
JQEZ5	IC50=11 nmol/L	EZH2 selective	B-cell lymphoma/ Preclinical
SAH-EZH2	Disrupt EZH2–EED interaction Kd=320 nmol/L for EED	EZH2 selective	B-cell lymphoma/ Preclinical

Tableau 10 : Inhibiteurs du complexe PRC2

Modifié de Shi et al., 2015 [435] *EPZ6438 (EPZ7438, Tazemetostat)

4.5.3 Peptide synthétique inhibiteur : SAH-EZH2

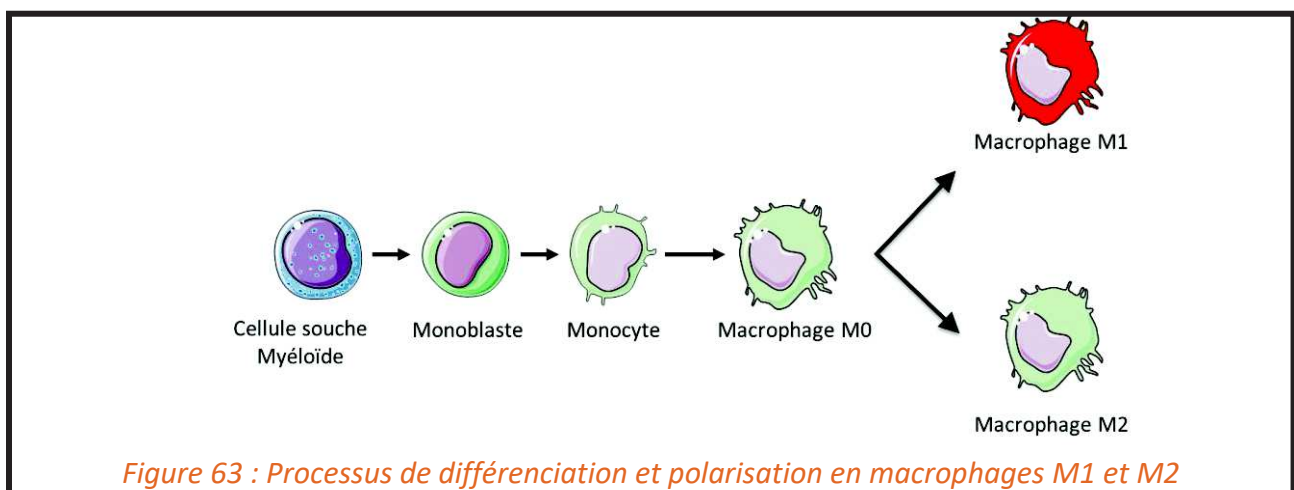
Le peptide SAH-EZH2 correspond à une hélice α - stabilisée de EZH2, basée sur la structure du complexe EED-EZH2 (*Tableau 10*). Ce peptide inhibe sélectivement la triméthylation de H3K27 de façon dose-dépendante en perturbant le complexe EZH2-EED.

Considérant son rôle dans l'inhibition de la transcription des gènes d'engagement cellulaires dans de nombreuses voies de signalisation, EZH2 constitue donc un candidat pertinent pour l'établissement d'une stratégie thérapeutique épigénétique. En effet, l'inhibition de EZH2 pourrait permettre de réexprimer transitoirement les gènes de différenciation cellulaire souhaités, en empêchant l'ajout de modifications épigénétiques répressives de la transcription (H3K27me3) supplémentaires. Je vais à présent aborder l'implication de EZH2 lors du processus de différenciation des monocytes en macrophages.

5 EZH2 et régulation épigénétique de la polarisation en M2

5.1 Différenciation des monocytes en macrophages

Comme nous avons pu l'évoquer précédemment, la différenciation des monocytes en macrophages est un processus finement régulé faisant intervenir de multiples acteurs tels que les cytokines et les facteurs de croissance. Ce processus débute avec une cellule souche myéloïde capable de se différencier en monoblaste puis en monocyte pour donner naissance à un macrophage de type M0, également appelé macrophage indifférencié. Ce macrophage M0, en fonction de son environnement et des différents stimuli qu'il reçoit, a la capacité de se polariser soit en macrophage de type M1, pro-inflammatoire, soit en macrophage de type M2 dont nous avons évoqué la capacité immunomodulatrice précédemment (*Figure 63*).



Plus précisément, les macrophages de type M2 (M2) modulent l'inflammation et la fibrose, favorisent l'angiogenèse et la lymphangiogenèse lors du remodelage et de la réparation cardiaques post-IDM, empêchant ainsi le développement de l'IC consécutive.

5.2 Expression génique différentielle : monocytes versus macrophages

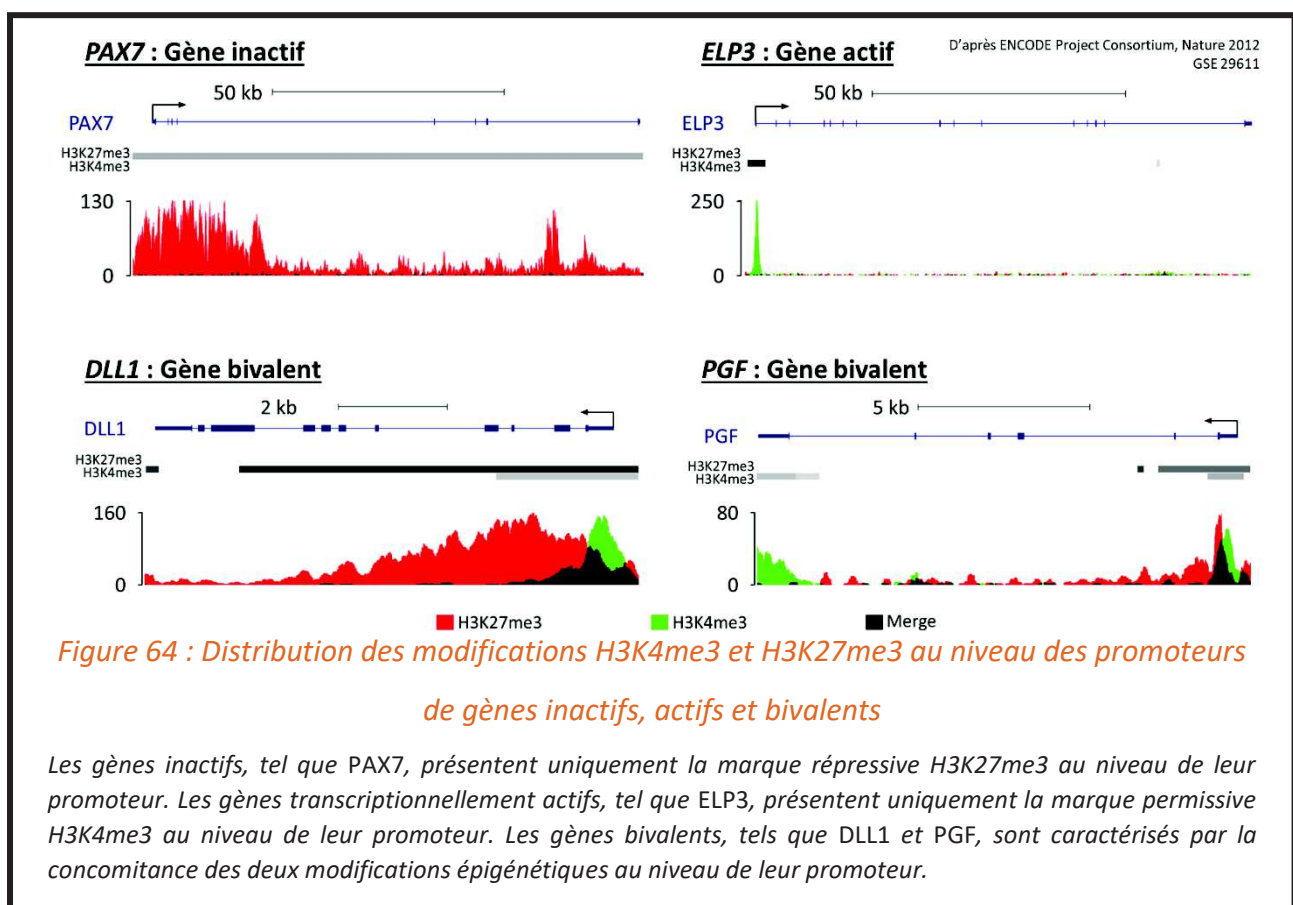
L'étude de Lehtonen et collaborateurs fournit la preuve expérimentale que le profil d'expression génique des monocytes est complètement différent de celui des macrophages [441]. Par analyse du transcriptome pendant la différenciation des macrophages, cette équipe met en évidence une surexpression de 340 gènes et une sous-expression de 190

gènes. L'une des catégories de gènes dont l'expression est modifiée est la catégorie des gènes bivalents.

5.3 Gènes bivalents dans les monocytes humains

Rappelons que les gènes bivalents correspondent aux gènes dont le promoteur porte à la fois les modifications épigénétiques H3K27me3 et H3K4me3 (*Figure 47 et 64*). L'expression de ces gènes pourrait être régulée par le retrait de l'une ou l'autre des modifications. Ainsi, le retrait de la marque répressive H3K27me3 favorise la transcription de ce type de gènes et le retrait de la marque H3K4me3 favorise la répression de la transcription de ce type de gènes (*Figure 47 et 64*).

L'analyse des données publiées de ChIPseq réalisée sur des monocytes humains pour ces deux marques épigénétiques permet d'extraire la liste des gènes bivalents présents dans les monocytes humains (D'après ENCODE Project Consortium, Nature 2012, GSE 29611)



L'analyse bio-informatique de ces gènes permet de constater que ces gènes bivalents sont impliqués dans les fonctions liées au fonctionnement du système cardiaque, du système vasculaire, du système lymphatique et dans les voies de signalisation canoniques (Figure 65).

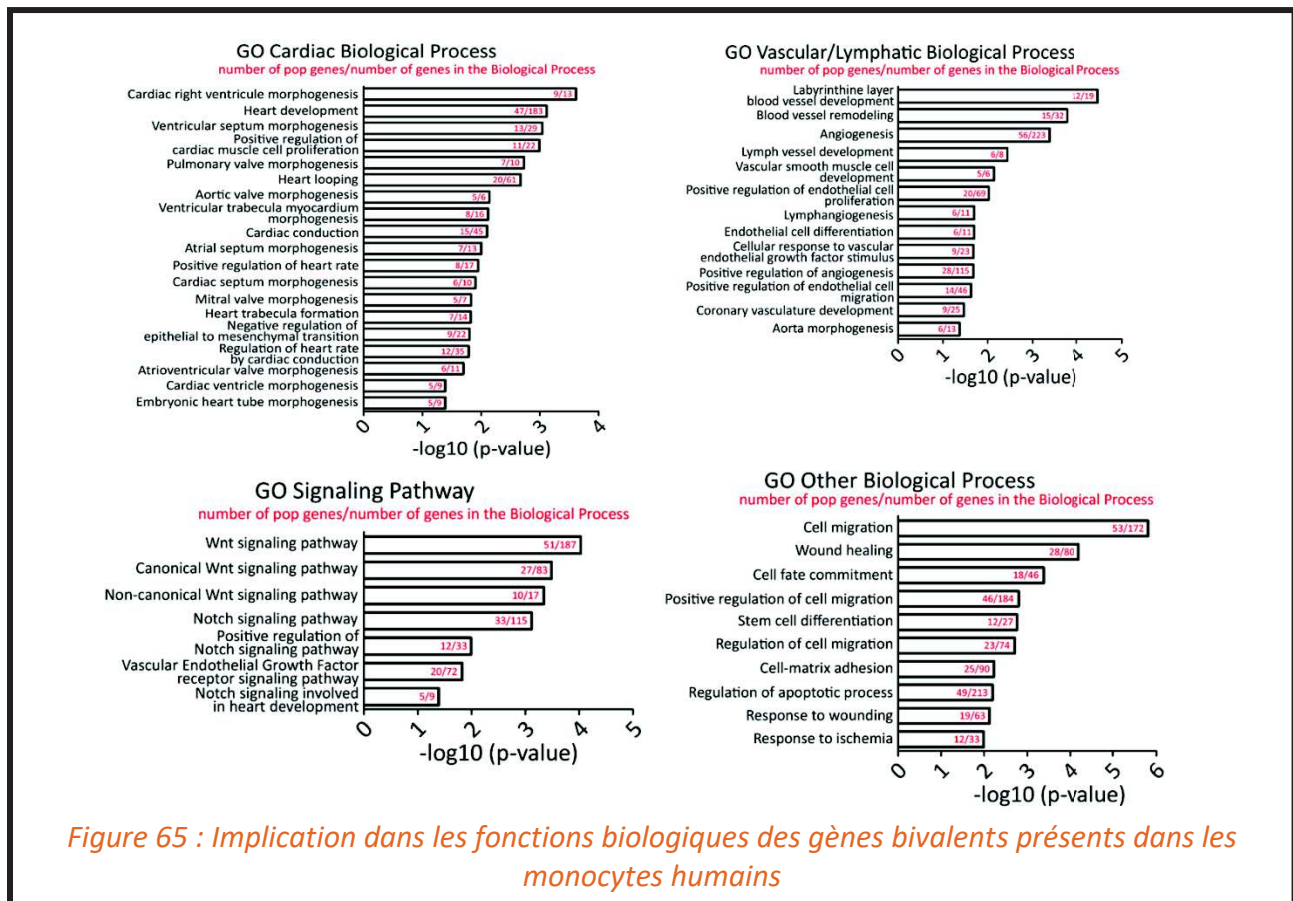


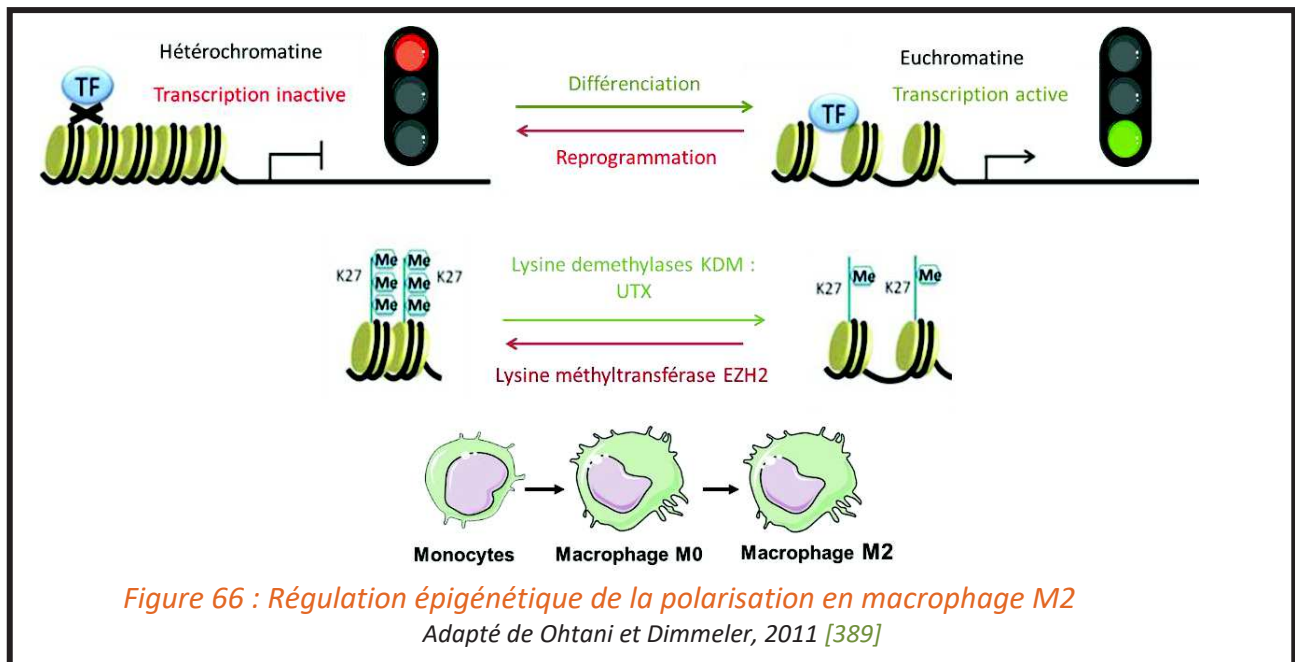
Figure 65 : Implication dans les fonctions biologiques des gènes bivalents présents dans les monocytes humains

La différenciation et la polarisation des monocytes en macrophages de types M2, fait intervenir différents FTs dont l'expression peut être régulée par les enzymes épigénétiques. La plupart des enzymes modificatrices d'histones, contrôlent souvent directement les activités des facteurs de transcription et les voies de signalisation, modulant les décisions relatives au destin des cellules.

5.4 Activation et polarisation des macrophages : implication de H3K27me3 et EZH2

Des preuves de plus en plus nombreuses incriminent H3K27me3 comme un mécanisme important pour réguler l'activation et la polarisation des macrophages [442-444]. La marque répressive H3K27me3 est générée par le complexe PRC2, contenant l'histone

méthyltransférase EZH2. Inversement, la méthylation de H3K27 est activement retirée par deux histones déméthylases : Jmjd3 et Utx (*Figure 66*).



Jmjd3 a été décrit comme un régulateur essentiel de la polarisation des M2. De fait, l'activité de Jmjd3 permet de retirer la H3K27me3 du promoteur du FT *Irf4* augmentant ainsi son expression ainsi que celle de ses gènes cibles : *Arg1*, *Chi3l3*, *Retnla* et *CCL17*, suite à une infection parasitaire [445, 446] par les helminthes ainsi que suite à la stimulation des monocytes humains [447] ou des macrophages murins avec de l'IL-4. L'implication de Jmjd3 dans le processus de polarisation des macrophages est bien établie. Le rôle de son partenaire antagoniste, Ezh2, reste cependant à confirmer (*Figure 67*). En effet, l'induction, par l'IL-4, de la polarisation des monocytes murins issus de la moelle osseuse et humains en M2, met en jeu JMJD3. Cette enzyme favorise l'expression du facteur de transcription *IRF4*, en supprimant la marque répressive H3K27me3 sur son promoteur levant ainsi la répression transcriptionnelle. IRF4 peut alors se lier sur les séquences consensus des promoteurs de ses gènes cibles impliqués dans la différenciation et la polarisation en M2 tels que *Arg1*, *Chi3l3*, *Retnla* et *CCL17* (*Figure 67*).

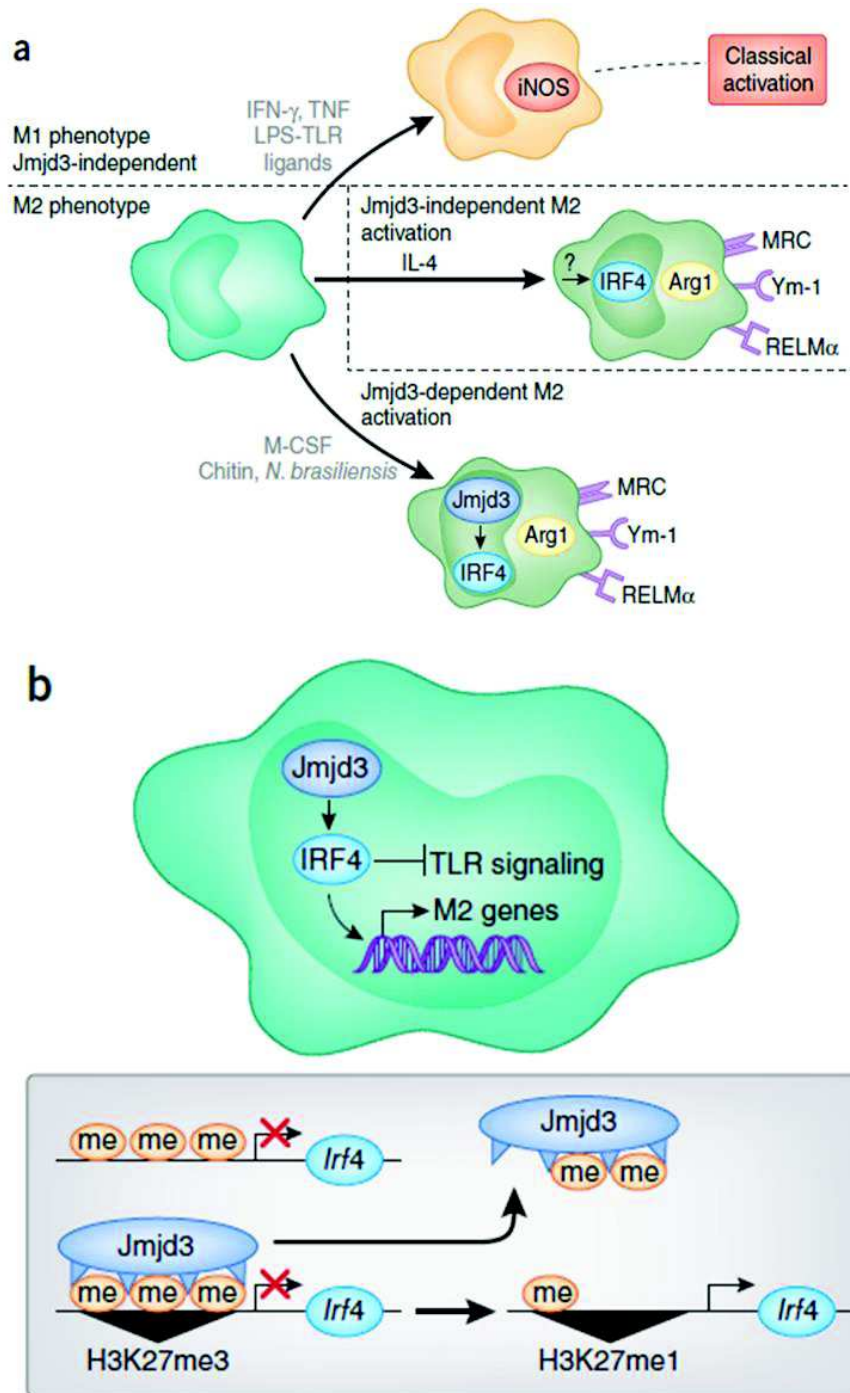


Figure 67 : Contrôle épigénétique de l'activation alternative des macrophages (M2)

(a) Bien que non requis pour l'activation en macrophages M1, Jmjd3 peut avoir des rôles différents dans la polarisation en macrophages M2 selon les stimuli du microenvironnement. La stimulation de macrophages naïfs par l'IL-4 entraîne la polarisation vers un phénotype M2 en l'absence d'expression de Jmjd3. L'activation de M2 par le M-CSF, chitine ou *N. brasiliensis* se produit d'une manière dépendante de Jmjd3 et de IRF4. IFN-γ, interféron-γ; TNF, tumor necrosis factor; LPS, lipopolysaccharide; TLR, Toll-like receptor; iNOS, inducible nitric oxide synthase; Arg1, arginase-1; MRC, mannose receptor; Ym-1, chitinase-like molecule; RELMα, resistance-like molecule-α. (b) L'une des cibles de la déméthylation de Jmjd3 est la région promotrice du gène *Irf4*. Jmjd3 catalyse le retrait de deux groupements méthyle de H3K27, levant la répression transcriptionnelle. Ainsi, une augmentation de l'expression de *Irf4* dépendant de Jmjd3 dans les macrophages peut augmenter l'expression des gènes spécifiques des macrophages M2.

Ainsi, diminuer les niveaux de H3K27me3 permettrait d'améliorer l'expression des gènes spécifiques des M2, sans aucun changement sur l'expression des gènes spécifiques des macrophages M1 (par exemple Nos2) [444, 446, 447].

Récemment, des études de KO-EZH2 ont été associées avec une réduction de la sécrétion de cytokines et un moindre développement de maladies dépendantes des macrophages, suggérant l'implication de EZH2 lors de l'activation des macrophages (*Figure 68*) [448, 449].

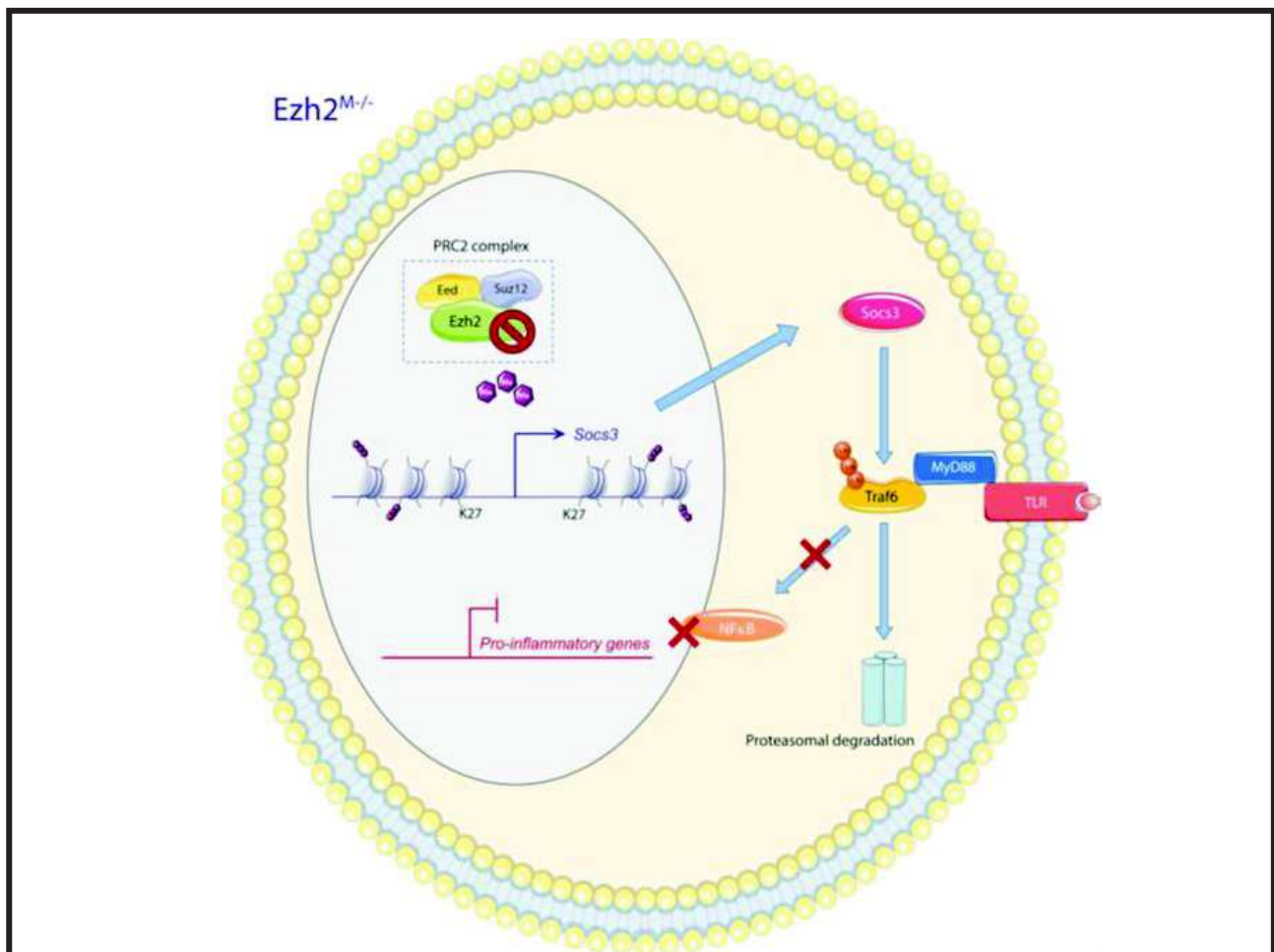


Figure 68 : inhibition de EZH2 et de l'inflammation médiée par Socs3

Selon Neele et al., 2018 [448]

Macrophage Ezh2 deficiency reduces suppressive H3K27Me3 marks at the Socs3 transcriptional start site and distal enhancer, resulting in increased Socs3 expression. Cytosolic Socs3 inhibits proinflammatory gene expression by targeting the TLR-induced MyD88–TRAF6–NF-κB signaling pathway. Socs3 enhances TRAF6 ubiquitination, resulting in its proteasomal degradation, and thereby suppresses activation of NF-κB-dependent inflammatory genes.

Objectifs de l'étude

Les données de la littérature suggèrent que la méthylation de H3K27, par Ezh2, favoriserait l'activation des macrophages en M1 pro-inflammatoires notamment dans les pathologies auto-immunes, tandis que la déméthylation de H3K27 favoriserait la différenciation et la polarisation en M2 immunomodulateurs.

Dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse que EZH2, responsable de la méthylation de H3K27, pourrait agir comme un point de contrôle épigénétique pendant la différenciation des monocytes en M2, régulant la réparation cardiaque après un IDM (*Figure 69*). Ezh2 représenterait donc une cible thérapeutique attrayante pour concevoir de nouveaux traitements des conséquences de l'IDM à l'aide d'inhibiteurs épigénétiques pharmacologiques.

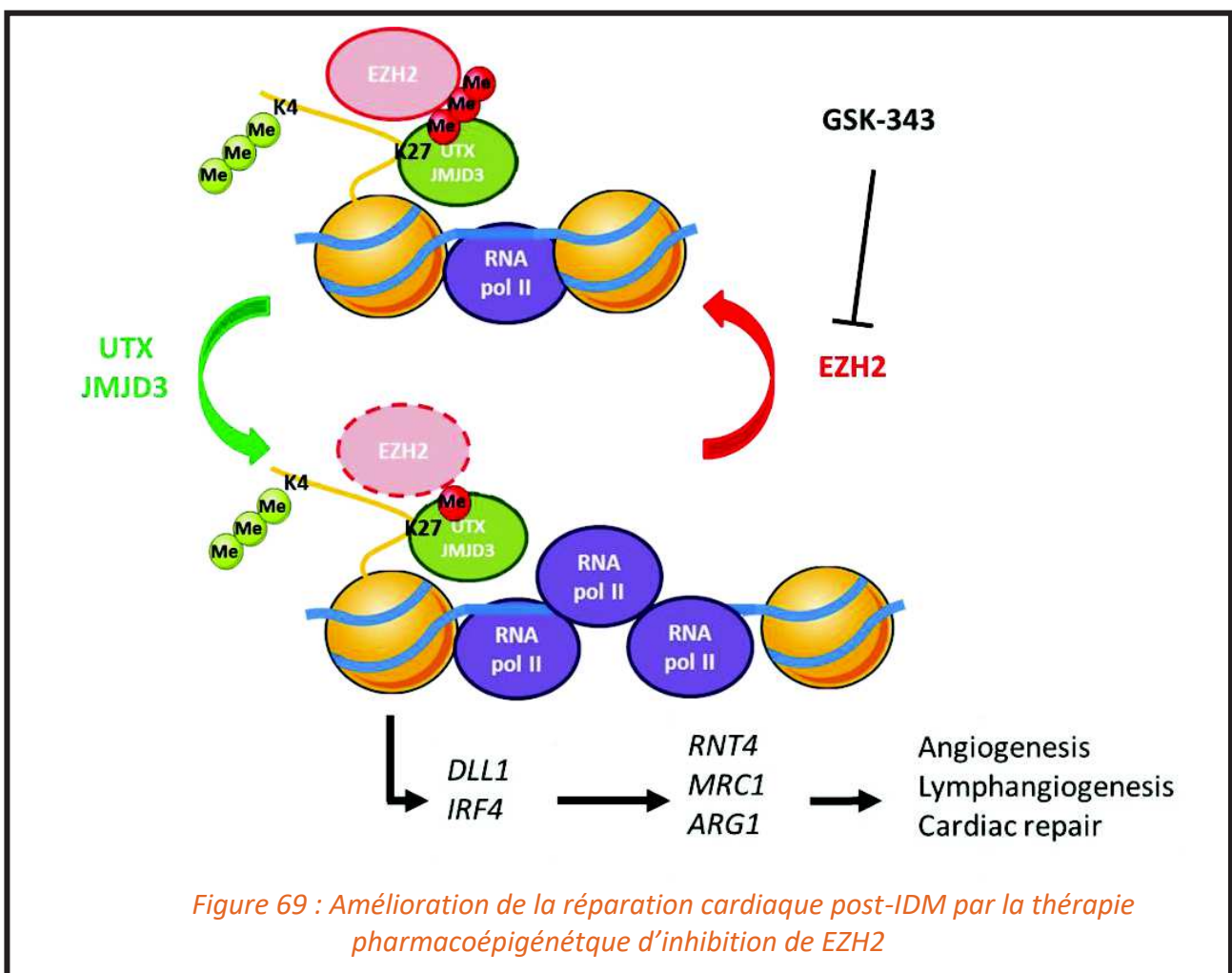


Figure 69 : Amélioration de la réparation cardiaque post-IDM par la thérapie pharmacoépigénétique d'inhibition de EZH2

Objectifs de l'étude

Dans un premier temps, ces travaux de thèse se sont intéressés à la mise en évidence de la localisation cellulaire de EZH2. Nous avons démontré *in vivo* que cette enzyme, habituellement localisée au niveau nucléaire, comme cela est le cas dans les monocytes et macrophages M1 est transloquée au niveau cytoplasmique chez les macrophages M2, dans un modèle murin d'IDM par ligature de l'artère coronaire gauche.

Dans un second temps, souhaitant élucider les mécanismes moléculaires impliquant la délocalisation de Ezh2 dans la polarisation en macrophage M2, nous avons reproduit ces observations de localisation subcellulaire de Ezh2 *in vitro*, dans plusieurs modèles cellulaires : *i*) lignée cellulaire de monocytes murins, *ii*) lignée de macrophages M0 murins, *iii*) précurseurs myéloïdes issus de la moelle de souris, *iv*) monocytes murins périphériques après sélection négative dans le sang et *v*) monocytes humains après sélection négative. Ces différentes études ont permis de caractériser le phénotype des macrophages M2 obtenus *in vitro* tant d'un point de vue des marqueurs de surface (par cytométrie en flux et immunocytochimie) que de l'expression des gènes caractéristiques des différents types de cellules myéloïdes obtenues par des protocoles bien caractérisés de différenciation *in vitro*.

Également, nous avons évalué *in vitro* l'efficacité du GSK-343, à promouvoir la polarisation des monocytes en macrophages M2. D'une part, en vérifiant la répartition et la présence de la modification épigénétique H3K27me3, par la technique de CHIP, après traitement avec un inhibiteur de l'activité de EZH2, le GSK-343. Cette même technique nous a permis de vérifier que le traitement avec le GSK-343 n'altère ni la répartition, ni le taux d'expression de la modification épigénétique H3K4me3 mais réduit le taux de H3K27me3 au niveau du promoteur de gènes spécifiques appelés bivalents. D'autre part, nous avons vérifié que les cellules générées par culture *in vitro* des monocytes étaient d'avantage semblables aux macrophages M2 qu'aux autres types de cellules myéloïdes considérées, par analyse transcriptomique ciblée.

Un autre point d'intérêt au cours de ces travaux de thèse, a été d'établir l'antériorité de la délocalisation de EZH2 par rapport à l'acquisition du phénotype immunomodulateur M2. Cette observation apporte ainsi la preuve de concept que l'inhibition de EZH2 pourrait permettre de favoriser la polarisation en M2. Ceci a été réalisé par des analyses immunocytochimiques et par RTqPCR sur les monocytes cultivés *in vitro* tout au long du processus de différenciation en macrophage M2. Cette chronologie soutient notre

Objectifs de l'étude

hypothèse, selon laquelle l'inhibition de Ezh2 serait une stratégie pharmacoépigénétique permettant de favoriser la polarisation en macrophages M2 immunomodulateurs post-IDM.

La fin de ce projet de thèse correspond à l'évaluation *in vivo* de ce traitement par le GSK-343 dans un modèle murin d'IDM par ligature permanente de l'artère coronaire gauche.

Ces travaux de thèse ont démontré l'implication de EZH2 dans le processus de différenciation et de polarisation des monocytes en macrophages M2. Le traitement des monocytes avec un inhibiteur spécifique de l'activité enzymatique de EZH2, le GSK-343, est capable de promouvoir ce processus. Cela apporte des preuves de l'intérêt de la mise en place d'un traitement pharmaco-épigénétique post-IDM.

Résultats

Cette partie présenter tout d'abord les principaux résultats obtenus lors de mon projet de thèse sous la forme d'un article en révision dans le journal Nature Communications.

Par la suite, deux articles pour lesquels je suis cosignataire sont indexés et correspondent à mon implication dans d'autres projets du laboratoire.

Enfin, les annexes à la fin de ce manuscrit présentent d'autres articles de collaboration, publiés durant mon projet de thèse, concernant des expériences réalisées lors de mes stage de master et en tant que technicienne de laboratoire ainsi que mon *curriculum vitae*.

Article de thèse

Cet article est actuellement en révision dans le journal Nature Communications.

Mes travaux de thèse visent à mettre en évidence le potentiel thérapeutique d'une stratégie pharmaco-épigénétique modulant les populations de cellules immunitaires dans le contexte pathologique de l'IDM. Plus précisément, dans le cadre de ce projet, nous émettons l'hypothèse d'une amélioration de la réparation cardiaque post-IDM par la mobilisation des populations de macrophages M2, immunomodulateurs, essentiels lors de celle-ci. De plus en plus d'éléments de la littérature apportent des preuves de l'implication de la modification épigénétique H3K27me3 dans le mécanisme de polarisation des macrophages en macrophage M2. En effet, cette modification épigénétique, mise en place par l'enzyme Ezh2, semble bloquer l'expression des gènes de polarisation en macrophage M2.

Nous avons donc, dans un premier temps, étudié l'implication de cette enzyme au cours du processus de différenciation en macrophages M2. Nous avons ainsi étudié la localisation subcellulaire de Ezh2 *ex vivo* et *in vitro* dans les populations de cellules myéloïdes. Ceci nous a permis de mettre en évidence une localisation cytoplasmique de cette enzyme chez les M2 alors qu'elle se trouve localisée dans le noyau des autres types de cellules myéloïdes. Cette localisation cytoplasmique de Ezh2 pourrait induire son inactivité et serait nécessaire pour la polarisation en macrophages M2.

Dans un second temps, nous avons traité *in vitro* des monocytes murins et humains avec un inhibiteur spécifique de l'activité de Ezh2, le GSK-343, dans le but d'identifier l'ensemble des gènes dont l'expression est modifiée directement ou indirectement par Ezh2. Ceci nous a permis de mettre en évidence l'efficacité de cet inhibiteur épigénétique pour produire rapidement (en 3 jours), à partir de monocytes, des monocytes au profil transcriptionnel proche de celui des macrophages M2. De plus, nous avons observé une augmentation de l'expression des gènes appartenant à la catégorie des gènes bivalents. Ce phénomène résulte de la diminution spécifique de la présence de la marque H3K27me3 au

Résultats

niveau du promoteur de ces gènes suite à l'inactivité de EZH2. De surcroît, ces gènes bivalents surexprimés après le retrait de cette modification épigénétique, sont impliqués dans des fonctions biologiques favorables à une meilleure réparation cardiaque post-IDM. Ce phénomène n'est pas spécifique ou restreint aux monocytes circulant suite à un IDM étant donné que des résultats similaires ont été obtenus avec des monocytes issus de patients non coronariens, coronariens ou ayant subi un IDM.

Enfin, compte tenu de tous ces éléments, nous avons testé l'efficacité de ce traitement pharmaco-épigénétique dans un modèle murin d'IDM, provoqué par ligature de l'artère coronaire gauche. Notre modèle est un modèle global, d'injection Intra-Péritonéale (IP) du GSK-343. Ce modèle nous a permis de mettre en évidence une accélération de la résolution de l'inflammation chez les souris traitées par rapport aux souris contrôles, limitant l'expansion de la taille de la zone d'infarctus et la dysfonction cardiaque qui en découle.

En conclusion, ce projet montre le potentiel prometteur d'une stratégie thérapeutique par modulation épigénétique, de l'infiltration des cellules immunitaires myéloïdes au sein du tissu cardiaque, en limitant le remodelage cardiaque délétère observé à la suite d'un IDM.

Cet article compte 16 auteurs, leur implication est détaillée ci-après : j'ai participé à la conception, la réalisation et l'analyse de toutes les expériences *in vivo* et *in vitro*. Déborah Groussard a réalisé et analysé les échocardiographies chez la souris. Sylvanie Renet a participé aux expériences d'expression génique. Virginie Tardif a réalisé l'acquisition des données de cytométrie en flux et leur analyse. Anaïs Dumesnil a participé à la réalisation et à l'analyse des expériences d'immunohistochimie. Alphonse Chu et Marjorie Brand ont réalisé les analyses de CHIP-seq et RNA-seq. Jean-Paul Henry a réalisé les ligatures coronaires sur les souris. Zina Badji et Claire Vézier ont coordonné le recueil des échantillons de sang humain au sein du service de cardiologie du CHU de Rouen. Delphine Béziau et Eric Durand nous ont aidés dans la conception et la coordination du protocole de recueil des échantillons de sang humain au sein du service de cardiologie du CHU de Rouen (EPICAM). Dominique Guerrot et Vincent Richard ont été consultés pour leurs conseils avisés notamment sur le modèle murin. Ebba Brakenhielm a participé à la conception de l'étude *in vivo*. Sylvain Fraineau a supervisé et participé à toutes les expérimentations *in vitro* et *in vivo* de ce projet. Sylvain Fraineau, Ebba Brakenhielm et moi-même avons participé à l'écriture de cet article.

Ezh2 as an epigenetic checkpoint regulator during monocyte differentiation: a potential target to improve cardiac repair after myocardial infarction

Rondeaux Julie¹, Groussard Déborah¹, Renet Sylvanie¹, Tardif Virginie¹, Dumesnil Anaïs¹, Chu Alphonse², Henry Jean-Paul¹, Badji Zina³, Vézier Claire³, Béziau Delphine³, Guerrot Dominique^{1,4}, Brand Marjorie², Richard Vincent^{1,5}, Durand Eric^{1,3}, Brakenhielm Ebba¹, Fraineau Sylvain^{1*}

¹ UNIROUEN, INSERM U1096, FHU CARNAVAL, Normandy University, F-76000 Rouen, France

² Sprott Center for Stem Cell Research, Regenerative Medicine Program, Ottawa Hospital Research Institute, General Hospital, Mailbox 511, 501 Smyth Road, Ottawa, ON K1H8L6, Canada

³ CHU Rouen, Department of Cardiology, FHU CARNAVAL, F-76000 Rouen, France

⁴ CHU Rouen, Department of Nephrology, F-76000 Rouen, France

⁵ CHU Rouen, Department of Pharmacology, FHU CARNAVAL, F-76000 Rouen, France

* Corresponding author: sylvain.fraineau@univ-rouen.fr

Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rouen

INSERM U1096 - Endothélium, Valvulopathies et Insuffisance cardiaque (EnVI)

22 Boulevard Gambetta, 76183 Rouen cedex 1

tel: +33 2 35 14 83 74

fax: +33 2 35 14 83 65

Title: **19**/15 words max

Abstract: **105**/100 words max

Main text words count: **4325**/4 000 words max: Intro, Results, Discussion

Figures and tables: **6**/6 items max

Figure legends: **302**/350 words max

References: **52**/70 max

Abstract

Epigenetic regulation of histone H3K27 methylation has recently emerged as a key step during M2-like macrophage polarization, essential for cardiac repair after Myocardial Infarction (MI). We demonstrate for the first-time that EZH2, responsible for H3K27 methylation, has an ectopic cytoplasmic localization during monocyte differentiation in M2 macrophages. Moreover, we show that pharmacological EZH2 inhibition, with GSK-343, enhances bivalent genes, expression to promote human monocyte repair functions. GSK-343 treatment accelerated cardiac inflammatory resolution preventing infarct expansion and subsequent cardiac dysfunction after MI *in vivo*. In conclusion, our study reveals that epigenetic modulation of cardiac-infiltrating immune cells may hold promise to limit adverse cardiac remodeling after MI.

Main

Myocardial infarction (MI) triggers an endogenous wound healing response involving an early innate immune response starring myeloid cells. Macrophages are the predominant myeloid cell type arising from bone marrow-mobilized circulating monocytes implicated in post-MI cardiac repair¹. Rapidly after MI, circulating classical, pro-inflammatory Ly6C^{hi} monocytes are recruited to the heart and accumulate at the ischemic area where they differentiate into pro-inflammatory M1 macrophages and give rise to the early inflammatory phase within the first 3 days post-MI in mice. Over the course of cardiac repair, during the first week after MI, the inflammatory phase gives way to the repair phase, characterized by a switch of pro-inflammatory M1 macrophages toward an alternative, immunomodulatory Ly6C^{lo} M2 macrophage phenotype². Although cardiac-recruited Ly6C^{hi} monocytes initially differentiate towards M1 macrophages, they gradually differentiate also into reparative M2 macrophages². Importantly, this macrophage phenotype transition promotes angiogenesis, lymphangiogenesis, extracellular matrix synthesis and deposition necessary to create a mature fibrotic scar. The proper sequence of inflammatory and reparative phases is critical to prevent cardiac remodeling and dysfunction to limit development of heart failure. Experimental studies have shown that either reduced cardiac monocyte infiltration³ and absence of a proper pro-inflammatory phase⁴ or sustained duration of the acute inflammatory phase due to M1 macrophage accumulation⁵, but also reduced monocyte to M2 macrophage differentiation during the reparative phase^{6,7} all result in defective post-MI cardiac healing. Indeed, rapid resolution of the inflammatory phase, giving way to an early and strong reparative phase, correlates with reduction of infarct scar expansion and better preservation of cardiac function.

In this context, macrophage phenotype switching, from M1 to M2-like, plays a key role in cardiac inflammation and repair post-MI. Accumulating evidence points to a specific epigenetic histone modification, histone H3 lysine 27 trimethylation (H3K27me3), as an important mechanism to regulate macrophage activation and polarization⁸⁻¹⁰. The repressive H3K27me3 mark is generated by the Polycomb repressive complex 2 (PRC2), containing the epigenetic histone methyltransferase enzyme Enhancer of zeste homolog 2 (Ezh2). Conversely, H3K27 methylation is actively antagonized by two histone demethylases: Jumonji domain-containing protein D3 (Jmjd3) and Ubiquitously transcribed TPR on X (Utx). This fine-tuned balance between activators and repressors of epigenetic modifications on H3K27 impacts the expression of many genes involved in diverse biological processes including cell-fate commitment during cellular differentiation. Jmjd3 has been described as an essential regulator of M2 macrophage polarization through upregulation of *Arg1*, *Chi3l3*, *Retnla* and *CCL17* linked to *Irf4* up-regulation during helminth infection¹¹ as well as following IL4 stimulation in both human monocytes¹² and murine macrophages¹³. Although Jmjd3 implication during M2 macrophage polarization is well established, the role of its antagonistic partner, Ezh2, has not yet been well established in macrophages. In contrast, Ezh2 has been suggested to play important roles in regulating inflammatory cells functions in B cells^{14, 15}, T cells¹⁶, neutrophils and dendritic cells¹⁷. However, recent reports suggest that Ezh2 may influence macrophage activation by suppressing the expression of anti-inflammatory genes¹⁸ and reducing cytokine secretion leading to a reduction of macrophage-dependent disease development^{19, 20}.

Altogether, these findings suggest that H3K27 methylation promotes a M1-like pro-inflammatory state, while H3K27 demethylation promotes a M2-like immunomodulatory phenotype in macrophages.

We hypothesized that Ezh2, by modulating H3K27 methylation, may directly regulate monocyte to M2 macrophage differentiation and thus represents an attractive therapeutic target to design new pharmacological epigenetic inhibitors to promote cardiac repair post-MI and prevent the occurrence of heart failure.

Here we demonstrate that Ezh2 serves as an epigenetic checkpoint regulator during monocyte to macrophage M2 differentiation, by translocating from the nucleus to the cytoplasm, leading to derepressed expression of bivalent genes essential for M2-like macrophage differentiation and function. Moreover, we promisingly discovered that pharmacological Ezh2 inhibition, with GSK-343, reduced the H3K27me3 mark specifically on the promotor of bivalent genes (such as *DLL1*, *VEGFA*, *IRF4*) resulting in accelerated resolution of the inflammatory phase leading to reduced infarct scar expansion and improved cardiac function after MI in mice.

Results

Cytoplasmic translocation of Ezh2 in cardiac M2-like macrophages post-MI

We first investigated Ezh2 localization in cardiac-infiltrating myeloid cells in mice during post-MI cardiac repair. As expected, we observed a nuclear localization of Ezh2 in both CD11b⁺/CD68⁻ and Cd11b⁺/Cd68⁺ cardiac monocytes (Fig. 1a) and Cd68⁺/iNos⁺ cardiac M1 differentiated macrophages (Fig. 1b). Unexpectedly, Ezh2 translocated to the cytoplasm in cardiac differentiated post-MI (Fig. 1c) as well as in cardiac-resident (Fig. 1d) Cd68⁺/Cd206⁺ M2 macrophages in healthy mice. These

observations suggest that cytoplasmic translocation of Ezh2 might promote M2-like macrophage differentiation by initiating a switch from pro-inflammatory M1 toward immunoregulatory M2 phenotype and subsequent transition from pro-inflammatory toward reparative phase after MI.

Ezh2 cytoplasmic translocation promotes M2 macrophage polarization in vitro

To better understand the role of Ezh2 cytoplasmic translocation in M2-like cardiac macrophages post-MI, we reproduced myeloid cell differentiation *in vitro* starting from peripheral blood circulating monocytes to differentiated and mature polarized M1 or M2 macrophages. Peripheral blood circulating monocytes were subjected to negative magnetic selection before M-CSF-induced *in vitro* differentiation into non-polarized M0 macrophages followed by either LPS-induced M1 macrophage polarization or IL4 and IL10-induced M2 macrophage polarization. We confirmed our previous *in vivo* observations of a nuclear localization of Ezh2 in non-adherent (Fig. 2a) and adherent (Fig. 2b) monocytes, non-polarized M0 (Fig. 2c) and M1 (Fig. 2d) macrophages, while Ezh2 translocated to the cytoplasm in M2 macrophages (Fig. 2e). Interestingly, Ezh2 sub-cellular localization was not affected by classical or non-classical monocyte sub-population phenotype, as assessed by Ly6c expression (Fig. 2a), nor by selective M2a or M2c macrophage differentiation following single cytokine-induced polarization (Supplementary Fig. S1). Thus, this mechanism seems to be global rather than restricted a single monocyte or M2 macrophage sub-population phenotype. We hypothesized that Ezh2 exclusion from the nucleus may be critical to selectively allow M2 macrophage polarization and that it acts as an epigenetic checkpoint to regulate differentiation and polarization into immunoregulatory alternative M2 macrophages.

To test this hypothesis, we induced macrophage differentiation *in vitro* as previously described, and examined Ezh2 cytoplasmic translocation as well as Cd206 expression kinetics. We observed an early Ezh2 nuclear to cytoplasmic translocation occurring within 3 hours after initiation of M2 macrophage polarization (Fig. 2f) prior to Cd206⁻ to Cd206⁺ switch, which appeared more than 6 hours after induction of polarization. We therefore conclude that Ezh2 might repress the M2 macrophage transcriptional programming during myeloid cell differentiation, which is relieved by nuclear export of Ezh2.

M2 macrophage differentiation is epigenetically repressed by Ezh2 control of bivalent gene expression

Ezh2 acts as a transcriptional repressor of bivalent genes, characterized by the concomitant presence of both repressive Ezh2-dependent H3K27me3 and activating H3K4me3 epigenetic marks at their promoter regions^{21, 22}. We decided to identify which bivalent genes may be possible direct targets of Ezh2 in macrophages. First, we exploited previously published ChIP-sequencing (ChIP-seq) data from CD14⁺ sorted human monocytes to establish a list of potential EZH2-regulated bivalent genes in human monocytes^{23, 24}. Then, these putative EZH-2 regulated bivalent genes have been validated in CD14⁺sorted human monocytes by assessing the presence of H3K27me3 repressive mark found at the promoter of inactive genes, such as *PAX7* (Fig. 3a top panel), or H3K4me3 active mark at the promoter of active genes, such as *ELP3* (Fig. 3a second panel). Next, we established the full list of bivalent genes in CD14⁺ sorted human monocytes (supplementary table 1), which included *DLL1*, *VEGFA* and *IRF4* (Fig. 3a). Gene ontology (GO) analysis indicated that our list of bivalent genes in CD14⁺ sorted human monocytes are enriched in

categories related to cardiac remodeling (e.g., cardiac right ventricle morphogenesis, heart development, ventricular septum morphogenesis), vascular remodeling (e.g., blood vessel development, angiogenesis), but also cell migration, wound healing, and cell fate commitment (Fig. 3a). This suggests that derepression, through EZH2 inactivation, of bivalent genes could promote cardiac, vascular and lymphatic repair functions in monocytes after MI. To investigate, we further examined the bivalent status of selected genes from our ChIP-qPCR analysis in our model of circulating monocytes isolated from human peripheral blood. As expected, we observed a significant enrichment of the H3K27me3 mark in the promoter region of *DLL1*, *VEGFA* and *IRF4* bivalent genes as well as in the promoter of *PAX7* inactive gene (Fig. 3c). Conversely, we found a significant enrichment of the activating H3K4me3 mark in the promoter of *DLL1*, *VEGFA* and *IRF4* bivalent genes as well as in the promoter of *ELP3* active gene. This data corroborates the bivalent status of *DLL1*, *VEGFA* and *IRF4* in human monocytes.

Pharmacological inhibition of EZH2 enhances bivalent gene expression to influence monocyte function in vitro

To determine the functional role of EZH2 on bivalent gene expression in monocytes, we used epigenetic pharmacological inhibition of EZH2 methyltransferase activity based on GSK-343 treatment. Once optimal inhibitory conditions (Supplementary Fig. S2A) and absence of nucleo-cytoplasmic translocation (Supplementary Fig. S2B) with GSK-343 were determined; we investigated by RNA-sequencing (RNA-seq) the transcriptomic impact of GSK-343 in isolated human monocytes. This experiment, performed using independent pools of selected peripheral blood monocytes from three distinct non-coronary patients, identified 85 statistically up-regulated genes and

48 statistically down-regulated genes as compared to vehicle control (Fig. 4a). GO analysis indicated that the 48 down-regulated genes are enriched in categories related to collagen binding, heart development, interleukin-1 binding, wound healing, and negative regulation of transcription (Supplementary Fig. S3A and supplementary table 2). In contrast, up-regulated genes are enriched in categories related to chemotaxis, response to hypoxia, angiogenesis and inflammatory response (Supplementary Fig. S3B, and supplementary table 3). The full lists of down- and up-regulated genes and GO categories are available respectively in tables 2 and 3.

To get more insight into the molecular mechanisms and identify direct target genes of EZH2 modulation by GSK-343, we compared the list of bivalent genes identified in CD14+ human monocytes, established by ChIP-seq analysis, and the list of GSK-343-induced up-regulated genes, identified by RNA-Seq, in circulating human monocytes. We found that the majority of genes up-regulated following GSK-343 treatment were bivalent genes (47 out of 85 altered genes; 57.3 %). In contrast, the proportion of either active (20 out of 85 genes; 24.4 %) or repressed (10 out of 85 genes; 12.2 %) genes was minor, with some genes (5 out of 85 genes; 6.1 %) for which epigenetic status remains uncharacterized (Fig. 4b). Interestingly, within the full list of EZH2 direct target genes thus established (Fig. 4c), we found *VEGFA* (> 5-fold up-regulated in monocytes following GSK-343 treatment), a well-known master gene activator of angiogenesis and vasculogenesis and *DLL1* (> 6-fold up-regulated), a member of NOTCH signaling pathway regulating vascular morphogenesis and remodeling (Fig. 4d). Among the 48 down-regulated genes, we noted *TNC* (approximately 8-fold reduced as compared to vehicle treated monocytes), involved in cardiac fibrosis and acceleration of adverse ventricular remodeling after MI (Fig. 4d). Altogether our RNA-seq data identified a pool of 47 EZH2 bivalent gene targets

(Fig. 4b and c) implicated in chemotaxis (*VEGFA*, *MET*, *THBS4* and *CXCL2*), response to hypoxia (*PLOD2*, *VEGFA* and *PLAU*), immune response (*LIF*, *CD22*, *OSM* and *CXCL2*) and angiogenesis (*VEGFA*, *ADM2*, *DLL1*, and *COL4A2*) (Fig. 4e) suggesting that EZH2 inhibition with GSK-343 may promote monocyte cardiac repair function.

EZH2 pharmacological inhibition specifically resolves H3K27me3 level at bivalent gene promoters to activate transcription

To verify that the upregulated expression of bivalent genes in response to GSK-343 treatment was directly due to alleviation of EZH2 gene repression we next investigated the level of the repressive H3K27me3 chromatin mark in the promotor regions of selected target genes. Indeed, we found, using ChIP-qPCR analysis, that *in vitro* treatment of human monocytes for 72h with GSK-343 decreased H3K27me3 levels at *DLL1*, *VEGFA* and *IRF4* gene promoters (Fig. 5a). Interestingly, H3k27me3 levels were not modified at inactive gene promoters, such as *PAX7*, nor in constitutive active gene promoters, such as *ELP3* (Fig. 5a). As expected, the levels of the H3K4me3 active mark were not modified upon GSK-343 treatment in the promotor regions of either bivalent genes (e.g. *DLL1*, *VEGFA* and *IRF4*) or active genes (*ELP3*). This epigenetic activating mark was also not detectable at inactive gene promoters (*PAX7*), in line with suppressed transcription activity in monocytes (Fig. 5b). Taken together, these results demonstrate the specificity of pharmacological inhibition of EZH2 as an approach to selectively remove epigenetic gene repressive marks present on bivalent gene promoters, without affecting their activating epigenetic marks.

To gain further insight into the potential therapeutic applications of EZH2 inhibition in human monocytes after MI, we isolated circulating monocytes from patients admitted to the department of cardiology of Rouen university hospital. Patients were divided into three groups corresponding to 1) patients without coronary disease; 2) patients diagnosed with stable coronary artery disease (CAD); and 3) patients admitted after acute MI (AMI). Patient characteristics are detailed in supplementary table 4. In line with previous findings, we observed a slight but non-significant increase in circulating monocytes levels after MI, as compared to non-coronary patients (Supplementary Fig. S4). Monocytes collected from patients of the three different groups were then treated with GSK-343, as described above, followed by RT-qPCR analysis of gene expression of selected bivalent (*DLL1*, *VEGFA*, *IRF4*) or active (*ELP3*) genes to assess GSK-343 treatment effects. Interestingly, we observed a significant up-regulation of all selected bivalent genes in all three patient groups, while the expression of constitutive active genes remained unaltered (Fig. 5c). These results demonstrate that GSK-343-mediated EZH2 inhibition is efficient to activate bivalent gene expression in human monocytes irrespective of the underlying disease conditions. Other genes modified expressions identified by RNA-seq were confirmed by RT-qPCR including *ADM2*, *BMP2*, *CXCL2*, *FN1* and *TNC* (Supplementary Fig. S5). Moreover, a targeted transcriptomic array of a murine monocyte cell line, focused on assessment of genes selectively expressed in different myeloid cell lineages, revealed that treatment with GSK-343 induces an expression shift similar as observed in M2 macrophage profile (Supplementary Fig. S6A). These results of GSK-343 were confirmed in both mouse (Supplementary Fig. S6B and C) and human (Supplementary Fig. S6D and E) freshly-isolated monocytes as compared with *in vitro* differentiated M0, M1 or M2 macrophage subtypes. Altogether our *in vitro* data

show that EZH2 acts as an epigenetic check point inhibiting, at the chromatin level, bivalent gene expression to prevent monocyte/macrophage differentiation into an M2-like immunomodulatory cell type. Conversely, treatment of monocytes with a pharmacologic inhibitor of EZH2 activity favored suppression of the H3K27me3 repressive epigenetic mark at the promoter of bivalent genes, thus enhancing their transcription to initiate a cell differentiation program and/or a cell fate commitment into M2-like immunoregulatory macrophages. These observations argue for a potential use of GSK-343 as a novel epigenetic treatment to accelerate inflammatory resolution after MI to limit cardiac dysfunction and heart failure development.

GSK-343 accelerates inflammation resolution and prevents subsequent cardiac dysfunction development in mouse model of MI

Next, we evaluated the effects of GSK-343 treatment on cardiac inflammation and cardiac function in a mouse model of MI induced by permanent left coronary ligation. As GSK-343 is a poorly soluble epigenetic drug, we used cyclodextrin-based Captisol[®], as previously described for daily intraperitoneal injections²⁵. Because our *in vitro* data indicated that EZH2 inhibition promotes immunomodulatory functions in monocytes, we first examined circulating and cardiac immune cell levels post-MI using flow cytometry. In line with previous reports, circulating as well as cardiac classical pro-inflammatory monocyte populations were found to be increased at 3 days after MI. Interestingly, GSK-343 treatment significantly reduced classical blood monocyte (Ly6C^{hi}CXCR3^{hi})/inflammatory (M1)-like levels while increasing cardiac levels of the same population in both infarct scar and border zone at 3 days post-MI (Fig. 6a, left and middle panels). This indicates that Ezh2 inhibition may accelerate cardiac inflammatory kinetics after MI. In agreement, we found that at 8 days after MI

the non-classical immunomodulatory monocyte (Ly6C^{lo}CXCR3^{hi})/M2-like population was significantly increased in both infarct and Border Zone (BZ) areas in GSK-343-treated as compared to vehicle-treated mice (Fig. 6a, right panel). Notably, the levels of these alternative monocytes in GSK-343-treated mice were similar as in sham controls, arguing for accelerated resolution of inflammation with GSK-343. Similarly, cardiac macrophage levels tended to be more rapidly increased in GSK-343-treated mice as compared to vehicle controls (Supplementary table 5). To further characterize the cardiac inflammatory response, we assessed cardiac inflammatory cytokine expression by RT-qPCR. In support of faster resolution of inflammation upon GSK-343 treatment, we observed significantly reduced expression of pro-inflammatory cytokines *Il1b* and *Il6*, 8 days after MI in hearts, as compared to vehicle-treated mice (Fig. 6b). For example, the MI-induced increase in cardiac *Ccl2* (a.k.a monocyte chemoattractant protein) expression, was significantly decreased in GSK343-treated mice, while *Ccl21* was increased, suggesting reduced monocyte recruitment and/or increased immune cell efflux via lymphatics in GSK-343 treated mice (Fig. 6b). Interestingly, we did not observe any modification of this gene expression 3 days post-MI (supplementary table 6).

Altogether, our data argue for accelerated resolution of the inflammatory phase post-MI with GSK-343 treatment. Further, as expected from RNA-seq data in monocytes, cardiac *Dll1* bivalent gene expression was restored with epigenetic drug treatment while the expression of both *Fn1* and *Tnc* pro-fibrotic genes was significantly reduced as compared to vehicle treated animals (Fig. 6b). However, different from *in vitro* data, we did not observe a significant increase in cardiac *Vegfa* expression upon GSK-343 treatment (supplementary table 6), although we identified it as a bivalent gene. This suggests that recruited myeloid cells might not be the principal source of

Vegfa during early steps of cardiac repair after MI. In accord with absence of major angiogenic or lymphangiogenic effects, both cardiac vessel density and lymphatic densities were not significantly increased after 8 days in GSK-343-treated groups as compared to vehicle controls (Supplementary table 5).

By accelerating the resolution of the inflammatory phase, GSK-343 treatment may influence cardiac scar formation strength or kinetics. To investigate this, we evaluated cardiac function and morphology after MI. Although infarct size was similar 3 days after MI, we noticed a stabilization of infarct scar size, with less expansion by 8 days after MI in GSK-343 as compared to vehicle treated groups (Fig. 6d and e). In agreement with less cardiac stretching due to infarct expansion, GSK-343-treated mice displayed reduced cardiomyocyte hypertrophy at 8 days post-MI (Supplementary table 5). Consistent with these findings we observed higher expression 8 days after MI of both *Mb* and *Tnni3*, encoding respectively myoglobin and troponin I cardiomyocyte-specific genes in GSK-343-treated mice suggesting limitation of cardiomyocyte cell death or dysfunction in the border zone (Fig. 6b). We conclude that *Ezh2* inhibition with GSK-343 prevents infarct scar expansion through expedited inflammatory phase resolution, leading to increased scar maturation and potentially reduced cardiomyocyte remodeling or dysfunction. Indeed, we observed partial prevention of cardiac dysfunction 8 days post-MI, with reduced left ventricular (LV) dilation, including improvement of both diastolic (Fig. 6f) and systolic (Fig. 6g) diameters, leading to rescue of LV fractional shortening (Fig. 6h) as well as ejection fraction (Fig. 6i) after GSK-343 daily treatment. This is further confirmed by our observation of significantly reduced expression of *Nppb*, a well-known biomarker of deleterious cardiac remodeling and heart failure at 8 days post-MI. However, none of these parameters were improved by GSK-343 at 3 days post-MI (supplementary

table 7). We conclude that GSK-343 treatment accelerated inflammatory resolution, leading to improved infarct scar maturation, cardiomyocyte protection and subsequent reduction of infarct expansion, resulting in reduced cardiac dysfunction after MI.

Discussion

We report, to the best of our knowledge, for the first time a mechanism involving cytoplasmic translocation of EZH2 as a cellular epigenetic switch to facilitate M2 macrophage polarization linked to derepressed expression of bivalent genes. This finding of cytoplasmic translocation of EZH2, while unreported in macrophages, has previously been described in T cells during actin polymerization, where EZH2 was found to interact with Vav1 to regulate T-cell-receptor-mediated signalling²⁶. Moreover, during megakaryopoiesis, Notch1 was described to induce EZH2 cytoplasmic translocation where it interacts with LIM domain kinase-1 (LIMK1), resulting in reduced cofilin phosphorylation. This increases cofilin activity and subsequently decreases filamentous actin content, preparing the cells for cell shape and size modifications required for megakaryocyte formation²⁷. Finally, a recent report has indicated another cytoplasmic role for EZH2 linked to breast cancer metastasis. It was demonstrated that p38-induced phosphorylation of EZH2 at Tyr₃₆₇ promoted its cytoplasmic retention in breast cancer cells. This in turn enhanced EZH2 binding to vinculin and other cytoskeletal regulators, leading to promotion of cell adhesion, migration, invasion and subsequent development of breast cancer metastasis²⁸. These data depict novel cytoplasmic roles of EZH2, which may also relate to our transcriptomic findings of improved homing and chemotaxis/ migration of M2 macrophages and GSK-343 treated monocytes. Interestingly, besides LIMK1 and

Vav1, additional cellular partners of EZH2 have been identified and may be involved in cytoplasmic translocation of EZH2 during M2 macrophage polarization. Among these putative partners, long non-coding RNA (lnc RNA) are interesting targets. Indeed, EZH2 RNA Immune-Precipitation-sequencing (RIP-seq) experiments to identify tissue-specific lnc RNA partners of EZH2 confirmed interaction with both Cardiac Hypertrophy Associated Epigenetics Regulator (CHAER)^{29, 30} and HOx Transcript Antisense RNA (HOTAIR) lnc RNA in both heart and blood²⁹. Whereas Chaer was found to directly interact with PRC2, leading to inhibition of Ezh2-mediated repression of hypertrophic genes in the heart³⁰, Hotair interacted with PRC2 and enhanced EZH2 activity, leading to increased myofibroblast differentiation by promoting collagen and α -SMA expression. It remains to be determined whether these partners could be involved in regulation of Ezh2 cytoplasmic translocation during M2 macrophage differentiation/polarization.

Although the data available on the role of EZH2 in the innate immune response remains scarce, a recent report examined the effects of Ezh2 deletion in macrophages and microglia. The authors reported that Ezh2 is required to repress Socs3 expression, necessary to promote pro-inflammatory gene expression, in response to Toll-Like Receptor (TLR)-mediated signaling during macrophage and microglia activation in autoimmune inflammation²⁰. This is in agreement with our data stating EZH2 as a crucial epigenetic check point regulator that prevents M2 differentiation/polarization thus extending the duration and/or severity of cardiac inflammation after MI. In this study, we show for the first time that pharmacological inhibition of EZH2 with GSK-343 promotes the capacity of human monocytes to accelerate cardiac inflammatory resolution through derepression of bivalent genes. Further, we propose that this epigenetic control of bivalent gene expression mediated

by H3K27me3 demethylation by epigenetic enzymes such as JMJD3 and UTX. Indeed, previous studies have shown that IL4 up-regulates JMJD3 expression and activity in human monocytes. This in turn, decreases H3K27me3 level at *IRF4* promoter, increases RNA polymerase II recruitment and promotes subsequent *IRF4* mRNA expression. The implication of JMJD3 in bivalent gene reexpression was further confirmed by the inhibition of *IRF4* expression after treatment with a pharmacologic inhibitor of JMJD3, GSK-J4¹². In our study, we observed a similar phenomenon (decrease of H3K27me3 level at *IRF4* promoter enhancing its mRNA expression) after treatment of human monocytes with the EZH2inhibitor GSK-343. This suggest that the balance between EZH2 and JMJD3 might be responsible for determining bivalent gene (*IRF4*, *VEGFA* and *DLL1*) promoter epigenetic mark H3K27me3 levels, which directly determines gene expression activity in monocytes during macrophage differentiation. Among these bivalent genes, *DLL1* expression by endothelial cells has been shown to promote conversion of Ly6C^{hi} classical monocytes into Ly6C^{lo} alternative monocytes *in vivo* and *in vitro*³¹. We propose that *DLL1* up-regulation in monocytes could participate in cell-cell communication through NOTCH2 activation to stimulate inflammatory-to-immunoregulatory monocyte switch. We postulate that EZH2 inhibition of M2 macrophage polarization is a global phenomenon, as we reproduced similar data from peripheral blood monocytes isolated from non-coronary as well as coronary and AMI patients. We also provide, for the first time, *in vivo* proof of the protective effects induced by pharmacological EZH2 inhibition in a mouse MI model with permanent coronary artery ligation. Our data are in agreement with a recent study highlighting EZH2 overexpression and cardiac enrichment of known gene targets of EZH2, such as *KLF15*, in ischemic cardiomyopathy patients. Consequently, EZH2 was proposed as a likely

transcriptional regulator of gene expression in ischemic cardiomyopathy³². In our mouse MI model, we observed accelerated inflammatory resolution upon EZH2 inhibition, in agreement with our *in vitro* data on altered gene expression and polarization of monocytes. Of note, we observed decreased cardiac expression upon GSK-343 treatment of both *I1b* and *I6* pro-inflammatory cytokines and *Ccl2*, implicated in cardiac monocyte recruitment and early immune response, as well as restored expression of *Ccl21*, involved in late immune response and cardiac repair³³. We speculate that restored *Ccl21* expression may relate to protection of cardiac lymphatics, as they constitute the main cardiac source of *Ccl21*. Moreover, our RNA-Seq data in human monocytes revealed that the CCL21 receptor, *CCR7*, is the highest up-regulated gene after GSK-343 treatment. This indirectly suggests that GSK-343 may have enhanced both cardiac and lymphatic homing of myeloid cells, *via* promotion of *Ccr7/Ccl21* signaling, resulting in accelerated clearance of cellular debris and inflammation in the heart³⁴ leading to prevention of infarct scar expansion. Further, GSK-343 treatment may also have directly altered fibrosis and scar maturation, as suggested by the reduction in *Fn1* and *TnC* expression in the heart. However, in addition to modulating collagen production in part by enhancing TGF β signaling, TnC has also been shown to act as a trigger for monocyte/macrophage recruitment³⁵ leading to accelerated adverse ventricular remodeling after MI³⁶ and heart failure development. The immunomodulatory effects of TnC seem to involve suppression of *Irf4* expression, necessary for M2 macrophage polarization. Taken together, our findings suggest that GSK-343-induced *Irf4* up-regulation in monocytes together with cardiac *TnC* down-regulation could potentiate M2 macrophage polarization to accelerate cardiac repair and limit inflammation.

In conclusion, our study brings, for the first time, evidence of the key role of EZH2 as an epigenetic check-point regulator that prevents M2 macrophage polarization.

Promisingly, pharmacological EZH2 inhibition derepresses specific bivalent genes, resulting in increased expression of genes favoring M2 polarization. In the setting of MI, the enhanced cardiac recruitment and activity of non-classical monocytes induced by EZH2 inhibitions resulted in accelerated inflammatory resolution and decreased infarct scar expansion, leading to a reduction of cardiac remodeling and dysfunction after MI. In conclusion, our data suggest EZH2 as an attractive novel therapeutic target to reduce cardiac inflammation and limit heart failure development following MI.

Online methods

Human study design and approvals

Between Nov 2018 and June 2020, the EPICAM prospective study enrolled 48 patients at Rouen University Hospital. The CPP Ile de France V has approved the study august 10th 2018 (RCB: 2018-A02108-47). All patients read information sheet and accepted to participate to the study before blood collection. Inclusion criteria were: 1) age greater than or equal to 18 years and 2) admission to hospital for a coronary angiography. The exclusion criteria were 1) Infectious diseases, 2) Current pregnancy or breastfeeding, 3) Obesity (BMI > 30 kg/m²), 4) Haematological pathologies, 5) Anaemia and 6) Inflammatory and autoimmune pathologies.

During the coronarography procedure, peripheral blood was collected into 4 BD Vacutainer® EDTA K2 tubes (Becton Dickinson Cat#367862). In-hospital data were entered into a dedicated database.

Animal study design and approvals

All animal experiments performed in this study were approved by the regional ethics review board in line with E.U and French legislation (01181.01 / APAFIS #8157-2016121311094625-v5 Normandy). We only used female mice for MI studies as they display lower mortality than male in the MI model, which help us reduce the numbers of animals included in our studies. In addition, females express both alleles of the H3K27me3 demethylase *Kdm6a* gene encoding the Utx protein. Mouse peripheral blood samples were collected in BD Vacutainer® EDTA K2 tubes (Becton Dickinson Cat#367862) from C57Bl/6J female mice aorta.

Cell isolation and culture

Monocytes were directly or indirectly (after red blood cell lysis (eBioscience Cat#00-4333-57) isolated by negative selection using EasySep™ monocyte isolation kits for human (StemCell Technologies Cat#19669) and mouse (StemCell Technologies Cat#19861) cells from fresh peripheral blood samples according to the manufacturer's instructions. TIB-204™ (WEHI-265.1) mouse monocyte cell line (ATCC Lot#4249478) was used in this study. All monocytes were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, Cat# 41966-029) supplemented with 50 μ M of 2-mercaptoethanol (Gibco Cat#21985-023), 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco Cat#10500-064) and Penicillin/Streptomycin (Sigma-Aldrich Cat#P4333) seeded at a cellular density $> 150\ 000\ \phi/cm^2$ for primary monocytes and $> 200\ 000\ \phi/ml$ for TIB-204. M0 macrophages were differentiated from TIB-204 with 100 μ M Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma-Aldrich # P8139-1MG) and from selected primary monocytes using 50 ng/ml of either murine or human Macrophage-Colony Stimulating Factor (M-CSF) for 4 days. Further differentiation of M0 macrophages into polarized macrophages was obtained with 50 ng/ml LipoPolySaccharide (LPS, Sigma-Aldrich Cat#L6529) for M1 and with a combination of both IL4 and IL10 at a final concentration of 20 ng/ml respectively for M2 polarized macrophages for 2 days.

Antibodies and reagents

For differentiation of primary monocytes into M0 macrophage *in vitro*, murine (Peprotech Cat#315-02) or human (StemCell Technologies #78057.1) M-CSF was

used. The subsequent M0 into M2 macrophage polarization was obtained using a cocktail of murine IL4 (Peprotech Cat#214-14) and IL10 (Peprotech Cat#210-10) or human IL4 (StemCell Technologies Cat#78045.1) and IL10 (StemCell Technologies Cat#78024.1). M2 macrophage subpopulation phenotypes were obtained after incubation with 20 ng/ml of murine IL4 (Peprotech Cat#214-14), IL10 (Peprotech Cat#210-10) and Tgfb1 (R&D Systems Cat#7666-MB-005) alone or in combination depending on the M2 macrophage subtype desired. The Ezh2 inhibitor GSK-343 (Sigma-Aldrich Cat#SML0766) was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Cat#D1435) and used at a final concentration of 5 μ M for *in vitro* experiments.

The following antibodies were used at the indicated dilutions:

Immunohistochemistry: rat anti-CD11b (BD Pharmingen Cat#557395, 1:1500), rat anti-CD68 (eBioscience Cat#14-0681, 1:800), goat anti-CD206 (Thermo Fisher Cat#PA5-46994, 1:1500), rabbit anti-EZH2 (D2C9, Cell Signaling Cat#5246, 1:1000), rat anti-iNOS (W16030C, Biolegend Cat#696802, 1:500), WGA-FITC (Interchim#FP-CE8070, 1:100), biotinylated rabbit anti-Lyve1 (eBioscience#13-0443, 1:400), biotinylated rat anti-CD31 (BD pharmingen#553371, 1:50); biotinylated rabbit anti-Cx3cr1 (BIOSS Cat#bs-1728R-Biotin, 1:100), and rat anti-Ly6c (W16030C, Abcam Cat#ab15627, 1:400).

Chromatin Immunoprecipitation: 2 μ g of the following antibodies were used: rabbit anti-H3K4me3 (Millipore Cat#07-473), rabbit anti-H3K27me3 (Millipore Cat#07-449), or normal rabbit IgG (Millipore Cat#12-370).

Flow cytometry (FACS): anti-mouse CD45 (30F11) ; anti-mouse CD11b (M1/70); anti-mouse Ly6C (HK1-4); anti-mouse CX3CR1 (SA011F11); anti-mouse CD86 (GL-

1); anti-mouse CD3 (17A2); anti-mouse CD115 (AFS798); anti-mouse CD11c (N418); anti-mouse CD19 (6D5); anti-mouse CD206 (C068C2); anti-mouse IA-IEk (MHCII) (M5/114.15.2); anti-mouse F4-80(BM8) (All from Biolegend, used between 1/200 to 1/400), LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity (Invitrogen, 1/1000) Western blotting: anti-pan histone H3 (Millipore Cat#07-690, 1:100 000), anti-H3K27me3 (Millipore Cat#07-449, 1:2000).

Mouse model of Myocardial infarction

Left ventricular (LV) MI was induced in 20-22g C57Bl/6 female mice by permanent ligation of the left descending coronary artery as previously described³⁷.

GSK-343 (20 mg/kg, Interchim Cat# XLR94D), was dissolved in cyclodextrin-based Captisol® as a solubilization vehicle at 20% final concentration, as advised by the manufacture, to perform daily intraperitoneal injections 6 hours after surgery and daily until 3 to 7 days post-MI. In controls vehicle solution (Captisol® 20%) was administered by intraperitoneal injection.

Immunohistochemistry analysis

Frozen OCT-embedded mouse hearts were sectioned on a cryostat with a section size of 8 μ m. Air dried sections were fixed in ice cold acetone (-20°C) for 10 min before a 1h permeabilization step in PBS containing 0.1% saponin; 1% BSA; 4% donkey serum. Incubation with desired primary antibody was performed 1h to overnight. Primary antibody signal was revealed using donkey anti-specie fluorescent

antibody. Pictures were taken on Zeiss microscope imager Z.1 equipped with an apotome.

Immunocytochemistry analysis

TIB-204 and primary mouse monocytes were stained in suspension while adherent macrophages were directly stained on 14 mm \varnothing coverslips. Briefly, cells were fixed for 10 min in 1% or 4% paraformaldehyde respectively for suspension or adherent cells. Permeabilization was then performed using PBS containing 0.25% Triton X-100 or 0.1% saponin respectively for suspension or adherent cells. Cells were incubated overnight with desired primary antibodies, as described above, at indicated concentration after 30 min incubation in PBS containing 0.1% saponin; 1% BSA; 4% donkey serum.

RNA extraction

Total RNA was extracted from at least 3×10^6 human and 5×10^5 murine monocytes treated or not with 5 μ M GSK-343 for 72h using NucleoSpin RNA XS kit (Macherley-Nagel Cat# 740902) for *in vitro* studies or from 5 mg of cardiac tissue using RNeasy Mini Kit (Qiagen Cat#74104) including a genomic DNA digestion step with DNase I (Qiagen Cat#79254).

Gene expression profiling by RNA-Sequencing

For RNAseq, we used total RNA extracted from 3 independent non-coronary patients treated with 5 μ M GSK-343 or vehicle for 72 h therefore representing three biological replicates. Total RNA was sent for library preparation, mRNA sequencing and bio-informatics analysis to Novogene Company (Novogene company Ltd, Cambridge, UK). 400 ng of total RNA with a concentration > 20 ng/ml and a RIN ratio > 8 were used for Poly-A mRNA-seq, sequencing length of 150 nt paired-end (PE150) with the Illumina NovaSeq 6000. Reads were aligned to the human genome build hg38 and the transcript assembly GRCh38 from Ensembl using Hisat2 version 2.0.5³⁸.

Transcript quantification was performed with featureCounts from the subread package³⁹. Differential analysis, including normalization, was performed with DESeq2 bioconductor package version 1.22.1⁴⁰ using R version 3.5.1. Genes significantly up- or down-regulated upon epigenetic combined drug treatment (adjusted p-value < 0.05) were submitted to DAVID Gene Ontology Analysis version 6.7^{41, 42}. To generate heat maps, expression values in FPKM for genes within the selected GO Categories were retrieved. Heat maps were generated with Cluster version 3.0⁴³ and JavaTree View version 1.1.6r4⁴⁴.

RNA-Seq data are available into the public GEO database (GSE165543) with the following protected access for reviewers using the provided link and token:

Link: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE165543>

Token: mvmvwsogdhszlez

Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

RT-qPCR was performed with 0.4 to 1.5 μ g total RNA isolated as previously described. Extracted RNA was annealed with 1875 ng random primers (Invitrogen, Cat#48190-011) for 5 min at 65°C followed by holding step at 4°C. Reverse transcription step was performed using 200 U M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, Cat#28025-013) mixed with 30 U RNase OUT (Invitrogen, Cat#10777-019), M-MLV reverse transcriptase reaction buffer (Invitrogen, Cat#18057-018) and 1 mM final dNTP mix (Invitrogen, Cat#10297-018). Complementary DNA (cDNA) synthesis was carried out at 37°C for 1h followed by 95°C for 5 min cycle and final hold at 4°C. cDNA was diluted 1:2 or 1:4 in nucleases free water before amplification with LightCycler®480 SYBR Green I Master (Roche, Cat#04-707-516-001) using Light Cycler 480 real-time PCR system (Roche). Absolute abundance of genes relative to B2M housekeeping gene expression was calculated based on a cDNA standard curve using Light Cycler 480 Software 1.7 (Roche). A complete list of primer sequences is provided below.

Human RT-qPCR primers list

Gene and location	Primer sense	Primer sequence (5' > 3')	Amplicon size
<i>B2M</i>	Forward	CACAGCCCAAGATAGTTAAGT	268 bp
	Reverse	CCAGCCCTCCTAGAGC	
<i>DLL1</i>	Forward	TGCCTGGATGTGATGAGCAGCA	110 bp
	Reverse	ACAGCCTGGATAGCGGATACAC	
<i>ELP3</i>	Forward	TGATGCCTGACCTGCCAAACGT	121 bp
	Reverse	CCACGAATCACCAGGGTAGGAT	
<i>IL1B</i>	Forward	CCACAGACCTTCCAGGAGAATG	131 bp
	Reverse	GTGCAGTTCAGTGATCGTACAGG	
<i>IL6</i>	Forward	AGACAGCCACTCACCTCTTCAG	132 bp
	Reverse	TTCTGCCAGTGCCTCTTTGCTG	
<i>IRF4</i>	Forward	GAACGAGGAGAAGAGCATCTTCC	128 bp
	Reverse	CGATGCCTTCTCGGAACTTTCC	
<i>MRC1</i>	Forward	AGCCAACACCAGCTCCTCAAGA	121 bp
	Reverse	CAAACGCTCGCGCATTGTCCA	
<i>PGF</i>	Forward	GGCGATGAGAATCTGCACTGTG	127 bp
	Reverse	ATTCGCAGCGAACGTGCTGAGA	
<i>VEGFA</i>	Forward	TTGCCTTGCTGCTCTACCTCCA	126 bp
	Reverse	GATGGCAGTAGCTGCGCTGATA	

Mouse RT-qPCR primers list

Gene and location	Primer sense	Primer sequence (5' > 3')	Amplicon size
<i>B2m</i>	Forward	GCTGCTACTCGGCGCTTCA	343 bp
	Reverse	GCAGGCGTATGTATCAGTCTCAGT	
<i>Ccl2</i>	Forward	CCCAATGAGTAGGCTGGAGA	210 bp
	Reverse	GCTGAAGACCTTAGGGCAGA	
<i>Ccl21</i>	Forward	TCCCTACAGTATTGTCCGAGGC	141 bp
	Reverse	ATCAGGTTCTGCACCCAGCCTT	
<i>Cd68</i>	Forward	GGCGGTGGAATACAATGTGTCC	156 bp
	Reverse	AGCAGGTCAAGGTGAACAGCTG	
<i>Cd163</i>	Forward	GGCTAGACGAAGTCATCTGCAC	144 bp
	Reverse	CTTCGTTGGTCAGCCTCAGAGA	
<i>Cx3cr1</i>	Forward	GAGCATCACTGACATCTACCTCC	137 bp
	Reverse	AGAAGGCAGTCGTGAGCTTGCA	
<i>Dll1</i>	Forward	GCTGGAAGTAGATGAGTGTGCTC	113 bp
	Reverse	CACAGACCTTGCCATAGAAGCC	
<i>Elp3</i>	Forward	GCGTGTGAATCTTTCCACCTGG	137 bp
	Reverse	GGACGAAAAGCAGGGTTCTCGA	
<i>Flt1</i>	Forward	TGGATGAGCAGTGTGAACGGCT	128 bp
	Reverse	GCCAAATGCAGAGGCTTGAACG	
<i>Flt4</i>	Forward	AGACTGGAAGGAGGTGACCACT	128 bp
	Reverse	CTGACACATTGGCATCCTGGATC	
<i>Fn1</i>	Forward	CCCTATCTCTGATACCGTTGTCC	145 bp
	Reverse	TGCCGCAACTACTGTGATTCGG	
<i>Hes1</i>	Forward	GGAAATGACTGTGAAGCACCTCC	130 bp
	Reverse	GAAGCGGGTCACCTCGTTCATG	
<i>Il1b</i>	Forward	TGGACCTTCCAGGATGAGGACA	148 bp
	Reverse	GTTTCATCTCGGAGCCTGTAGTG	

<i>Ii6</i>	Forward	TACCACTTCACAAGTCGGAGGC	116 bp
	Reverse	CTGCAAGTGCATCATCGTTGTTC	
<i>Irf4</i>	Forward	GAACGAGGAGAAGAGCGTCTTC	147 bp
	Reverse	GTAGGAGGATCTGGCTTGTCGA	
<i>Lyve1</i>	Forward	ACCAGGTAGAGTCAGCGCAGAA	128 bp
	Reverse	CAGGACACCTTTGCCATTCTTCC	
<i>Mb</i>	Forward	CAATCACACGCCACCAAGCACA	115 bp
	Reverse	CCTGAGCATCTGCTCCAAAGTC	
<i>Mmp8</i>	Forward	GATGCTACTACCACACTCCGTG	143 bp
	Reverse	TAAGCAGCCTGAAGACCGTTGG	
<i>Mrc1</i>	Forward	GTTACCTGGAGTGATGGTTCTC	116 bp
	Reverse	AGGACATGCCAGGGTCACCTTT	
<i>Nos2</i>	Forward	TGGTGGTGACAAGCACATTT	119 bp
	Reverse	AAGGCCAAACACAGCATACC	
<i>Nppb</i>	Forward	TCCTAGCCAGTCTCCAGAGCAA	98 bp
	Reverse	GGTCCTTCAAGAGCTGTCTCTG	
<i>Pgf</i>	Forward	TGCTGTGGTGATGAAGGTCTGC	138 bp
	Reverse	GCATTCACAGAGCACATCCTGAG	
<i>Timp1</i>	Forward	TCTTGGTTCCCTGGCGTACTCT	131 bp
	Reverse	GTGAGTGTCACTCTCCAGTTTGC	
<i>Tnc</i>	Forward	GAGACCTGACACGGAGTATGAG	148 bp
	Reverse	CTCCAAGGTGATGCTGTTGTCTG	
<i>Tnni3</i>	Forward	CTCTGCCAACTACCGAGCCTAT	123 bp
	Reverse	CGTTCCATCTCCTGCTTCGCAA	
<i>Vcan</i>	Forward	GGACCAAGTTCCACCCTGACAT	135 bp
	Reverse	CTTCACTGCAAGGTTCTCTTCT	
<i>Vegfa</i>	Forward	CTGCTGTAACGATGAAGCCCTG	119 bp
	Reverse	GCTGTAGGAAGCTCATCTCTCC	

ChIP-seq data analysis

We downloaded the all sets from the ENCODE portal (Sloan et al. 2016) (<https://www.encodeproject.org/>) with the following identifiers: ENCSR267NWZ, and ENCSR000ASK respectively for human CD14⁺ monocytes H3K4me3 (GSM1003536) and H3K27me3 (GSM1003564) ChIP-seq data sets.

Reads were aligned to the hg38 genome build using Bowtie2 version 2.3.4.1^{45, 46}. Unmapped and duplicate reads were removed with Samtools version 1.5⁴⁷. Peak calling was performed with MACS2^{48, 49} using default parameters for H3K4me3 samples and with the addition `-borad` option with H3K27me3 samples. Overlapping peaks were identified with the intersect Bed tool from the bedtools package version 2.26⁵⁰. Annotation of common H3K4me3 and H3K27me3 peaks was performed with PAVIS⁵¹.

Native Chromatin Immunoprecipitation (NChIP)

H3K4me3 and H3K27me3 histone modification levels was measured by native ChIP (NChIP) as described⁵². ChIPed DNA was purified by phenol-chloroform extraction, precipitated with ethanol and specific DNA sequences were amplified with LightCycler®480 SYBR Green I Master (Roche, Cat#04-707-516-001) using Light Cycler 480 real-time PCR system (Roche). ChIPed DNA quantity was calculated compared to a genomic DNA standard curve using Light Cycler 480 Software 1.7 (Roche).

ChIP-qPCR primers list

Gene and location	Primer sense	Primer sequence (5' > 3')	Amplicon size
<i>DLL1</i> promoter	Forward	GCATGGCTAATGAGATGCAA	88 bp
	Reverse	CATTGAGAGGAGGGTTTGGGA	
<i>ELP3</i> promoter	Forward	CCCAGGTCGAGCTTTCTAACC	70 bp
	Reverse	GGGTCTCAGGGATGGAGGAT	
<i>IRF4</i> promoter	Forward	AGCTGGGCCATTTCTATTT	148 bp
	Reverse	TAACGGAAGACGGAGGAATG	
<i>PAX7</i> promoter	Forward	GGAAGTGAAGGGGAGGAAG	74 bp
	Reverse	TATCTGGTTCCGAGGCTTGG	
<i>VEGFA</i> promoter	Forward	AGCTGTTTGGGAGGTCAGAA	84 bp
	Reverse	TCTGGCTAAAGAGGGAATGG	

Heart dissociation

Cardiac samples were collected at 3 or 8 days after MI. Left ventricles (LV) were harvested after perfusion with physiologic serum at 37°C. Infarcted Scar and Border Zones (BZ) were carefully separated and collected in 50ml-falcon tube containing 5mL of RPMI 1640 medium. Three LVs from same group were collected per tube. Digestion enzymes cocktail (collagenase II (5 mg), Dispase (6 mg), DNase I (300 µg) (Sigma) per 5mL) was added and sample were dissociated through GentleMACS™ (Miltenyi) for 15min. After dissociation, samples were filtered through 70 µm and then 40 µm cell strainer and prepared for FACS staining in PBS-5% FBS buffer.

Cardiac inflammation analysis by Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) analysis

Cardiac immune cell infiltration was analyzed by FACS by gating on CD45⁺ leucocytes to exclude endothelial cells and other cardiac cell types from the analysis. On live cells, lymphocytes were gated out by CD3 or CD19 staining. Then, dendritic cells were excluded from the analysis by gating out CD11c⁺ cells. On CD11b⁺CD11c⁻ pool, monocyte/macrophage cell populations were analyzed on their expression of Ly6C versus CX3CR1 staining. Granulocytes were excluded by their lower expression of CX3CR1 compared to monocytes/macrophages subset. Classical/inflammatory and non-classical monocytes/macrophages were defined as Ly6C^{hi}/CX3CR1^{hi} and Ly6C^{lo}/CX3CR1^{hi}, respectively.

Cardiac functional analysis

Non-invasive echocardiography was performed as described³⁷ 3- and 7-days post-MI and GSK-343 treatment. Briefly, mice were anesthetized using Isovet - 2% (Osalia, Cat#3248850) and echography was performed with VEVO 3100 ultrasound echograph equipped with a MX550D probe (Fujifilm VisualSonics Cat#51073-45). Short axis view of the left ventricular was performed at the level of papillary muscle and M-mode tracing was recorded. Doppler was used to calculate Velocity Time Integral (VTI) in pulmonary artery. Left ventricular diameter was measured by image analysis using software VEVOLAB V3.1.1.

Western blotting analysis

TIB-204 nuclei were lysed using Triton Extraction Buffer (TEB: PBS containing 0.5% Triton X 100 (v/v); 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 0.02% (w/v) NaN₃) supplemented with protease inhibitor cocktail before overnight histones acid extraction in 0.2 N HCl at 4°C. Total amount of histones was measured using BioRad protein Assay (Biorad, Cat#500-0006). 2 µg of total histones were resolved by SDS-PAGE electrophoresis followed by transfer on nitrocellulose membrane before hybridation with desired primary antibody previously described overnight at 4°C. Primary antibody signal was amplified using horseradish peroxidase (HRP) coupled specie corresponding secondary antibody.

Statistical analyses

Data are obtained from at least 3 independent experiments each in duplicate or triplicate for *in vitro* studies. Number of individual animals in each group is indicated for *in vivo* data. Data are expressed as mean values or percentages of control values ± SEM. When indicated, statistical significance between was determined by non-parametric Kruskal-Wallis test followed by Dunns post-hoc test using Graphpad Prism 5 software. The use of non-parametric Kruskal-Wallis test was determined depending Shapiro-Wilk normality test data distribution. Data are considered to be significantly different at values $p < 0.05$. The p values are depicted as asterisks (*) or hashtag (#) symbols in the figures as follows: *** or ### $p < 0.001$; ** or ## $p < 0.01$; * or # $p < 0.05$; ns: non-significant.

Acknowledgments

We thank all physicians from the department of cardiology (Rouen University Hospital) for their help in the collection of peripheral blood samples from patients; Paulus Mulder, Thomas Duflot, Nicolas Perzo and Jérémy Bellien for critical commenting on experiments; Gaëtan Riou from CyFlow flow cytometry and cell analysis facility platform (Institute for Research and Innovation in Biomedicine, IRIB) for his help in performing flow cytometry experiments and analysis; Manon Lefrançois, Florian Vallin and Paul Rouault MSc students for experimental help. We thank the ENCODE Consortium and the Bradley Bernstein, Broad Institute of MIT and Harvard ENCODE production laboratory for generating the GSE296111 ChIP-seq data sets, and more particularly for generating respectively GSM1003536 and GSM1003564 human CD14+monocytes H3K4me3 and H3K27me3 ChIP-seq data sets.

Sources of Funding

This study was funded with grants from the University of Rouen Normandy, the University Hospital Federation Early Markers of Cardiovascular Remodeling in Valvulopathy and Heart Failure (FHU REMOD-VHF) and generalized institutional funds (INSERM U1096 EnVI laboratory) from French National Institute of Health and Medical Research (INSERM) and the Normandy Region together with the European Union. Julie Rondeaux is co-supported by a fellowship from European Union and Région Normandie. Europe gets involved in Normandie with European Regional Development Fund (ERDF): CPER/FEDER 2015 (DO-IT) and CPER/FEDER 2016 (PACT-CBS). This project required the use of equipment acquired by the Hospital-

University Research in Health project Search Treatment and improve Outcome for Patients with Aortic Stenosis (RHU STOP-AS) supported by the French Government and managed by the National Research Agency (ANR) under the program “Investissements d’avenir” with the reference ANR-16-RHUS-0003.

Author Contributions

JR designed, performed and analyzed all *in vivo* and *in vitro* experiments. DG performed and analyzed echocardiography in mice. SR designed and carried out gene expression experiments. VT performed and analyzed flow cytometry. AD performed and analyzed immunohistochemistry and histology. AC and MB performed ChIP-seq and RNA-seq analysis. JPH carried-out mouse MI model. ZB and CV coordinated collection of peripheral blood samples from cardiology patients. DB and ED designed and coordinated collection of peripheral blood samples from cardiology patients (project EPICAM n°18.07.19.36852 CAT 3, n°-RCB: 2018-A02108-47). DG and VR supervised experiments and provided experimental advice. EB participated in the design of *in vivo* studies. SF designed, supervised and participated in all *in vivo* and *in vitro* experiments. The article draft was prepared by JR, SF and EB. All authors approved the final version of the article.

Competing Interests statement

The authors have no conflicting financial interests.

References

1. Swirski, F. K.; Nahrendorf, M., Cardioimmunology: the immune system in cardiac homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol* **2018**, *18* (12), 733-744.
2. Mouton, A. J.; DeLeon-Pennell, K. Y.; Rivera Gonzalez, O. J.; Flynn, E. R.; Freeman, T. C.; Saucerman, J. J.; Garrett, M. R.; Ma, Y.; Harmancey, R.; Lindsey, M. L., Mapping macrophage polarization over the myocardial infarction time continuum. *Basic Res Cardiol* **2018**, *113* (4), 26.
3. Leuschner, F.; Rauch, P. J.; Ueno, T.; Gorbatov, R.; Marinelli, B.; Lee, W. W.; Dutta, P.; Wei, Y.; Robbins, C.; Iwamoto, Y.; Sena, B.; Chudnovskiy, A.; Panizzi, P.; Keliher, E.; Higgins, J. M.; Libby, P.; Moskowitz, M. A.; Pittet, M. J.; Swirski, F. K.; Weissleder, R.; Nahrendorf, M., Rapid monocyte kinetics in acute myocardial infarction are sustained by extramedullary monocytopoiesis. *J Exp Med* **2012**, *209* (1), 123-37.
4. van Amerongen, M. J.; Harmsen, M. C.; van Rooijen, N.; Petersen, A. H.; van Luyn, M. J., Macrophage depletion impairs wound healing and increases left ventricular remodeling after myocardial injury in mice. *Am J Pathol* **2007**, *170* (3), 818-29.
5. Panizzi, P.; Swirski, F. K.; Figueiredo, J. L.; Waterman, P.; Sosnovik, D. E.; Aikawa, E.; Libby, P.; Pittet, M.; Weissleder, R.; Nahrendorf, M., Impaired infarct healing in atherosclerotic mice with Ly-6C(hi) monocytosis. *J Am Coll Cardiol* **2010**, *55* (15), 1629-38.
6. Hilgendorf, I.; Gerhardt, L. M.; Tan, T. C.; Winter, C.; Holderried, T. A.; Chousterman, B. G.; Iwamoto, Y.; Liao, R.; Zirlik, A.; Scherer-Crosbie, M.; Hedrick, C. C.; Libby, P.; Nahrendorf, M.; Weissleder, R.; Swirski, F. K., Ly-6Chigh

monocytes depend on Nr4a1 to balance both inflammatory and reparative phases in the infarcted myocardium. *Circ Res* **2014**, *114* (10), 1611-22.

7. Shiraishi, M.; Shintani, Y.; Ishida, H.; Saba, R.; Yamaguchi, A.; Adachi, H.; Yashiro, K.; Suzuki, K., Alternatively activated macrophages determine repair of the infarcted adult murine heart. *J Clin Invest* **2016**, *126* (6), 2151-66.

8. Davis, F. M.; Gallagher, K. A., Epigenetic Mechanisms in Monocytes/Macrophages Regulate Inflammation in Cardiometabolic and Vascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2019**, *39* (4), 623-634.

9. Van den Bossche, J.; Neele, A. E.; Hoeksema, M. A.; de Winther, M. P., Macrophage polarization: the epigenetic point of view. *Curr Opin Lipidol* **2014**, *25* (5), 367-73.

10. Bowdridge, S.; Gause, W. C., Regulation of alternative macrophage activation by chromatin remodeling. *Nat Immunol* **2010**, *11* (10), 879-81.

11. Satoh, T.; Takeuchi, O.; Vandenbon, A.; Yasuda, K.; Tanaka, Y.; Kumagai, Y.; Miyake, T.; Matsushita, K.; Okazaki, T.; Saitoh, T.; Honma, K.; Matsuyama, T.; Yui, K.; Tsujimura, T.; Standley, D. M.; Nakanishi, K.; Nakai, K.; Akira, S., The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. *Nat Immunol* **2010**, *11* (10), 936-44.

12. Hsu, A. T.; Lupancu, T. J.; Lee, M. C.; Fleetwood, A. J.; Cook, A. D.; Hamilton, J. A.; Achuthan, A., Epigenetic and transcriptional regulation of IL4-induced CCL17 production in human monocytes and murine macrophages. *J Biol Chem* **2018**, *293* (29), 11415-11423.

13. Ishii, M.; Wen, H.; Corsa, C. A.; Liu, T.; Coelho, A. L.; Allen, R. M.; Carson, W. F.; Cavassani, K. A.; Li, X.; Lukacs, N. W.; Hogaboam, C. M.; Dou, Y.; Kunkel,

S. L., Epigenetic regulation of the alternatively activated macrophage phenotype.

Blood **2009**, *114* (15), 3244-54.

14. Mandal, M.; Powers, S. E.; Maienschein-Cline, M.; Bartom, E. T.; Hamel, K. M.; Kee, B. L.; Dinner, A. R.; Clark, M. R., Epigenetic repression of the I κ k locus by STAT5-mediated recruitment of the histone methyltransferase Ezh2. *Nat Immunol* **2011**, *12* (12), 1212-20.

15. Su, I. H.; Basavaraj, A.; Krutchinsky, A. N.; Hobert, O.; Ullrich, A.; Chait, B. T.; Tarakhovsky, A., Ezh2 controls B cell development through histone H3 methylation and Igh rearrangement. *Nat Immunol* **2003**, *4* (2), 124-31.

16. Tumes, D. J.; Onodera, A.; Suzuki, A.; Shinoda, K.; Endo, Y.; Iwamura, C.; Hosokawa, H.; Koseki, H.; Tokoyoda, K.; Suzuki, Y.; Motohashi, S.; Nakayama, T., The polycomb protein Ezh2 regulates differentiation and plasticity of CD4(+) T helper type 1 and type 2 cells. *Immunity* **2013**, *39* (5), 819-32.

17. Gunawan, M.; Venkatesan, N.; Loh, J. T.; Wong, J. F.; Berger, H.; Neo, W. H.; Li, L. Y.; La Win, M. K.; Yau, Y. H.; Guo, T.; See, P. C.; Yamazaki, S.; Chin, K. C.; Gingras, A. R.; Shochat, S. G.; Ng, L. G.; Sze, S. K.; Ginhoux, F.; Su, I. H., The methyltransferase Ezh2 controls cell adhesion and migration through direct methylation of the extranuclear regulatory protein talin. *Nat Immunol* **2015**, *16* (5), 505-16.

18. Qiao, Y.; Kang, K.; Giannopoulou, E.; Fang, C.; Ivashkiv, L. B., IFN- γ Induces Histone 3 Lysine 27 Trimethylation in a Small Subset of Promoters to Stably Silence Gene Expression in Human Macrophages. *Cell Rep* **2016**, *16* (12), 3121-3129.

19. Neele, A. E.; de Winther, M. P. J., Repressing the repressor: Ezh2 mediates macrophage activation. *J Exp Med* **2018**, *215* (5), 1269-1271.

20. Zhang, X.; Wang, Y.; Yuan, J.; Li, N.; Pei, S.; Xu, J.; Luo, X.; Mao, C.; Liu, J.; Yu, T.; Gan, S.; Zheng, Q.; Liang, Y.; Guo, W.; Qiu, J.; Constantin, G.; Jin, J.; Qin, J.; Xiao, Y., Macrophage/microglial Ezh2 facilitates autoimmune inflammation through inhibition of Socs3. *J Exp Med* **2018**, *215* (5), 1365-1382.
21. Zhou, V. W.; Goren, A.; Bernstein, B. E., Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nat Rev Genet* **2011**, *12* (1), 7-18.
22. Voigt, P.; Tee, W. W.; Reinberg, D., A double take on bivalent promoters. *Genes Dev* **2013**, *27* (12), 1318-38.
23. Davis, C. A.; Hitz, B. C.; Sloan, C. A.; Chan, E. T.; Davidson, J. M.; Gabdank, I.; Hilton, J. A.; Jain, K.; Baymuradov, U. K.; Narayanan, A. K.; Onate, K. C.; Graham, K.; Miyasato, S. R.; Dreszer, T. R.; Strattan, J. S.; Jolanki, O.; Tanaka, F. Y.; Cherry, J. M., The Encyclopedia of DNA elements (ENCODE): data portal update. *Nucleic Acids Res* **2018**, *46* (D1), D794-D801.
24. Consortium, E. P., An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* **2012**, *489* (7414), 57-74.
25. Kim, K. H.; Kim, W.; Howard, T. P.; Vazquez, F.; Tsherniak, A.; Wu, J. N.; Wang, W.; Haswell, J. R.; Walensky, L. D.; Hahn, W. C.; Orkin, S. H.; Roberts, C. W., SWI/SNF-mutant cancers depend on catalytic and non-catalytic activity of EZH2. *Nat Med* **2015**, *21* (12), 1491-6.
26. Su, I. H.; Dobenecker, M. W.; Dickinson, E.; Oser, M.; Basavaraj, A.; Marqueron, R.; Viale, A.; Reinberg, D.; Wülfing, C.; Tarakhovskiy, A., Polycomb group protein ezh2 controls actin polymerization and cell signaling. *Cell* **2005**, *121* (3), 425-36.

27. Roy, A.; Basak, N. P.; Banerjee, S., Notch1 intracellular domain increases cytoplasmic EZH2 levels during early megakaryopoiesis. *Cell Death Dis* **2012**, *3*, e380.
28. Anwar, T.; Arellano-Garcia, C.; Ropa, J.; Chen, Y. C.; Kim, H. S.; Yoon, E.; Grigsby, S.; Basrur, V.; Nesvizhskii, A. I.; Muntean, A.; Gonzalez, M. E.; Kidwell, K. M.; Nikolovska-Coleska, Z.; Kleer, C. G., p38-mediated phosphorylation at T367 induces EZH2 cytoplasmic localization to promote breast cancer metastasis. *Nat Commun* **2018**, *9* (1), 2801.
29. Wang, Y.; Xie, Y.; Li, L.; He, Y.; Zheng, D.; Yu, P.; Yu, L.; Tang, L.; Wang, Z., EZH2 RIP-seq Identifies Tissue-specific Long Non-coding RNAs. *Curr Gene Ther* **2018**, *18* (5), 275-285.
30. Wang, Z.; Zhang, X. J.; Ji, Y. X.; Zhang, P.; Deng, K. Q.; Gong, J.; Ren, S.; Wang, X.; Chen, I.; Wang, H.; Gao, C.; Yokota, T.; Ang, Y. S.; Li, S.; Cass, A.; Vondriska, T. M.; Li, G.; Deb, A.; Srivastava, D.; Yang, H. T.; Xiao, X.; Li, H.; Wang, Y., The long noncoding RNA Chaer defines an epigenetic checkpoint in cardiac hypertrophy. *Nat Med* **2016**, *22* (10), 1131-1139.
31. Gamrekelashvili, J.; Giagnorio, R.; Jussofie, J.; Soehnlein, O.; Duchene, J.; Briseño, C. G.; Ramasamy, S. K.; Krishnasamy, K.; Limbourg, A.; Kapanadze, T.; Ishifune, C.; Hinkel, R.; Radtke, F.; Strobl, L. J.; Zimmer-Strobl, U.; Napp, L. C.; Bauersachs, J.; Haller, H.; Yasutomo, K.; Kupatt, C.; Murphy, K. M.; Adams, R. H.; Weber, C.; Limbourg, F. P., Regulation of monocyte cell fate by blood vessels mediated by Notch signalling. *Nat Commun* **2016**, *7*, 12597.
32. Pepin, M. E.; Ha, C. M.; Crossman, D. K.; Litovsky, S. H.; Varambally, S.; Barchue, J. P.; Pamboukian, S. V.; Diakos, N. A.; Drakos, S. G.; Pogwizd, S. M.;

- Wende, A. R., Genome-wide DNA methylation encodes cardiac transcriptional reprogramming in human ischemic heart failure. *Lab Invest* **2019**, *99* (3), 371-386.
33. Dusi, V.; Ghidoni, A.; Ravera, A.; De Ferrari, G. M.; Calvillo, L., Corrigendum to "Chemokines and Heart Disease: A Network Connecting Cardiovascular Biology to Immune and Autonomic Nervous Systems". *Mediators Inflamm* **2018**, *2018*, 4128049.
34. Nossent, A. Y.; Bastiaansen, A. J.; Peters, E. A.; de Vries, M. R.; Aref, Z.; Welten, S. M.; de Jager, S. C.; van der Pouw Kraan, T. C.; Quax, P. H., CCR7-CCL19/CCL21 Axis is Essential for Effective Arteriogenesis in a Murine Model of Hindlimb Ischemia. *J Am Heart Assoc* **2017**, *6* (3).
35. Abbadi, D.; Laroumanie, F.; Bizou, M.; Pozzo, J.; Daviaud, D.; Delage, C.; Calise, D.; Gaits-Iacovoni, F.; Dutaur, M.; Tortosa, F.; Renaud-Gabardos, E.; Douin-Echinard, V.; Prats, A. C.; Roncalli, J.; Parini, A.; Pizzinat, N., Local production of tenascin-C acts as a trigger for monocyte/macrophage recruitment that provokes cardiac dysfunction. *Cardiovasc Res* **2018**, *114* (1), 123-137.
36. Kimura, T.; Tajiri, K.; Sato, A.; Sakai, S.; Wang, Z.; Yoshida, T.; Uede, T.; Hiroe, M.; Aonuma, K.; Ieda, M.; Imanaka-Yoshida, K., Tenascin-C accelerates adverse ventricular remodelling after myocardial infarction by modulating macrophage polarization. *Cardiovasc Res* **2019**, *115* (3), 614-624.
37. Liao, S.; Cheng, G.; Conner, D. A.; Huang, Y.; Kucherlapati, R. S.; Munn, L. L.; Ruddle, N. H.; Jain, R. K.; Fukumura, D.; Padera, T. P., Impaired lymphatic contraction associated with immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, *108* (46), 18784-9.

38. Kim, D.; Paggi, J. M.; Park, C.; Bennett, C.; Salzberg, S. L., Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nat Biotechnol* **2019**, *37* (8), 907-915.
39. Liao, Y.; Smyth, G. K.; Shi, W., featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* **2014**, *30* (7), 923-30.
40. Love, M. I.; Huber, W.; Anders, S., Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **2014**, *15* (12), 550.
41. Huang, d. W.; Sherman, B. T.; Lempicki, R. A., Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* **2009**, *37* (1), 1-13.
42. Huang, d. W.; Sherman, B. T.; Lempicki, R. A., Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* **2009**, *4* (1), 44-57.
43. de Hoon, M. J.; Imoto, S.; Nolan, J.; Miyano, S., Open source clustering software. *Bioinformatics* **2004**, *20* (9), 1453-4.
44. Saldanha, A. J., Java Treeview--extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics* **2004**, *20* (17), 3246-8.
45. Langmead, B.; Wilks, C.; Antonescu, V.; Charles, R., Scaling read aligners to hundreds of threads on general-purpose processors. *Bioinformatics* **2019**, *35* (3), 421-432.
46. Langmead, B.; Salzberg, S. L., Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* **2012**, *9* (4), 357-9.

47. Li, H.; Handsaker, B.; Wysoker, A.; Fennell, T.; Ruan, J.; Homer, N.; Marth, G.; Abecasis, G.; Durbin, R.; Subgroup, G. P. D. P., The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **2009**, *25* (16), 2078-9.
48. Zhang, Y.; Liu, T.; Meyer, C. A.; Eeckhoute, J.; Johnson, D. S.; Bernstein, B. E.; Nusbaum, C.; Myers, R. M.; Brown, M.; Li, W.; Liu, X. S., Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol* **2008**, *9* (9), R137.
49. Liu, T., Use model-based Analysis of ChIP-Seq (MACS) to analyze short reads generated by sequencing protein-DNA interactions in embryonic stem cells. *Methods Mol Biol* **2014**, *1150*, 81-95.
50. Quinlan, A. R.; Hall, I. M., BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* **2010**, *26* (6), 841-2.
51. Huang, W.; Loganantharaj, R.; Schroeder, B.; Fargo, D.; Li, L., PAVIS: a tool for Peak Annotation and Visualization. *Bioinformatics* **2013**, *29* (23), 3097-9.
52. Brand, M.; Rampalli, S.; Chaturvedi, C. P.; Dilworth, F. J., Analysis of epigenetic modifications of chromatin at specific gene loci by native chromatin immunoprecipitation of nucleosomes isolated using hydroxyapatite chromatography. *Nat Protoc* **2008**, *3* (3), 398-409.

Figures

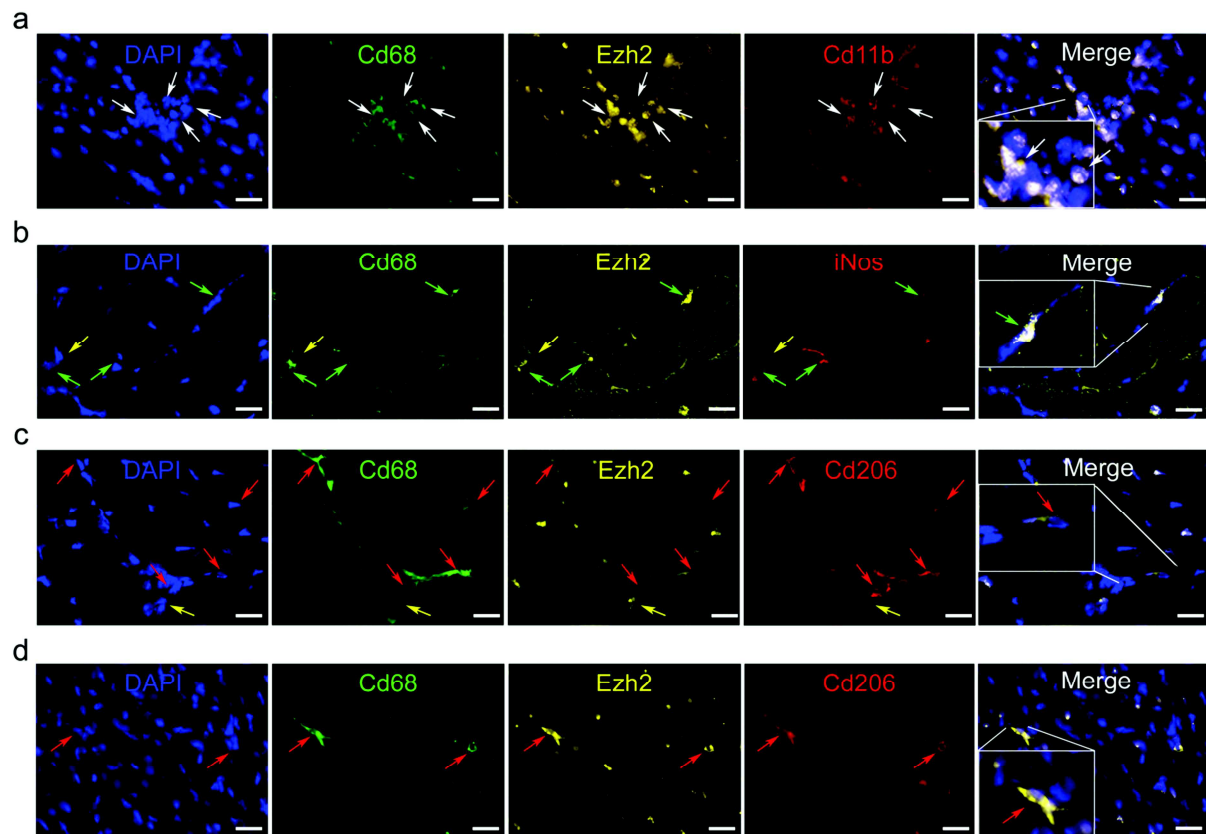


Figure 1: Ezh2 is translocated to the cytoplasm in cardiac M2 macrophages *in vivo*

Representative pictures of cardiac immunostaining for Ezh2 in (a) Cd11b⁺/Cd68⁻ monocytes, (b) Cd68⁺/iNos⁺ M1 differentiated macrophages, (c) Cd68⁺/Cd206⁺ M2-like differentiated macrophages at 24h after coronary ligation in mice to induce MI or (d) cardiac-resident M2 macrophages in healthy sham mice. Nuclei were stained with DAPI (*blue*), myeloid markers were Cd11b (*red, panel a*), Cd68 (*green, panels a-d*), iNos (*red, panel b*), and Cd206 (*red, panels c and d*). Ezh2 (*yellow*) cellular localization was observed in each cell type but only appeared in M2 macrophages cytoplasm. Arrows indicate monocytes (white), non-determined macrophages (yellow), M1 (green) and M2 macrophages (red), scale bars represent 25 μm.

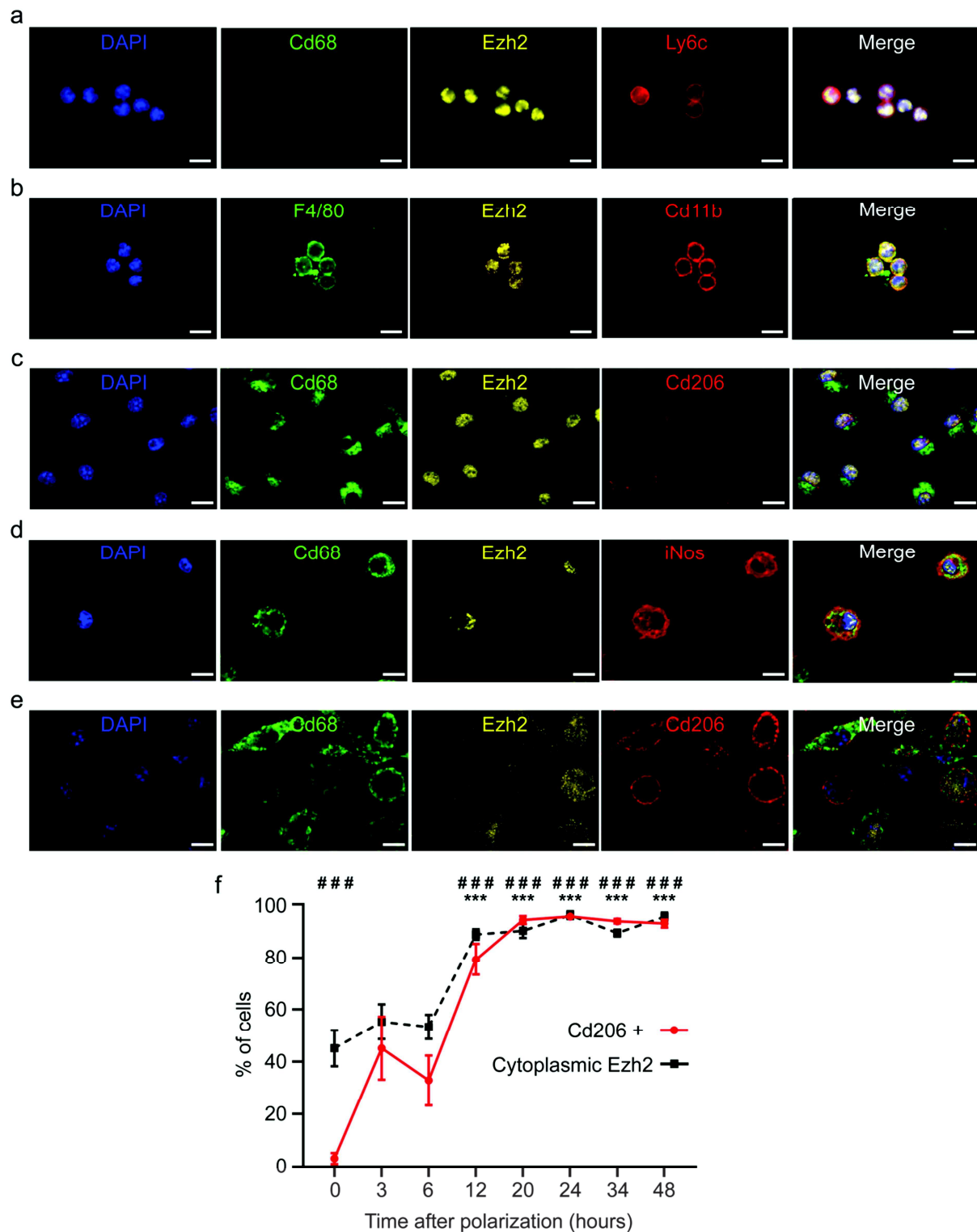


Figure 2: Ezh2 is translocated to the cytoplasm in myeloid cells during M2 polarization *in vitro*

Representative pictures of immunostaining for Ezh2 in (a) non-adherent monocytes, (b) adherent monocytes, (c) non-polarized M0 macrophages, (d) M1 macrophages

and (e) M2 macrophages, differentiated and polarized *in vitro*. Nuclei were stained with DAPI (blue), monocytes were identified based on Ly6c or Cd11b (*red*, panels a and b) expression, and macrophages based on Cd68 (*green*, panels a, and c-e) or F4/80 (*green*, panel b) expression. M1 or M2 macrophage phenotype was determined by expression of iNos (*red*, panel d) or Cd206 (*red*, panels c and e). Ezh2 (yellow) cellular localization was observed in each cell type. Scale bars represent 10 μ m. Kinetics of Ezh2 subcellular localization and Cd206 expression (f) were assessed by immunostaining during M2 macrophage polarization. Data are represented as percentage of total cells mean values \pm SEM of 3 independent experiments (n=3) each performed in duplicate for all time points. Asterisk (*) symbol indicates statistically significant difference between cells with either nuclear or cytoplasmic Ezh2 localization. Hashtag (#) depicts significant difference between Cd206 negative and positive cells. ### and ***p <0.001; Two-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons test.

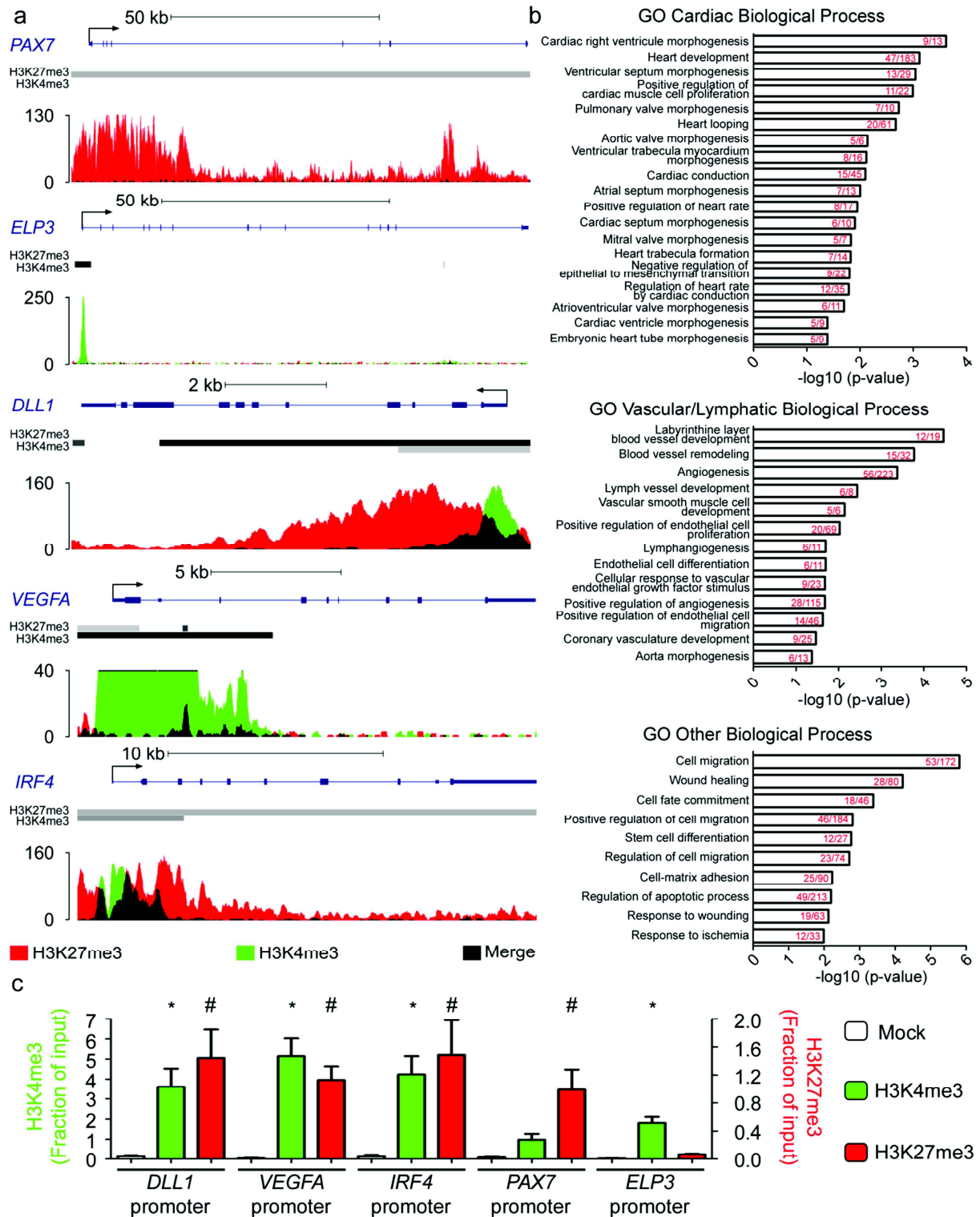


Figure 3: Ezh2-regulated bivalent genes in monocytes are implicated in cardiovascular repair processes

Representative tracks and peak calling for promoters of inactive (*PAX7*), active (*ELP3*) and bivalent (*DLL1*, *VEGFA*, *IRF4*) genes (a) generated by ChIP-Seq

analysis of human CD14+ monocytes. Representative Gene Ontology (GO)

Biological Process categories significantly enriched for bivalent genes in human

CD14+ monocytes. Number of genes revealed by the analysis within the number of

overall genes in each GO biological process category indicated in red (b).

Quantification of H3K27me3 inactive (red) versus H3K4me3 active (green) histone

marks in the promoter regions of three bivalent and two non-bivalent genes, as

assessed by ChIP-qPCR (c). Data represent mean fractions of input \pm SEM of three

independent experiments, corresponding to three different human donors, performed

in duplicate (n=3). Asterisk (*) symbol indicates H3K4me3 statistically significant

enrichment compared to the inactive *PAX7* promoter (Kruskal-Wallis test). Hashtag

(#) depicts H3K27me3 significant enrichment compared to the active *ELP3*: *p <0.05

and # p <0.05.

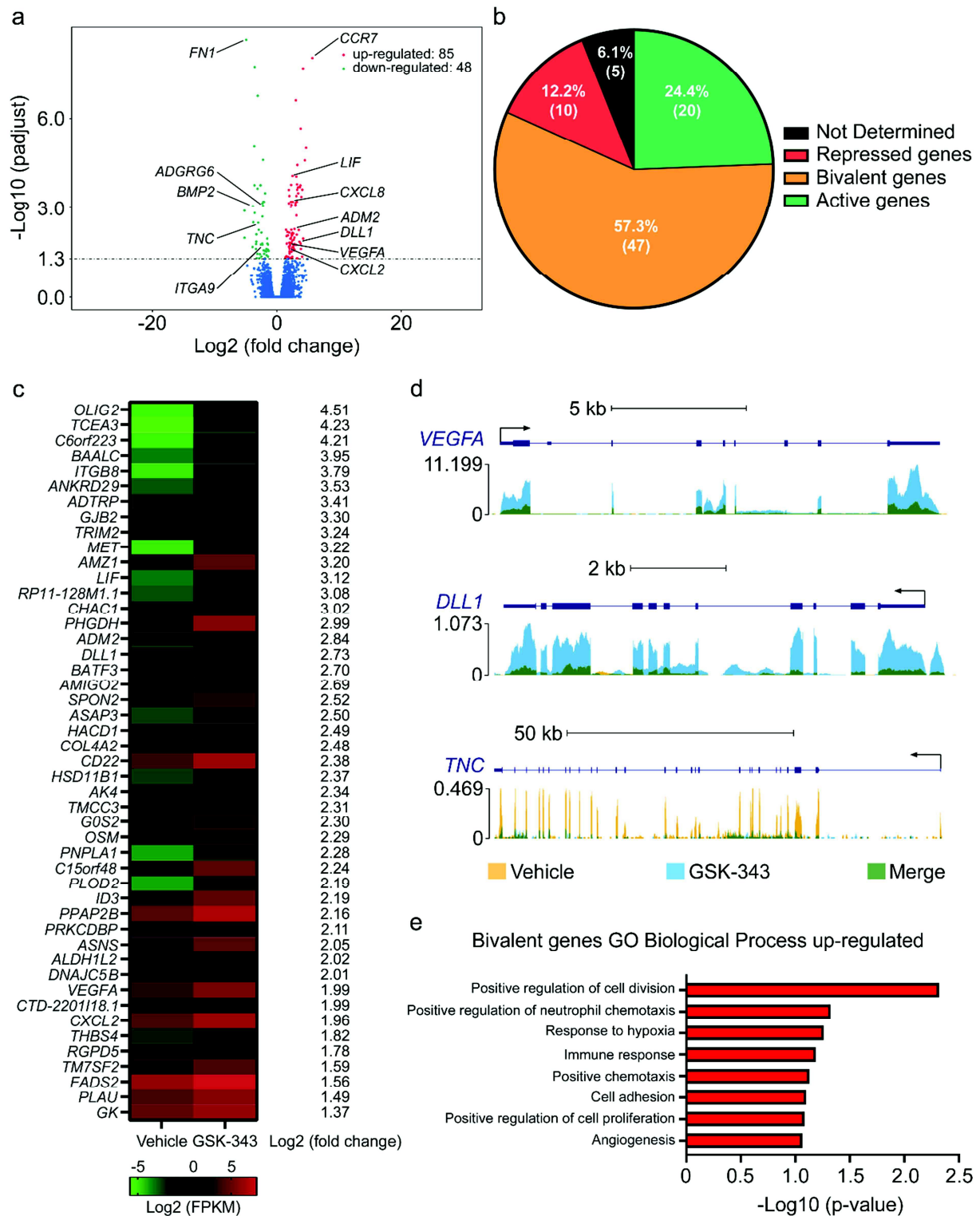


Figure 4: Ezh2 pharmacological inhibition with GSK-343 increases bivalent gene expression and enhances human monocyte homing and angiogenic functions *in vitro*

Global changes in gene expression upon GSK-343 treatment versus vehicle treatment analyzed by mRNA-seq (a) in cultured human monocytes. Volcano plot shows upregulated (red) and downregulated (green) genes (combined data from three different donors, $n = 3$). Classification of GSK-343-induced genes according to promoter status (b). Heatmaps of all significantly up-regulated bivalent genes identified by RNA-seq analysis in human monocytes after GSK-343 treatment (c). Data obtained from three independent donors ($n = 3$) are expressed in \log_2 (FPKM). Representative tracks of changes, induced by GSK-343 treatment, in the epigenetic landscape in the promotor region of select up- and down-regulated genes in human monocytes (d). Representative Gene Ontology (GO) Biological Process categories significantly enriched for GSK-343-induced bivalent genes in human monocytes (e).

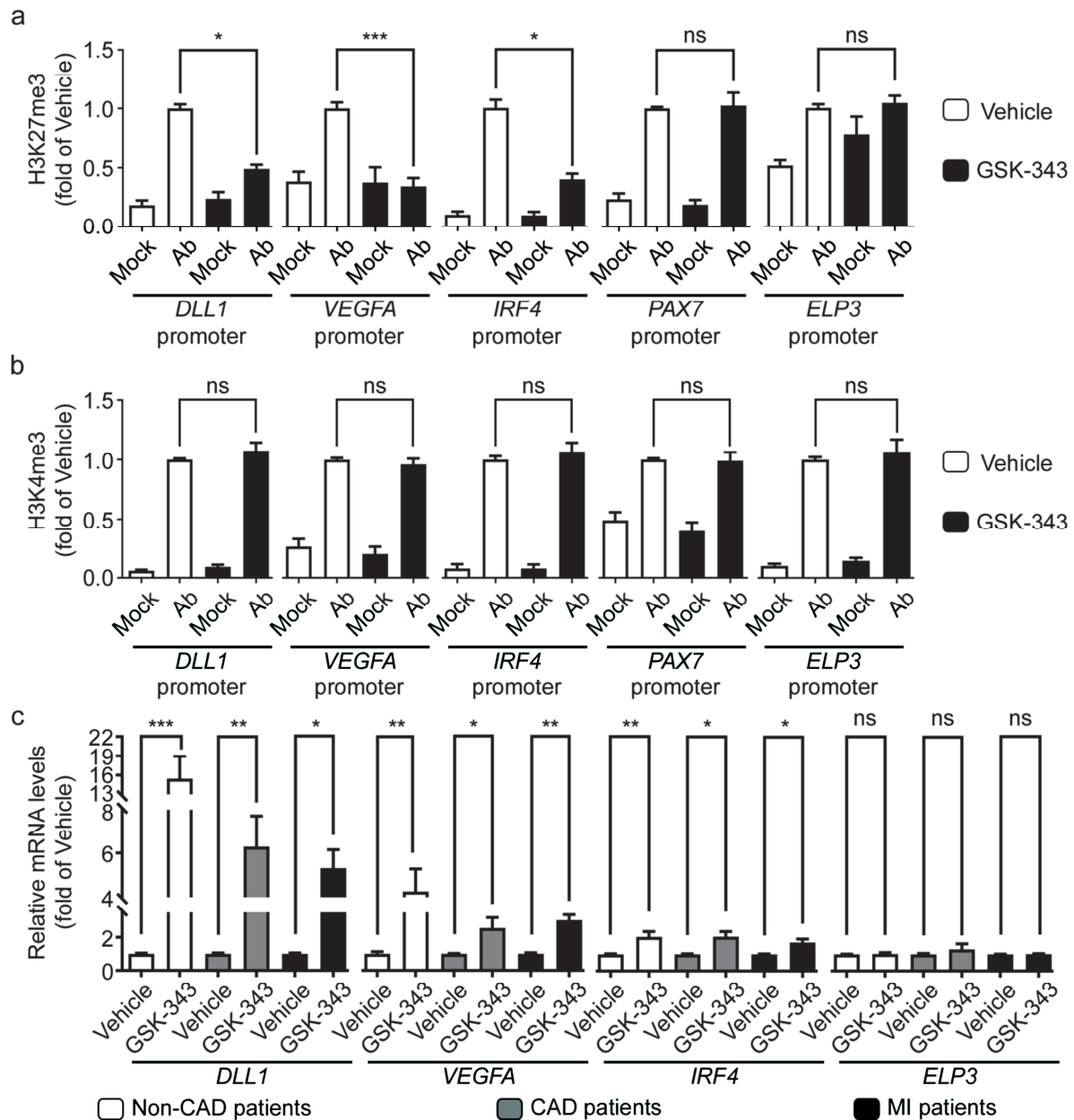


Figure 5: Pharmacologic inhibition of EZH2 increases specifically bivalent gene expression through H3K27me3 demethylation in monocytes *in vitro*

Enrichment of selected bivalent (*DLL1*, *VEGFA*, *IRF4*), inactive (*PAX7*) and active (*ELP3*) gene promoters in H3K27me3 (a) and H3K4me3 (b) as assessed by ChIP-qPCR. Ab indicates the enrichment obtain with either H3K27me3 (a) or H3K4me3 (b) targeting antibodies, while Mock represents the data obtain after immunoprecipitation with control IgG. Data are represented as mean fractions of input normalized to

vehicle-treated monocytes \pm SEM of three independent experiments corresponding to three different donors performed in duplicate (n=3). The p values are depicted as asterisks in the figures as follows: ***p <0.001; **p <0.01; *p <0.05; ns: non-significant enrichment compared to vehicle-treated monocytes. Transcript levels of indicated genes were measured by RT-qPCR following treatment with vehicle or GSK-343 of selected monocytes from non-coronary patients, CAD or AMI patients (c). RT-qPCR values are expressed as mean percentages of vehicle-treated monocytes \pm SEM with B2M serving as internal control of four independent experiments corresponding to four different donors per group performed in duplicate (n=4). ***p <0.001; **p <0.01; *p <0.05; ns: non-significant.

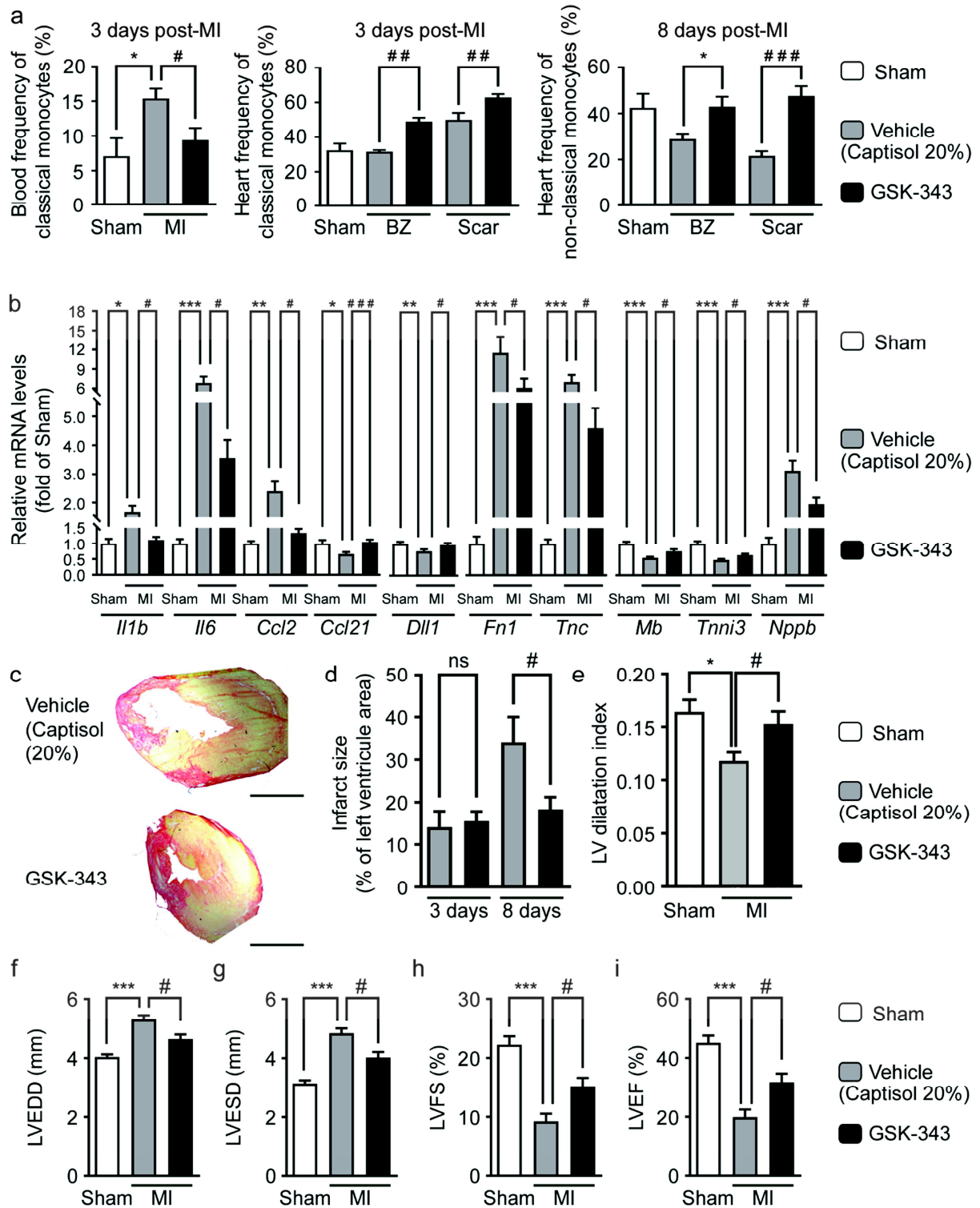
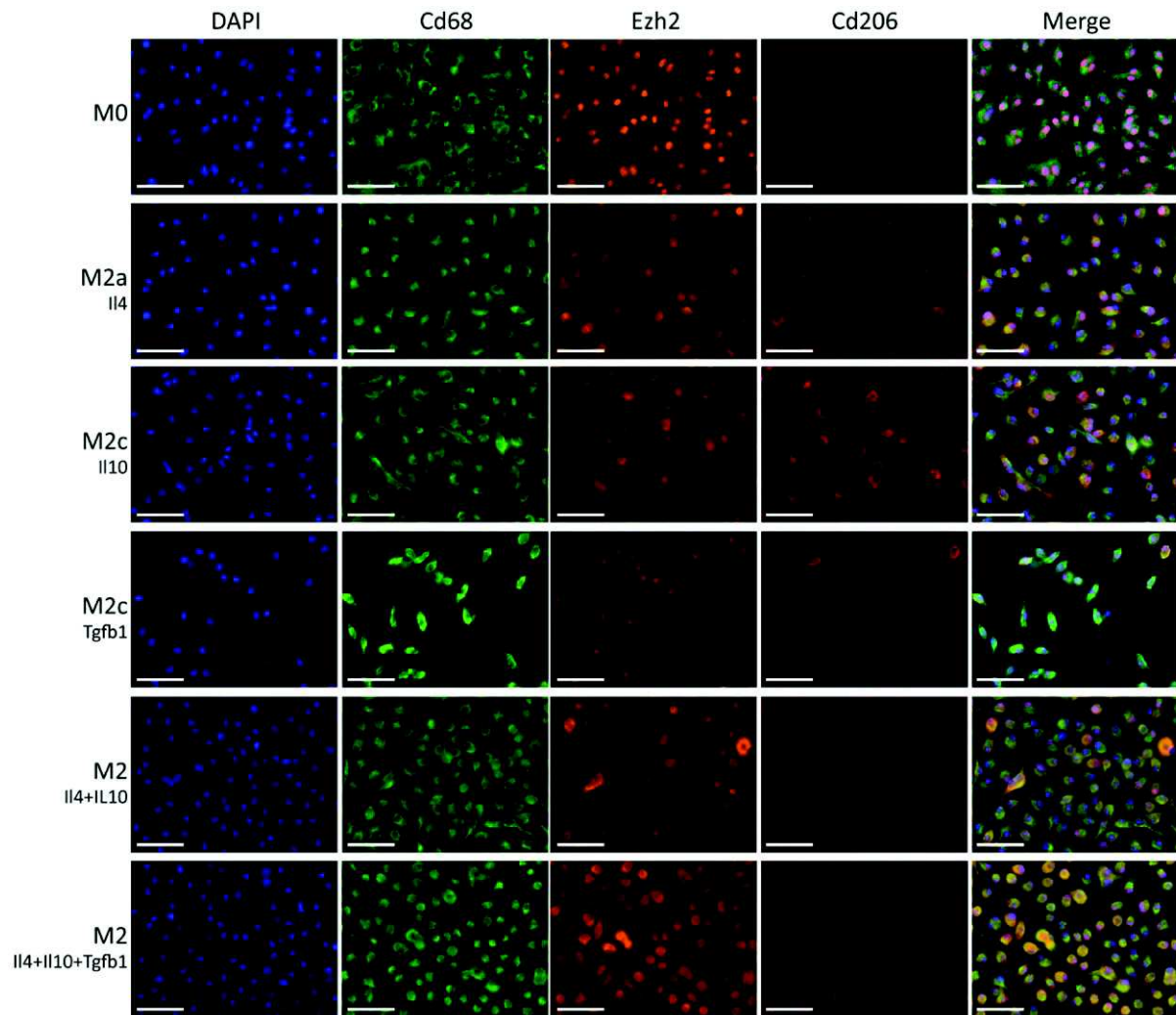


Figure 6: Pharmacological Ezh2 inhibition with GSK-343 accelerates cardiac inflammatory resolution and prevents infarct expansion and subsequent cardiac dysfunction after MI

Circulating (3 days after MI) and cardiac (3 days and 8 days after MI respectively for center and right panels) classical (Cd11b^{hi}Ly6c^{hi}) and non-classical (Cd11b^{hi}Ly6c^{lo}) monocyte population frequencies were evaluated by flow cytometry. Samples were collected from sham (n=4) and MI mice treated daily either with vehicle (captisol 20%, n=13 blood samples, n=4 cardiac samples) or GSK-343 either from the infarcted scar area or from the healthy border zone (BZ). (a). Data are expressed as mean frequency \pm SEM of live CD45⁺/Cd19^{neg} cells. Cardiac transcript levels of indicated genes measured by RT-qPCR from sham (n=8), or vehicle (n=16) or GSK-343-treated (n=18) mice at 8 days after MI (b). Values expressed as mean percentages of sham \pm SEM with B2m serving as internal control. Representative pictures of infarct scar and M-mode echocardiography in sham, vehicle and GSK-343 treated mice at 8 days post-MI (c). Scale bar represents 1 mm. Infarct size assessed in vehicle (n=5-7) or GSK-343 treated (n=6-7) MI-mice (d). Data represent mean percentage of left ventricle area \pm SEM with # p <0.05; ns: non-significant. Quantitative analysis of LV dilatation index (e) and echo parameters for wall thickness (e), LVEDD (f), LVESD (g), LVFS (h) and LVEF (i) in sham (n=8), vehicle (n=14) and GSK-343 (n=18) treated mice at 8 days post-MI. Data are presented as means \pm SEM. Asterisk (*) and hashtag (#) symbols indicates statistically significant difference compared to sham and vehicle condition respectively after Kruskal-Wallis test. # p <0.05, *** p <0.001.

Supplementary information

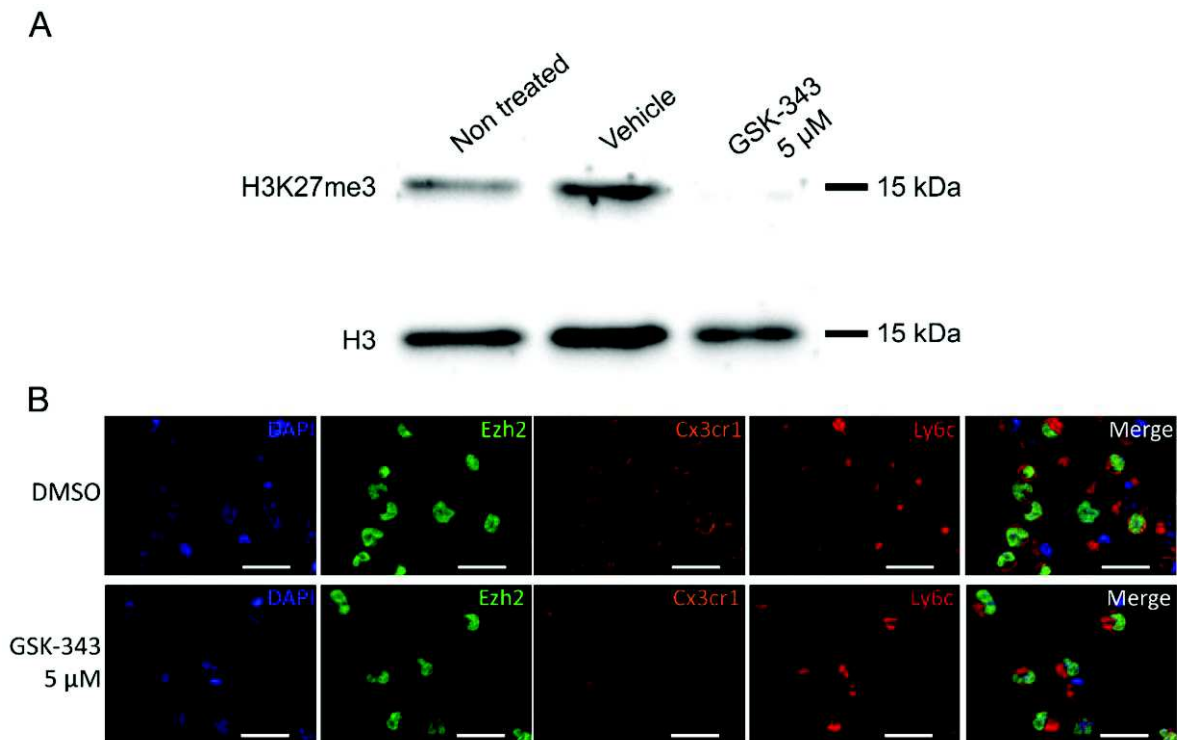


Supplementary figure S1: Ezh2 cytoplasmic translocation is not restricted to a single M2 macrophage phenotype

Representative pictures of immunostaining for mature non-polarized M0 macrophages, M2 differentially polarized macrophages with either single IL4 for M2a, IL10 or Tgfb1 for M2c, or combinations of cytokines *in vitro*. Nuclei were stained with DAPI (blue), macrophages with Cd68 (green) and M2 polarization was assessed based on Cd206 (red) expression. Ezh2 (orange) cellular localization was observed in all cell type but only appeared in M2 macrophages cytoplasm. Scale bars represent 50 μm .

Supplementary table 1: list of bivalent genes identified by CHIP-Sequencing in CD14+human monocytes

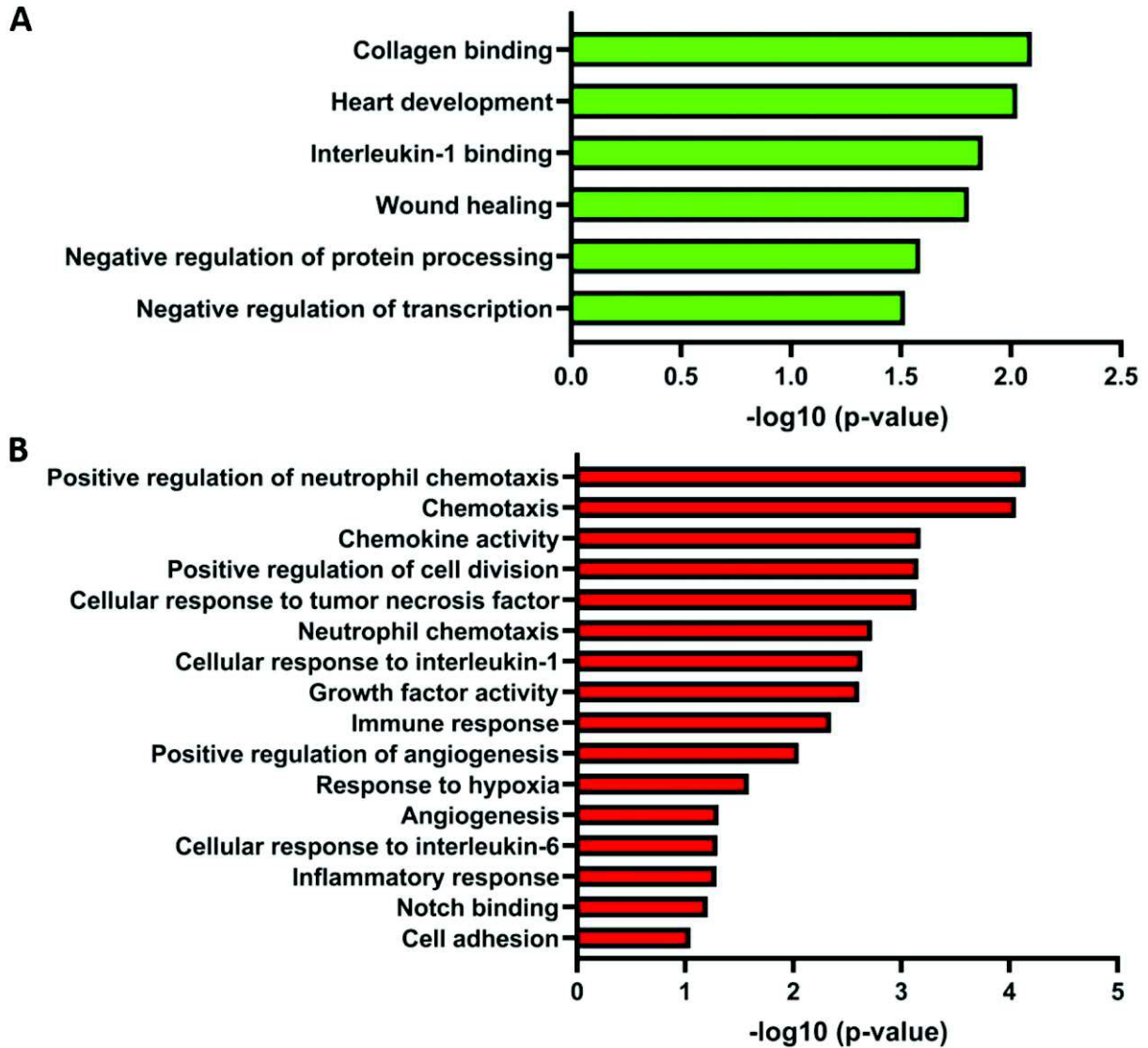
See online article supplementary data.



Supplementary figure S2: GSK-343 reduces H3K27me3 levels without altering Ezh2 expression in murine monocytes

((A) GSK-343-treatment in murine monocytes (TIB-204 cell line) decreased histone H3K27me3 levels, as determined by western blot. Molecular weights are indicated in kDa. Total histone H3 serves as loading control.

(B) Representative pictures of immunostaining of mouse monocytes treated for 72h with vehicle or GSK-343 (5 μ M). Nuclei were stained with DAPI (*blue*), Ezh2 (*green*) cellular localization was analyzed in Cx3cr1 (*orange*) and Ly6c (*red*) expressing monocytes. Scale bars represent 25 μ m.



Supplementary figure S3: GSK-343 treatment of human monocytes promotes expression of genes regulating chemotaxis and angiogenesis

Representative Gene Ontology (GO) Biological Process categories significantly enriched for down- (A) and up-regulated (B) genes in human monocytes treated with GSK-343 as determined by mRNA-Seq.

Gene	GSK_01.value	DMSO_01.value	log2foldchange	pvalue	padjust	significance	gene_name	gene_description	Status with UCSC	Status with bivalent gene list
ENSG00000115318	16,90340805	41,82590098	-1,30708157	0.00014180925710981	0.0272591850489212	VRAI	LOXL3	lysyl oxidase like 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:13869]	Bivalent	1
ENSG00000100276	0,518094646	1,382776744	-1,416279965	0.000240650998476749	0.0419466926836422	VRAI	RASL10A	RAS like family 10 member A [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:16954]	Bivalent	2
ENSG00000175857	52,63683984	141,2733249	-1,42434323	7.14130527826332e-05	0.0168464513932025	VRAI	GAPT	GRB2 binding adaptor protein, transmembrane [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:26588]	Active	1
ENSG00000175262	1,969817423	5,48081695	-1,476328092	0.000122584873419378	0.0247188791812723	VRAI	C1orf127	chromosome 1 open reading frame 127 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:26730]	Active	2
ENSG00000048342	0,620791654	1,783657865	-1,522657033	6.19110469432101e-05	0.01580089192589962	VRAI	CC2D2A	coiled-coil and C2 domain containing 2A [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:29253]	Active	3
ENSG00000157240	7,007214498	20,52645742	-1,550570516	3.74114544060821e-05	0.0108216797481427	VRAI	FZD1	frizzled class receptor 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4038]	Bivalent	3
ENSG00000167210	0,115024025	0,359130566	-1,642572308	0.000213479419668391	0.0378521095149955	VRAI	LOXHD1	lipoygenase homology domains 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:26521]	Active	4
ENSG00000179057	0,334368142	1,053407598	-1,65555346	0.000116072545046163	0.023637426791236	VRAI	IGSF22	immunoglobulin superfamily member 22 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:26750]	Bivalent	4
ENSG00000186862	0,389479705	1,263312378	-1,697590238	0.000151338590403431	0.0286963461922992	VRAI	PDZD7	PDZ domain containing 7 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:26257]	Bivalent	5
ENSG00000123700	2,438566396	8,971139892	-1,879257012	4.14454834722703e-07	0.000315722482984317	VRAI	KCNJ2	potassium voltage-gated channel subfamily J member 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6263]	Active	5
ENSG00000158457	11,23016077	42,13189958	-1,907532174	0.000308235320918634	0.0477467055364127	VRAI	TSPAN33	tetraspanin 33 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:28743]	Bivalent	6
ENSG00000151491	6,206256345	23,39241018	-1,914243377	0.000140836289044963	0.0272591850489212	VRAI	EP58	epidermal growth factor receptor pathway substrate 8 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3420]	Bivalent	7
ENSG00000154262	0,527112264	2,179459	-2,04778594	0.000188674379646835	0.0340408301804921	VRAI	ABCA6	ATP binding cassette subfamily A member 6 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:36]	Active	6
ENSG00000074706	0,666276936	2,786709618	-2,064367718	1.00104850430745e-06	0.000613431971869977	VRAI	IPCE1A	interaction protein for cytohesin exchange factors 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:21204]	Bivalent	8
ENSG00000179639	0,745711943	3,2819301	-2,137852257	0.000133714716569119	0.0261928027656538	VRAI	FCER1A	Fc fragment of IgE receptor 1a [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3609]	Repressed	1
ENSG00000048052	3,477952774	15,7745205	-2,181284334	1.0438603177484e-06	0.000613431971869977	VRAI	HDAC9	histone deacetylase 9 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:14065]	Active	7
ENSG00000112414	0,168102866	0,779936723	-2,214011544	1.66640826469572e-06	0.000836971248494187	VRAI	ADGRG6	adhesion G protein-coupled receptor G6 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:13841]	Bivalent	9
ENSG00000232229	0,12352689	0,57331564	-2,21450365	1.18568295678267e-08	2.4387127055106e-05	VRAI	LINC00865	long intergenic non-protein coding RNA 865 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:45170]	Bivalent	10
ENSG00000186188	0,284491385	1,404590315	-2,303691084	1.2796778133649e-06	0.000692642454349715	VRAI	FFAR4	free fatty acid receptor 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:19061]	Bivalent	11
ENSG00000144668	0,891319424	4,409902421	-2,306729812	7.32135937560913e-05	0.0169197437794976	VRAI	ITGA9	integrin subunit alpha 9 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6145]	Bivalent	12
ENSG00000149294	1,647948731	8,20042167	-2,315024805	4.59386031161848e-06	0.00201035146573125	VRAI	NCAM1	neural cell adhesion molecule 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7656]	Bivalent	13
ENSG00000171695	0,132370263	0,671306334	-2,342390606	6.32389392556276e-05	0.01580089192589962	VRAI	LKAAEAR1	LKAAEAR motif containing 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:33718]	Bivalent	14
ENSG00000004799	1,927999155	10,8238549	-2,489034547	0.000243000242504132	0.042000243595168	VRAI	PKD4	pyruvate dehydrogenase kinase 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:8812]	Active	8
ENSG00000171611	0,201719776	1,136613352	-2,494315275	1.87004867077339e-05	0.00681720250632744	VRAI	PTCRA	pre T cell antigen receptor alpha [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:21290]	Active	9
ENSG00000135643	0,507470233	3,02410833	-2,575111674	7.20773883023055e-05	0.0168464513932025	VRAI	KCNMB4	potassium calcium-activated channel subfamily M regulatory beta subunit 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6289]	Bivalent	15
ENSG00000175899	60,70746153	375,0738966	-2,627226595	1.49133740779819e-07	0.000171566719989798	VRAI	A2M	alpha-2-macroglobulin [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7]	Active	10
ENSG00000137727	0,06940628	0,45990424	-2,728191905	0.000196300045639847	0.0351086899019162	VRAI	ARHGAP20	Rho GTPase activating protein 20 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:18357]	Bivalent	16
ENSG00000066056	0,312887415	2,225693986	-2,830535642	0.000306616221066681	0.0477467055364127	VRAI	TIE1	tyrosine kinase with immunoglobulin like and EGF like domains 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11809]	ND	1
ENSG00000141655	1,665551183	12,51992109	-2,910149908	1.43118540158274e-05	0.005554079498066734	VRAI	TNFRSF11A	TNF receptor superfamily member 11a [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11908]	Bivalent	17
ENSG00000041982	0,281877574	2,227960348	-2,982579573	7.71852364658642e-06	0.0032398896808774	VRAI	TNC	tenascin C [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5318]	Repressed	2
ENSG00000151090	0,161572861	1,363517312	-3,077074787	4.23878009144201e-11	1.74366457841558e-07	VRAI	THRB	thyroid hormone receptor beta [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11799]	Bivalent	18
ENSG00000135549	0,193619756	1,659597906	-3,099533372	2.3831865954014e-07	0.000222806281337346	VRAI	PKIB	cAMP-dependent protein kinase inhibitor beta [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9018]	Bivalent	19
ENSG00000205056	0,003621488	0,03186909	-3,137500058	0.000188178806442963	0.0340408301804921	VRAI	CLLU1-AS1	CLLU1 Antisense RNA 1	ND	2
ENSG00000226334	0,04923061	0,467690791	-3,247923847	0.000295176119485813	0.0474311126998766	VRAI	ABCA1	ATP Binding Cassette Subfamily A Member 1	Active	11
ENSG00000169116	0,052036089	0,50879731	-3,289502421	2.32982916888855e-05	0.0078055925365463	VRAI	PARM1	prostate androgen-regulated mucin-like protein 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:24536]	Bivalent	20
ENSG00000166428	0,243299851	2,390421037	-3,296452456	4.94852951420604e-05	0.0135708473397586	VRAI	PLD4	phospholipase D family member 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:23792]	Active	12
ENSG00000155265	0,011985472	0,120710826	-3,332192531	6.73609268774322e-05	0.0162997593413532	VRAI	GOLGA7B	golgin A7 family member B [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:31668]	Bivalent	21
ENSG00000180447	0,014973512	0,153818808	-3,360743252	0.000114758757334128	0.0236035812084835	VRAI	GAS1	growth arrest specific 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4165]	Bivalent	22
ENSG00000188282	0,25343888	2,985917836	-3,558462779	2.69755687872951e-12	1.8494449905695e-08	VRAI	RUFY4	RUN and FYVE domain containing 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:24804]	Active	13
ENSG00000171657	0,633373348	7,488590879	-3,563561119	3.36029867318763e-06	0.00153588051355829	VRAI	GPR82	G protein-coupled receptor 82 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4533]	Bivalent	23
ENSG00000144218	0,311914052	3,773032633	-3,59650029	1.50145904300458e-07	0.000171566719989798	VRAI	AF3	AF4/FMR2 family member 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6473]	Bivalent	24
ENSG00000229754	0,497165828	6,144625281	-3,627522802	3.36820418640811e-09	8.65965296325526e-06	VRAI	CXCR2P1	C-X-C motif chemokine receptor 2 pseudogene 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6028]	Active	14
ENSG00000213250	0,047082292	0,649735626	-3,786591876	7.3426922736294e-06	0.00731463436392502	VRAI	RBM52P1	RNA binding motif single stranded interacting protein 2 pseudogene 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:30994]	Active	15
ENSG00000125845	0,023510202	0,338760641	-3,848903026	1.78274459519103e-06	0.000873035496044976	VRAI	BMP2	bone morphogenetic protein 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1069]	Bivalent	25
ENSG00000157510	0,039789289	0,594944604	-3,902296402	9.36513034833931e-05	0.0204917022345365	VRAI	AFAP1L1	actin filament associated protein 1 like 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:26714]	Bivalent	26
ENSG0000015414	16,25241182	496,8793651	-4,934163879	1.1301732398902e-13	2.32454031980616e-09	VRAI	FN1	fibronectin 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3778]	Bivalent	27
ENSG00000184599	0,009875601	0,362105381	-5,196386733	3.35581744688759e-05	0.0101503607717035	VRAI	TAF3	TAF3 Chemokine Like Family Member 3chemokine like [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:21590]	Active	16
ENSG00000150551	0,013190035	0,484733778	-5,199663944	2.74358562296375e-06	0.00128250157029814	VRAI	LYPD1	LY6/PLAUR domain containing 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:28431]	Repressed	3

Supplementary table 2: list of down-regulated genes and related GO categories in human monocytes treated with GSK-343

Supplementary table 3: list of up-regulated genes and related GO categories in selected circulating human monocytes treated with GSK-343 (part 1)

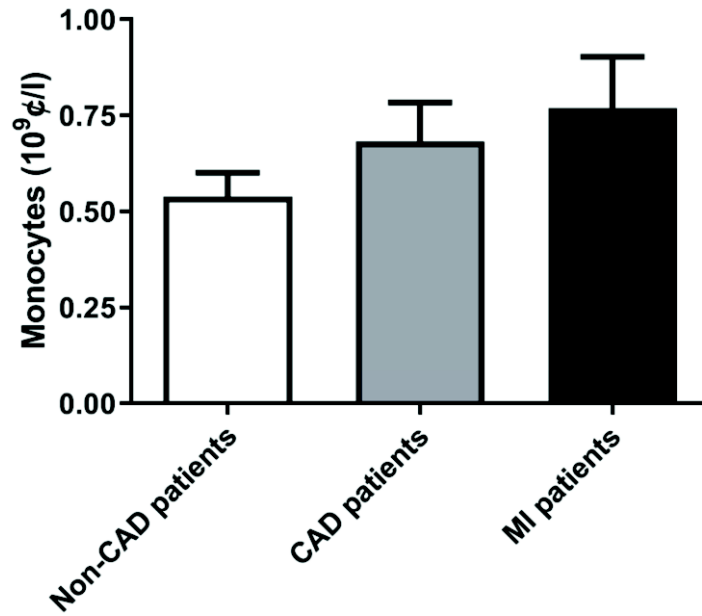
Gene	GSK_01.value	DMSO_01.value	log2foldchange	pvalue	padjust	significance	gene_name	gene_description	Status with UCSC	Status with bivalent gene list
ENSG00000126353	2,85927163	0,054940056	5,701642915	9.12308113713631e-13	9.38217664143098e-09	VRAI	CCR7	C-C motif chemokine receptor 7 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1608]	Repressed	1
ENSG00000176046	56,9073441	2,206668083	4,688673204	4.24742098627746e-09	9.70677276063941e-06	VRAI	NUPR1	nuclear protein 1, transcriptional regulator [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:29990]	ND	1
ENSG00000205927	0,574169062	0,025198642	4,510055707	1.34162838074087e-08	2.50860113955257e-05	VRAI	OLIG2	oligodendrocyte transcription factor 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9398]	Bivalent	1
ENSG00000204219	0,324285897	0,017295248	4,228814571	3.694776951973e-05	0.0108216797481427	VRAI	TCEA3	transcription elongation factor A3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11615]	Bivalent	2
ENSG00000181577	0,553578702	0,029842518	4,213346366	4.07586757108848e-12	2.0958111050537e-08	VRAI	C6orf223	chromosome 6 open reading frame 223 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:28692]	Bivalent	3
ENSG00000198910	5,759955017	0,337950252	4,091173945	2.79093614552651e-07	0.000239183227671622	VRAI	L1CAM	L1 cell adhesion molecule [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6470]	Repressed	2
ENSG00000259799	0,725125853	0,043076783	4,073244727	0.00024915489876059	0.0423522145265108	VRAI	RP11-554A11.9	-		
ENSG00000164929	1,555042466	0,10032532	3,954194952	6.04564007154712e-07	0.00041448908330527	VRAI	BAALC	BAALC, MAP3K1 and KLF4 binding [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:14333]	Bivalent	4
ENSG00000184156	0,054725429	0,003731279	3,874465879	0.000113630657485135	0.0236035812084835	VRAI	KCNQ3	potassium voltage-gated channel subfamily Q member 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6297]	Repressed	3
ENSG00000197993	3,715773086	0,260826405	3,825200011	7.33728957294729e-10	2.15590531337685e-06	VRAI	KEL	Kell metallo-endopeptidase (Kell blood group) [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6308]	Repressed	4
ENSG00000236056	1,338858914	0,094459371	3,825164162	6.45889185619035e-05	0.0158150580593004	VRAI	GAPDHP14	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase pseudogene 14 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4160]	ND	2
ENSG00000105855	0,471696106	0,034087414	3,790545694	1.59335770148363e-07	0.000172485164232186	VRAI	ITGB8	integrin subunit beta 8 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6163]	Bivalent	5
ENSG00000215533	3,664945376	0,283200325	3,693896118	1.93159473671606e-07	0.000198645202723879	VRAI	LINC00189	long intergenic non-protein coding RNA 189 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:18461]	Active	1
ENSG00000164047	2,582679628	0,20661437	3,643854843	5.07970849344746e-05	0.0137472953017405	VRAI	CAMP	cathelicidin antimicrobial peptide [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1472]	Active	2
ENSG00000154065	1,649225419	0,142621695	3,531522362	1.47914131749078e-05	0.0056338849292871	VRAI	ANKRD29	ankyrin repeat domain 29 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:27110]	Bivalent	6
ENSG00000217856	0,32068272	0,029692844	3,43295859	4.03882009108934e-07	0.00031572428984317	VRAI	LINC01215	long intergenic non-protein coding RNA 1215 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:49651]	Active	3
ENSG00000111863	2,889962135	0,271053252	3,414401942	2.05008916663329e-07	0.000200791590377683	VRAI	ADTRP	androgen dependent TFP1 regulating protein [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:21214]	Bivalent	7
ENSG00000165474	5,210847961	0,528514391	3,301503557	2.09900035135432e-08	3.59768660222131e-05	VRAI	GJB2	gap junction protein beta 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4284]	Bivalent	8
ENSG00000112818	0,426701675	0,04326632	3,299900573	0.000308441172538121	0.0477467055364127	VRAI	MEP1A	meprin A subunit alpha [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7015]	Repressed	5
ENSG00000168209	42,21929276	4,364087389	3,274151087	2.75619473210498e-07	0.000239183227671622	VRAI	DDIT4	DNA damage inducible transcript 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:24944]	Active	4
ENSG00000109654	3,218035532	0,341231322	3,23735813	1.16911151694265e-07	0.000160308571203177	VRAI	TRIM2	tripartite motif containing 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:15974]	Bivalent	9
ENSG00000105976	0,310311352	0,03318838	3,224965009	0.0003084717212869	0.0477467055364127	VRAI	MET	MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7029]	Bivalent	10
ENSG00000174945	24,39355198	2,646893136	3,204128471	9.5281091813113e-07	0.000613431917869977	VRAI	AMZ1	archaealysin family metallopeptidase 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:22231]	Bivalent	11
ENSG00000140379	118,8218268	12,90669607	3,202609282	2.45116785347656e-05	0.00800247943020729	VRAI	BCL2A1	BCL2 related protein A1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:991]	Active	5
ENSG00000183742	1,114143394	0,125829791	3,146389255	4.12970011943389e-06	0.00184651460992427	VRAI	MACC1	MET transcriptional regulator MACC1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:30215]	Active	6
ENSG00000101255	63,51063323	7,225020328	3,135925311	5.47204333311269e-07	0.000388099956122282	VRAI	TRIB3	tribbles pseudokinase 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:16228]	Active	7
ENSG00000128342	0,879345775	0,101268228	3,118248717	5.97511445731317e-08	8.77829672557266e-05	VRAI	LIF	LIF, interleukin 6 family cytokine [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6596]	Bivalent	12
ENSG00000226644	1,30433477	0,153927706	3,08298843	7.5840885038979e-05	0.017332170260908	VRAI	AL121899.1	uncharacterized LOC388780 [Source:NCBI gene;Acc:388780]	ND	3
ENSG00000122254	52,01445718	6,220964704	3,063702904	7.15636171134828e-11	2.45320079465019e-07	VRAI	HS3ST2	heparan sulfate-glucosamine 3-sulfotransferase 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5195]	Repressed	6
ENSG00000128965	4,738363645	0,586075317	3,015230988	1.1598883618594e-06	0.000662682884075669	VRAI	CHAC1	ChaC glutathione specific gamma-glutamylcyclotransferase 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:28680]	Bivalent	13
ENSG00000092621	52,70350797	6,615709665	2,993931877	1.50532778302163e-06	0.000774039546029724	VRAI	PHGDH	phosphoglycerate dehydrogenase [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:8923]	Bivalent	14
ENSG00000105697	19,44571839	2,70397261	2,846300746	6.84560206674026e-05	0.0163721329428737	VRAI	HAMP	hepcidin antimicrobial peptide [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:15598]	Repressed	7
ENSG00000235151	0,775030042	0,107830267	2,845489285	0.000124725499400448	0.0249063502103729	VRAI	AC114730.2			
ENSG00000128165	1,998500047	0,278413938	2,843614332	1.26001123630922e-05	0.00518318222168161	VRAI	ADM2	adrenomedullin 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:28898]	Bivalent	15
ENSG00000196517	1,833074683	0,257894645	2,82941755	3.26606446288119e-05	0.0100263304287373	VRAI	SLC6A9	solute carrier family 6 member 9 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11056]	ND	4
ENSG00000198719	4,73114711	0,715461932	2,725243436	4.17382227534765e-05	0.011759887199911	VRAI	DLG1	delta like canonical Notch ligand 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2908]	Bivalent	16
ENSG00000123685	6,030006588	0,928369154	2,699389433	0.000131318555908158	0.0259707697876827	VRAI	BATF3	basic leucine zipper ATF-like transcription factor 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:28915]	Bivalent	17
ENSG00000139211	2,575007668	0,398541502	2,691775217	0.000103296722166497	0.0219031647579435	VRAI	AMIGO2	adhesion molecule with Ig like domain 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:24073]	Bivalent	18
ENSG00000229781	0,450707437	0,070738835	2,671616559	8.08842581135908e-05	0.0181253256091582	VRAI	AC013444.1			
ENSG00000124731	2,88377296	0,461656636	2,64306555	2.09423927900901e-05	0.00730073110011141	VRAI	TREM1	triggering receptor expressed on myeloid cells 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17760]	Active	8
ENSG00000169429	436,2258899	74,63802218	2,547093763	1.04154809633068e-06	0.000613431971869977	VRAI	CXCL8	C-X-C motif chemokine ligand 8 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6025]	Active	9
ENSG00000159674	10,61503954	1,844628014	2,524708152	5.28926457401153e-08	8.36843028909763e-05	VRAI	SPON2	spondin 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11253]	Bivalent	19
ENSG00000088280	1,022937285	0,180927683	2,499232622	4.49631225573305e-05	0.0124973176318807	VRAI	ASAP3	ARF GAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:14987]	Bivalent	20
ENSG00000165996	3,362969518	0,597197695	2,493455362	2.35291101354468e-05	0.0078055925365463	VRAI	HACD1	3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9639]	Bivalent	21
ENSG00000274508	5,471758667	0,974138533	2,489805434	0.000251841993119577	0.0424580829056022	VRAI	MMP2-AS1	MMP2 antisense RNA 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:53142]	Repressed	8
ENSG00000260135	25,63287643	4,565652291	2,489102986	1.98343053119876e-05	0.00703365502856831	VRAI	COL4A2	collagen type IV alpha 2 chain [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2203]	Bivalent	22
ENSG00000134871	1,646391699	0,294234661	2,484268566	9.73917971010725e-05	0.0210858366607848	VRAI	LLCF1	LLLL And C/EBP-beta Motif Containing 1	Repressed	9
ENSG00000165131	0,83091879	0,150604031	2,463946864	0.000100325821615145	0.0124948072810049	VRAI	SERF1B	small EDRK-rich factor 1B [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10756]	Active	10
ENSG00000205572	1,68057598	0,311541252	2,43145345	0.000279212241169409	0.0459426990109793	VRAI	SERF1B	small EDRK-rich factor 1B [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10756]	Active	10

Supplementary table 3: list of up-regulated genes and related GO categories in selected circulating human monocytes treated with GSK-343 (part 2)

Gene	GSK_01.value	DMSO_01.value	log2foldchange	pvalue	padjust	significance	gene_name	gene_description	Status with UCSC	Status with bivalent gene list
ENSG00000203446	5,112816089	0,956072707	2,418926297	2.70952181128278e-05	0.00857376070991758	VRAI	SUGCT	Succinyl-CoA:Glutarate-CoA Transferase	Bivalent	23
ENSG00000121214	77,98473135	15,00518283	2,377732037	0.000308341288724131	0.0477467055364127	VRAI	CD22	CD22 molecule [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1643]	Bivalent	24
ENSG00000108688	2,374192726	0,457992832	2,374040184	2.24733182302185e-05	0.00770385348931891	VRAI	CCL7	C-C motif chemokine ligand 7 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10634]	Repressed	10
ENSG00000117594	0,986272396	0,190333269	2,373458364	5.57910394056452e-05	0.014801193893273	VRAI	HSD11B1	hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5208]	Bivalent	25
ENSG00000162433	2,797597763	0,551622142	2,342436593	1.49147452376126e-06	0.000774039546029724	VRAI	AK4	adenylate kinase 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:363]	Bivalent	26
ENSG00000224776	0,962048161	0,189699637	2,342392104	0.000156196167078396	0.0289427276078239	VRAI	RPSAP50	Ribosomal Protein SA Pseudogene 50	ND	5
ENSG00000225931	2,560516772	0,510323157	2,3269522	1.38825696310458e-05	0.00549109023406444	VRAI	TNFRSF14	TNF Receptor Superfamily Member 14	Active	12
ENSG00000057704	3,190918069	0,642274534	2,312710076	0.000153619674797867	0.0287240861022049	VRAI	TMCC3	transmembrane and coiled-coil domain family 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:29199]	Bivalent	27
ENSG00000123689	9,678248939	1,959645446	2,304153653	1.2935859213357e-07	0.000166290470187704	VRAI	G0S2	G0/G1 switch 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:30229]	Bivalent	28
ENSG00000099985	7,943421165	1,628349148	2,286350733	9.83323719178448e-07	0.000613431971869977	VRAI	OSM	oncostatin M [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:8506]	Bivalent	29
ENSG00000180316	0,338518649	0,069887721	2,276124322	3.45199064743821e-05	0.0102899338603636	VRAI	PNPLA1	patatin like phospholipase domain containing 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:21246]	Bivalent	30
ENSG00000166920	26,96056536	5,699736316	2,241884104	1.97782012066926e-06	0.000946041959114545	VRAI	C15orf48	chromosome 15 open reading frame 48 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:29898]	Bivalent	31
ENSG00000152952	0,304505847	0,066610654	2,192645034	6.25321591560179e-05	0.0158089192589962	VRAI	PLOD2	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9082]	Bivalent	32
ENSG00000117318	30,06348332	6,590342936	2,189587399	3.78821928173025e-05	0.0108216797481427	VRAI	ID3	inhibitor of DNA binding 3, HLH protein [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5362]	Bivalent	33
ENSG00000241095	0,331960878	0,074052811	2,164386721	0.000288252899495408	0.0466833514710359	VRAI	CYP51A1P1	cytochrome P450 family 51 subfamily A member 1 pseudogene 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:20245]	Active	13
ENSG00000162407	111,412323	24,92326695	2,160345014	0.000287179491796033	0.0466833514710359	VRAI	PLPP3	Phospholipid Phosphatase 3	Bivalent	34
ENSG00000170955	4,654675572	1,080768998	2,106622755	8.10739963070087e-05	0.0181253256091582	VRAI	CAVIN3	Caveolae Associated Protein 3	Bivalent	35
ENSG00000070669	23,94106812	5,770830214	2,052637473	0.000110194414393345	0.0231273338290033	VRAI	ASNS	asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing] [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:753]	Bivalent	36
ENSG00000172893	87,74829402	21,21074085	2,048577077	0.000182215864784435	0.0334626420257701	VRAI	DHCR7	7-dehydrocholesterol reductase [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2860]	Active	14
ENSG00000109084	23,39926663	5,75678343	2,02312915	5.61305486034274e-05	0.014801193893273	VRAI	TMEM97	transmembrane protein 97 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:28106]	Active	15
ENSG00000136010	6,391024032	1,574868468	2,020816482	0.000152076124803608	0.0286963461922992	VRAI	ALDH1L2	aldehyde dehydrogenase 1 family member L2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:26777]	Bivalent	37
ENSG00000147570	4,820500549	1,196443817	2,010430561	5.4085660585392e-07	0.000388099956122282	VRAI	DNAJC5B	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C5 beta [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:24138]	Bivalent	38
ENSG00000112715	44,16960694	11,08868755	1,993966221	5.71988337049309e-05	0.0148919697676332	VRAI	VEGFA	vascular endothelial growth factor A [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:12680]	Bivalent	39
ENSG00000249825	1,303759257	0,328042652	1,990722401	1.88924806913975e-05	0.00681720250632744	VRAI	THBS4	Thrombospondin 4	Bivalent	40
ENSG00000081041	80,15682596	20,56607149	1,962559958	9.0790503024511e-05	0.020079344797937	VRAI	CXCL2	C-X-C motif chemokine ligand 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4603]	Bivalent	41
ENSG00000052802	118,4548481	30,94453305	1,936581422	1.27933264013121e-06	0.000692642454349715	VRAI	MSMO1	methylsterol monooxygenase 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10545]	Active	16
ENSG00000276085	16,59274463	4,344733632	1,933213241	2.97506945296393e-07	0.000244764914034248	VRAI	CCL3L3	C-C motif chemokine ligand 3 like 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10628]	Active	17
ENSG00000113296	0,912985838	0,25882153	1,818635047	0.000260202249493659	0.0435108932324032	VRAI	THBS4	thrombospondin 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11788]	Bivalent	42
ENSG00000015568	1,363869339	0,395782247	1,784926886	2.61369240496046e-05	0.00839975396644167	VRAI	RGPDS	RANBP2-like and GRIP domain containing 5 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:32418]	Bivalent	43
ENSG00000120437	43,85759937	13,3934189	1,711303175	1.73791044229694e-05	0.006499153086757	VRAI	ACAT2	acetyl-CoA acetyltransferase 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:94]	Active	18
ENSG00000104549	141,9782152	44,10199261	1,686754776	0.000247026255508114	0.0423403001940907	VRAI	SQLE	squalene epoxidase [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11279]	Active	19
ENSG00000149809	22,43335455	7,453037631	1,589745402	6.3795230381986e-05	0.0158089192589962	VRAI	TM7SF2	transmembrane 7 superfamily member 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11863]	Bivalent	44
ENSG00000134824	211,8310589	71,76853866	1,561491386	2.84550662483078e-05	0.0088676337265447	VRAI	FADS2	fatty acid desaturase 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3575]	Bivalent	45
ENSG00000149485	357,7776289	124,2649887	1,525644205	0.000233416839023468	0.0410334832908947	VRAI	FADS1	fatty acid desaturase 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3574]	Active	20
ENSG00000122861	58,34962129	20,79719534	1,48833479	1.386993017506192e-05	0.00549109023406444	VRAI	PLAU	plasminogen activator, urokinase [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9052]	Bivalent	46
ENSG00000198814	75,18150764	29,10079498	1,369319939	0.000272992365231486	0.0452815078071065	VRAI	GK	glycerol kinase [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4289]	Bivalent	47

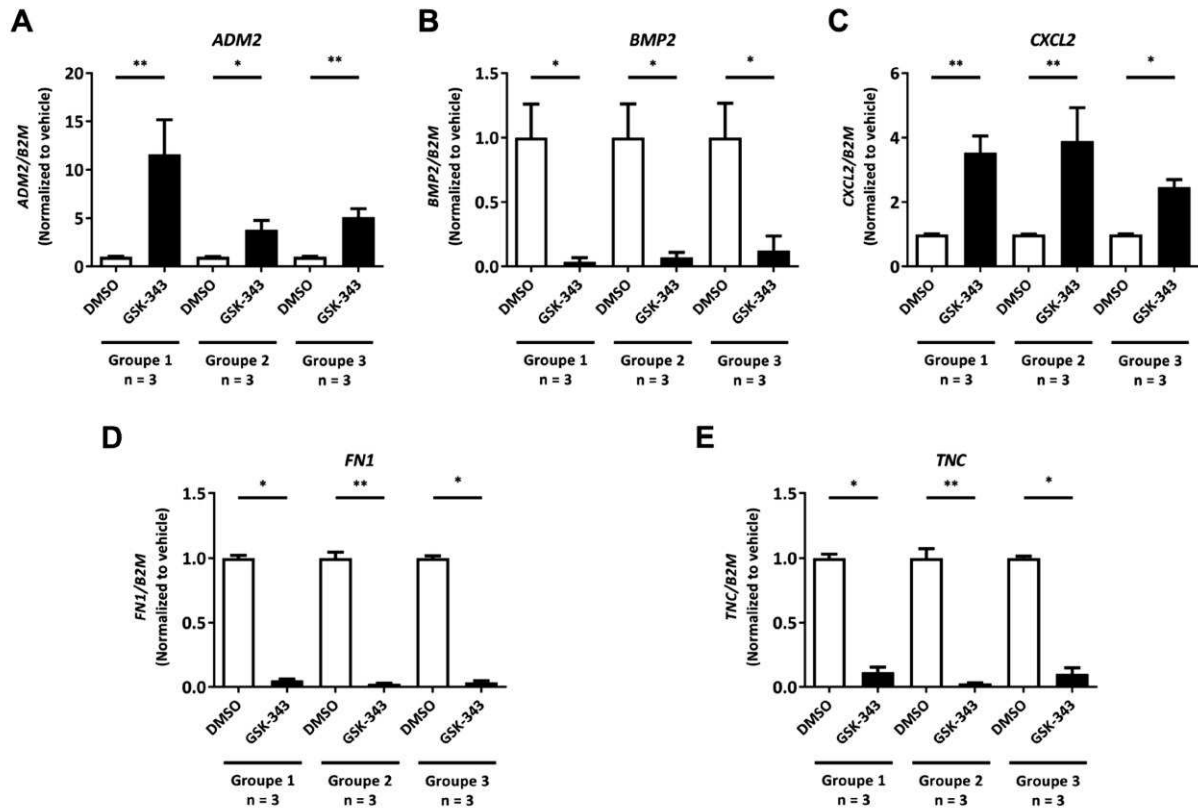
	Group 1	Group 2	Group 3	Overall
	Non-CAD	CAD	AMI	n = 48
	n = 20	n = 21	n = 7	
Age (year)	71±10	77±10	67±10	73±10
Gender (M/F)	10/10	16/5	5/2	21/17
Erythrocytes (10 ¹² ϕ/l)	4.46±0.50	4.50±0.54	5.31±0.61	4.59±0.61
Leucocytes (10 ⁹ ϕ/l)	6.68±1.82	7.75±1.79	13.22±6.26	8.10±3.54
Granulocyte Neutrophils (10 ⁹ ϕ/l)	4.22±1.56	5.29±1.52	10.08±6.03	5.55±3.26
Granulocyte Eosinophils (10 ⁹ ϕ/l)	0.19±0.15	0.20±0.13	0.07±0.06	0.18±0.14
Granulocyte Basophils (10 ⁸ ϕ/l)	0.45±0.24	0.51±0.31	0.46±0.39	0.47±0.29
Lymphocytes (10 ⁹ ϕ/l)	1.59±0.70	1.62±0.57	2.27±1.66	1.70±0.86
Monocytes (10 ⁹ ϕ/l)	0.63±0.18	0.69±0.25	0.76±0.30	0.68±0.23
Platelets (10 ⁹ ϕ/l)	234.9±58.9	227.4±51.2	279.0±94.1	238.1±63.0

Supplementary table 4: patient characteristics



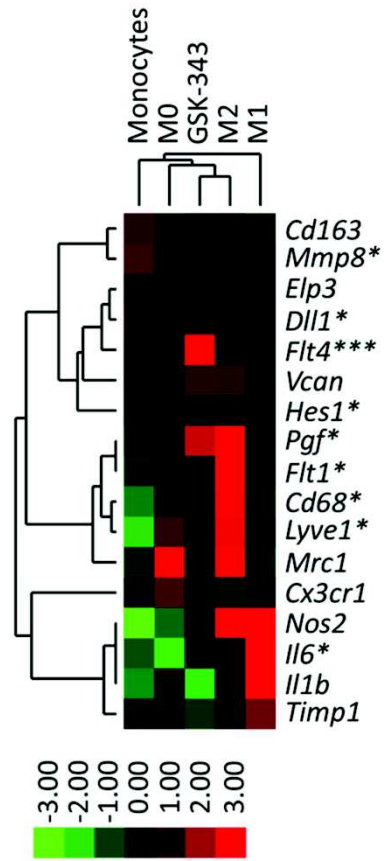
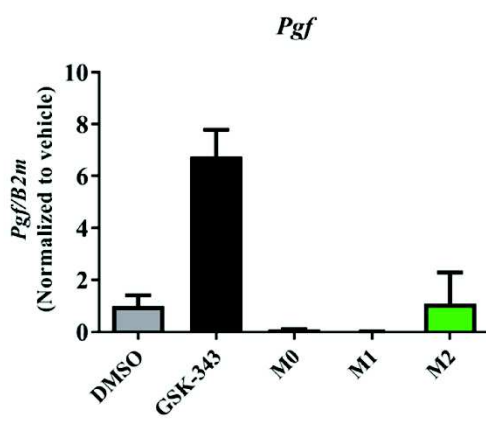
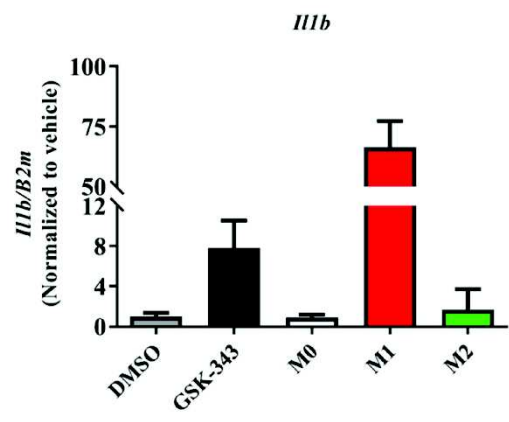
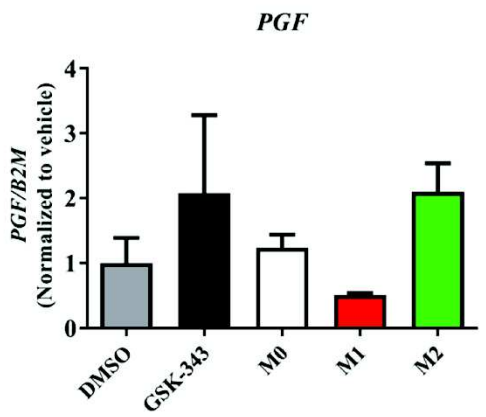
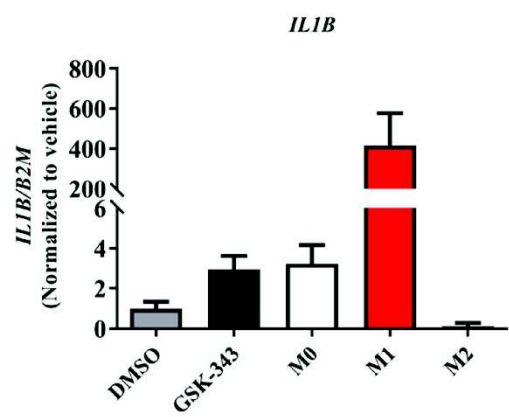
Supplementary figure S4: Levels of selected circulating monocytes in MI patients as compared to non-CAD and CAD patients

Blood-derived human monocyte quantification, obtained after negative magnetic selection. Data is represented as mean number of live selected monocytes obtained per ml of collected blood, Non-CAD (n=20), CAD (n=21) and MI (n=7) patients ± SEM.



Supplementary figure S5: Reduced and enhanced expression of genes identified by RNA-seq upon GSK-343 treatment

Expression of ADM2 (A), BMP2 (B), CXCL2 (C), FN1 (D) and TNC (E) in treated human monocytes from different patient groups with vehicle or GSK-343 was measured par RT-qPCR. Data are presented as mean expression to fold of vehicle treated monocytes \pm SEM. Group 1 Non-CAD (n=3), group 2 CAD (n=3) and group 3 AMI (n=3). The p values are depicted as asterisks in the figures as follows: **p < 0.01; *p < 0.05.

A**B****C****D****E**

Supplementary figure S6: EZH2 inhibition with GSK-343 brings monocytes closer to M2 than any other myeloid cell types

Gene expression in monocytes treated with vehicle or GSK-343 or following *in vitro* differentiation of monocytes into M0, M1 or M2 macrophages from TIB-204 monocyte mouse cell line (A) or mouse primary circulating selected monocytes (B and C) or human primary circulating selected monocytes (D and E) was measured by RT-qPCR. Data are presented as a targeted transcriptomic array of selected genes for each cell type categories derived from TIB-204 (A) or mean expression reported vehicle treated monocytes \pm SEM for mouse primary circulating selected monocytes (B and C) or human primary circulating selected monocytes (D and E). The p values are depicted as asterisks in the figures as follows: ***p <0.001; **p <0.01; *p <0.05; ns: non-significant.

	3 days post-MI			8 days post MI		
	Sham (n=4)	vehicle (n=7)	GSK-343 (n=5)	Sham (n=4)	vehicle (n=5)	GSK-343 (n=8)
Cardiomyocyte sizes (μm^2)	ND	450.86 \pm 28.9 ns	492.50 \pm 12.8 ns	398.5 \pm 19.5	546.80 \pm 43.80 *	441.87 \pm 23.6 #
Capillary density (Blood vessels/mm^2)	ND	1681.28 \pm 179.3 ***	1783.40 \pm 228.6 ns	2439.5 \pm 179.6	1521.0 \pm 189.0 ***	1774.25 \pm 199.85 ns
Open lymphatic vessel density (vessels/mm^2)	ND	7.17 \pm 2.09 ns	5.87 \pm 2.02 ns	5.47 \pm 1.25	10.34 \pm 2.33 p=0.07	6.68 \pm 1.97 ns
Total macrophages (cells/field)	ND	30.58 \pm 1.88 *	38.22 \pm 3.26 p=0.11	23.48 \pm 1.77	38.98 \pm 4.16 ***	39.76 \pm 5.05 ns

Supplementary table 5: Histologic cardiac parameters

Quantitative analysis of histologic cardiac parameters in border zone (BZ) of sham, vehicle and GSK-343 treated mice at 3- and 8-days post-MI. Data are presented as means \pm SEM. Asterisk (*) and hashtag (#) symbols indicates statistically significant difference compared to sham and vehicle condition respectively after Kruskal-Wallis test. # p <0.05, ns non-significant, * p <0.05*** p <0.001. ND indicates Not Determined values.

Gene function	Gene name	3 days post-MI			8 days post MI		
		sham	vehicle	GSK-343	sham	vehicle	GSK-343
Inflammation	<i>Ccl2</i>	1.00 ± 0.19	4.41 ± 0.47 ***	4.08 ± 0.37 ***	See figure 6b		
	<i>Ccl21</i>	1.00 ± 0.23	0.65 ± 0.04 ns	0.62 ± 0.07 ns	See figure 6b		
	<i>Il1b</i>	1.00 ± 0.19	1.66 ± 0.14 **	1.51 ± 0.10 ns	See figure 6b		
	<i>Il6</i>	1.00 ± 0.28	3.97 ± 0.32 ***	5.31 ± 0.58 ***	See figure 6b		
	<i>Il10</i>	1.00 ± 0.21	1.62 ± 0.14 *	1.67 ± 0.14 *	1.00 ± 0.13	1.09 ± 0.11 ns	0.97 ± 0.10 ns
	<i>Irf4</i>	1.00 ± 0.25	0.46 ± 0.03 ***	0.51 ± 0.04 ***	1.00 ± 0.10	0.58 ± 0.03 ***	0.66 ± 0.04 **
	<i>Tnf</i>	1.00 ± 0.27	1.50 ± 0.10 ns	1.47 ± 0.09 ns	1.00 ± 0.11	1.56 ± 0.12 *	1.52 ± 0.13 ns
Angiogenesis	<i>Dll1</i>	1.00 ± 0.30	0.59 ± 0.03 ns	0.61 ± 0.04 ns	See figure 6b		
	<i>Vegfa</i>	1.00 ± 0.23	0.65 ± 0.04 **	0.74 ± 0.06 ns	1.00 ± 0.08	0.69 ± 0.03 *	0.71 ± 0.05 *
Fibrosis	<i>Fn1</i>	1.00 ± 0.31	5.64 ± 0.65 ***	6.66 ± 0.81 ***	See figure 6b		
	<i>TnC</i>	1.00 ± 0.29	10.63 ± 1.91 ***	10.92 ± 2.15 ***	See figure 6b		
Cardiac dysfunction	<i>Mb</i>	1.00 ± 0.19	0.61 ± 0.03 ns	0.63 ± 0.05 ns	See figure 6b		
	<i>Nppa</i>	1.00 ± 0.29	2.04 ± 0.26 ns	2.01 ± 0.25 ns	1.00 ± 0.30	2.59 ± 0.38 **	2.19 ± 0.29 ns
	<i>Nppb</i>	1.00 ± 0.18	1.77 ± 0.19 ns	2.18 ± 0.27 *	See figure 6b		
	<i>Tnni3</i>	1.00 ± 0.20	0.61 ± 0.03 ***	0.63 ± 0.06 **	See figure 6b		
	<i>Tnnt2</i>	1.00 ± 0.28	0.96 ± 0.06 ns	1.07 ± 0.17 ns	1.00 ± 0.10	0.66 ± 0.03 ns	0.77 ± 0.06 ns

Supplementary table 6: Inflammation, angiogenesis, fibrosis and cardiac dysfunction gene expression

Cardiac transcript levels of indicated genes measured by RT-qPCR from sham (n=8), or vehicle (n=16) or GSK-343-treated (n=18) mice at 3 and 8 days after MI. Values expressed as mean percentages of sham \pm SEM with B2m serving as internal control. Asterisk (*) symbols indicates statistically significant difference compared to sham condition. ns non-significant, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

	3 days post-MI			7 days post MI		
	sham	vehicle	GSK-343	sham	vehicle	GSK-343
LV dilatation index	0.190 ± 0.01	0.166 ± 0.06 ns	0.180 ± 0.04 ns	See figure 6e		
LVED (mm)	3.75 ± 0.09	4.27 ± 0.10 *	4.21 ± 0.09 ns	See figure 6f		
LVES (mm)	2.94 ± 0.10	3.66 ± 0.12 **	3.49 ± 0.11 ns	See figure 6g		
LVFS (%)	21.49 ± 1.73	14.50 ± 1.43 *	15.94 ± 1.43 ns	See figure 6h		
LVEF (%)	44.09 ± 3.10	30.19 ± 2.76 *	33.39 ± 2.70 ns	See figure 6i		
Cardiac output (ml/min)	9.45 ± 1.32	9.98 ± 0.94 ns	10.59 ± 0.90 ns	13.33 ± 1.05	11.07 ± 1.31 ns	12.04 ± 1.29 ns
Heart rate (bpm)	378.7 ± 18.57	394.8 ± 11.66 ns	406.0 ± 7.41 ns	410.4 ± 12.34	425.2 ± 14.22 ns	429.6 ± 13.24 ns
LV mass (mg)	72.21 ± 1.61	85.32 ± 5.51 ns	94.65 ± 2.88 ns	74.98 ± 6.51	108.10 ± 5.34 *	100.80 ± 7.38 ns
Stroke volume (µl)	26.54 ± 2.47	24.82 ± 2.36 ns	26.07 ± 2.05 ns	32.18 ± 1.97	26.92 ± 3.18 ns	27.91 ± 2.54 ns

Supplementary table 7: Echocardiographic cardiac dysfunction parameters

Quantitative analysis of echocardiographic cardiac parameters in sham (n=8), vehicle (n=14) and GSK-343 (n=18) treated mice at 3- and 7-days post-MI. Data are presented as means ± SEM. Asterisk (*) symbols indicates statistically significant difference compared to sham condition. ns non-significant, * p <0.05, *** p <0.001.

Articles de collaboration

Ces deux articles correspondent à des projets de mon laboratoire d'accueil sur lesquels j'ai été impliquée techniquement au cours de ma thèse.

- Houssari M, Dumesnil A, Tardif V, Kivela R, Pizzinat N, Boukhalifa I, Godefroy D, Schapman D, Hemanthakumar KA, Bizou M, Henry JP, Renet S, Riou G, **Rondeaux J**, Anouar Y, Adriouch S, Fraineau S, Alitalo K, Richard V, Mulder P, Brakenhielm E. Lymphatic and immune cell cross-talk regulates cardiac recovery after experimental myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2020** May. DOI: 10.1161/atvbaha.120.314370.
- Kramer JS, Woltersdorf S, Duflot T, Hiesinger K, Lillich FF, Knöll F, Wittmann SK, Klingler FM, Brunst S, Chaikuad A, Morisseau C, Hammock BD, Buccellati C, Sala A, Rovati GE, Leuillier M, Fraineau S, **Rondeaux J**, Hernandez-Olmos V, Heering J, Merk D, Pogoryelov D, Steinhilber D, Knapp S, Bellien J, Proschak E. Discovery of the First in Vivo Active Inhibitors of the Soluble Epoxide Hydrolase Phosphatase Domain. *J Med Chem.* **2019** Sep 26;62(18):8443-8460. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b00445.

Article de collaboration n°1

Houssari M, Dumesnil A, Tardif V, Kivela R, Pizzinat N, Boukhalfa I, Godefroy D, Schapman D, Hemanthakumar KA, Bizou M, Henry JP, Renet S, Riou G, **Rondeaux J**, Anouar Y, Adriouch S, Fraineau S, Alitalo K, Richard V, Mulder P, Brakenhielm E. Lymphatic and immune cell cross-talk regulates cardiac recovery after experimental myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2020** May. DOI: 10.1161/atvbaha.120.314370.

Ce premier article s'intéresse aux vaisseaux lymphatiques, qui jouent un rôle physiopathologique essentiel en favorisant l'élimination des liquides et des tissus des cellules immunitaires. Inversement, les cellules immunitaires peuvent influencer la fonction et le remodelage lymphatique. La lymphangiogenèse cardiaque a été proposée comme cible thérapeutique pour prévenir l'insuffisance cardiaque après un infarctus du myocarde. Les auteurs de cet article ont étudié les effets de la thérapie génique pour moduler la lymphangiogenèse cardiaque après un infarctus du myocarde chez les rongeurs. Ensuite, ils ont déterminé l'impact des cellules T infiltrant le cœur sur le remodelage lymphatique.

La comparaison des traitements de thérapie génique par adénovirus ou AAV (Adeno-Associated Viral) chez des souris, permet de constater que seule la thérapie VEGF-CC_{156S} (facteur de croissance endothélial vasculaire), obtenue par des AAV, augmentait la lymphangiogenèse cardiaque et entraînait une réduction de l'inflammation et du dysfonctionnement cardiaque trois semaines après l'infarctus. À l'inverse, l'inhibition de la signalisation VEGF-C/-D, par administration de l'AAV du VEGFR3 soluble (récepteur 3 du facteur de croissance endothélial vasculaire), limite la lymphangiogenèse dans la zone d'infarctus. De manière inattendue, ce traitement a amélioré la fonction cardiaque après l'infarctus du myocarde chez les souris et les rats. Finalement, l'utilisation de stratégies pharmacologiques, génétique et médiées par anticorps, permettant de limiter le recrutement des cellules T cardiaques chez la souris, ont permis de découvrir que les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ sont capables de supprimer, en partie par la production d'IFN- γ , la lymphangiogenèse cardiaque post-IDM.

En conclusion, ces travaux montrent que la résolution de l'inflammation cardiaque après un infarctus du myocarde peut être accélérée par une lymphangiogenèse

Résultats

thérapeutique basée sur l'administration de l'AAV du VEGF-C_{C156S}. Inversement, il a été mis en évidence un rôle négatif majeur des cellules T recrutées dans le cœur sur le remodelage lymphatique. Ces résultats donnent un nouvel aperçu de l'interconnexion entre les cellules immunitaires et les lymphatiques dans l'orchestration de la réparation cardiaque après une blessure.

Mon implication dans ces travaux correspond à la mise au point, la réalisation et l'analyse des données de cytométrie en flux.



Lymphatic and Immune Cell Cross-Talk Regulates Cardiac Recovery After Experimental Myocardial Infarction

Mahmoud Houssari, Anais Dumesnil, Virginie Tardif, Riikka Kivelä, Nathalie Pizzinat, Ines Boukhalfa, David Godefroy, Damien Schapman, Karthik A. Hemanthakumar, Mathilde Bizou, Jean-Paul Henry, Sylvanie Renet, Gaetan Riou, Julie Rondeaux, Youssef Anouar, Sahil Adriouch, Sylvain Fraineau, Kari Alitalo, Vincent Richard, Paul Mulder, Ebba Brakenhielm

OBJECTIVE: Lymphatics play an essential pathophysiological role in promoting fluid and immune cell tissue clearance. Conversely, immune cells may influence lymphatic function and remodeling. Recently, cardiac lymphangiogenesis has been proposed as a therapeutic target to prevent heart failure after myocardial infarction (MI). We investigated the effects of gene therapy to modulate cardiac lymphangiogenesis post-MI in rodents. Second, we determined the impact of cardiac-infiltrating T cells on lymphatic remodeling in the heart.

APPROACH AND RESULTS: Comparing adenoviral versus adeno-associated viral gene delivery in mice, we found that only sustained VEGF (vascular endothelial growth factor)-C_{C156S} therapy, achieved by adeno-associated viral vectors, increased cardiac lymphangiogenesis, and led to reduced cardiac inflammation and dysfunction by 3 weeks post-MI. Conversely, inhibition of VEGF-C/-D signaling, through adeno-associated viral delivery of soluble VEGFR3 (vascular endothelial growth factor receptor 3), limited infarct lymphangiogenesis. Unexpectedly, this treatment improved cardiac function post-MI in both mice and rats, linked to reduced infarct thinning due to acute suppression of T-cell infiltration. Finally, using pharmacological, genetic, and antibody-mediated prevention of cardiac T-cell recruitment in mice, we discovered that both CD4⁺ and CD8⁺ T cells potently suppress, in part through interferon- γ , cardiac lymphangiogenesis post-MI.

CONCLUSIONS: We show that resolution of cardiac inflammation after MI may be accelerated by therapeutic lymphangiogenesis based on adeno-associated viral gene delivery of VEGF-C_{C156S}. Conversely, our work uncovers a major negative role of cardiac-recruited T cells on lymphatic remodeling. Our results give new insight into the interconnection between immune cells and lymphatics in orchestration of cardiac repair after injury.

VISUAL OVERVIEW: An online [visual overview](#) is available for this article.

Key Words: heart failure ■ inflammation ■ interferon ■ lymphangiogenesis ■ macrophages

The lymphatic vasculature is essential for maintenance of interstitial fluid homeostasis and for fine-tuning of immune responses by regulating immune cell, cytokine, and antigen tissue clearance.^{1,2} Additionally, lymphatics ensure the uptake of dietary lipids in chylomicrons as well as reverse cholesterol transport from tissues to the liver.³ Edema or increases in osmotic pressure lead to stimulation of

See accompanying editorial on page 1611
See cover image

lymphatic remodeling (lymphangiogenesis), in part via macrophage-driven VEGF (vascular endothelial growth factor)-C production,⁴ which acts to restore tissue fluid balance. In

Correspondence to: Ebba Brakenhielm, PhD, Inserm UMR1096, Normandy University, UniRouen, Faculty of Pharmacy and Medicine, 22 Blvd Gambetta, 76183 Rouen, France. Email ebba.brakenhielm@inserm.fr

The Data Supplement is available with this article at <https://www.ahajournals.org/doi/suppl/10.1161/ATVBAHA.120.314370>.

For Sources of Funding and Disclosures, see page 1736.

© 2020 The Authors. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* is published on behalf of the American Heart Association, Inc., by Wolters Kluwer Health, Inc. This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs](#) License, which permits use, distribution, and reproduction in any medium, provided that the original work is properly cited, the use is noncommercial, and no modifications or adaptations are made.

Arterioscler Thromb Vasc Biol is available at www.ahajournals.org/journal/atvb

Nonstandard Abbreviations and Acronyms

AAV	adeno-associated virus
DCs	dendritic cells
IFN	interferon
IL	interleukin
INF	interferon
LV	left ventricle
MI	myocardial infarction
Pdpn	podoplanin
S1P	sphingosine-1-phosphate
sVEGFR3	soluble VEGF receptor 3
VEGF	vascular endothelial growth factor

contrast, the interplay between lymphatic vessels and the immune system is more complex: although lymphatic function is reduced by many proinflammatory mediators,^{5,6} different immune cell populations impact lymphatic remodeling exerting either stimulatory or inhibitory effects on lymphatic endothelial cell growth and survival.^{7,8} Conversely, tissue clearance of immune cells depends on active lymphatic expression of chemokines to selectively recruit and drain different immune cell populations.^{9,10} Promisingly, whereas therapeutic lymphangiogenesis has been shown to resolve chronic inflammation, including innate immune responses in many organs,^{11,12} treatment with lymphangiogenic inhibitors limits adaptive immune responses and reduces graft rejection following organ transplantation.^{13,14}

The cardiac immune response to ischemic injury is characterized by sequential waves of infiltrating immune cells, including not only neutrophils, monocytes/macrophages, and dendritic cells (DCs) but also B and T lymphocytes. Together these cells orchestrate the removal of dead cardiomyocytes, participate in granulation tissue formation required for stabilization and maturation of the scar, and regulate the subsequent cardiac repair and inflammation-resolution phase by secreting proangiogenic, pro-survival, and anti-inflammatory mediators.^{15,16} However, this immune cell infiltration represents a double-edged sword in that chronic inflammation in the heart, brought on by inefficient resolution of the inflammatory response, aggravates cardiac dysfunction by inducing coronary endothelial dysfunction and deleterious cardiac remodeling, including cardiomyocyte hypertrophy and interstitial fibrosis, leading to development of chronic heart failure.¹⁷ Improved resolution of cardiac inflammation thus represents a therapeutic goal in many cardiovascular diseases.

The adult heart is invested with a lymphatic network dense over the ventricles and sparser over the atria.¹⁸ Different from other lymphatic beds, the cardiac precollector lymphatics are essentially devoid of smooth muscle cells, as surrounding cardiomyocytes ensure lymphatic propulsion towards cardiac lymph nodes (Figure 1 and Movie 1

Highlights

- Therapeutic lymphangiogenesis in the heart requires prolonged VEGF (vascular endothelial growth factor)-C expression as achieved by adeno-associated virus but not adenoviral gene therapy or systemic protein therapy.
- Therapeutic lymphangiogenesis accelerates resolution of cardiac inflammation post-MI, with reduction of both T-cell and proinflammatory macrophage levels in the viable left ventricle, resulting in improved cardiac function.
- Treatment with a VEGF-C/VEGF-D trap (soluble VEGFR3) acutely limits T-cell recruitment to the infarct, leading to delayed scar remodeling and reduced cardiac dysfunction postmyocardial infarction.
- Cardiac-infiltrating T cells, both CD4⁺ and CD8⁺ subpopulations, exert deleterious effects on cardiac lymphatics postmyocardial infarction, in part through interferon- γ .

in the [Data Supplement](#)). Cardiac lymphatic remodeling occurs in many cardiovascular diseases characterized by edema and inflammation,¹⁹ including in patients with ischemic heart disease or terminal heart failure.^{20,21} Indeed, myocardial infarction (MI) leads to lymphatic remodeling in both infarct and viable infarct border zone in humans, pigs, rats, and mice.^{21–26} We previously showed that stimulation of cardiac lymphangiogenesis post-MI in rats, using targeted intramyocardial delivery of VEGFR3 (vascular endothelial growth factor receptor 3)-selective recombinant rat VEGF-C_{C152S} protein, accelerated resorption of chronic myocardial edema and inflammation, reduced deleterious cardiac remodeling, and improved cardiac function.²⁶ Here, we investigated the impact of gene therapy to modulate cardiac lymphangiogenesis post-MI in rodents. Second, we assessed the role of cardiac-infiltrating T lymphocytes in lymphatic remodeling post-MI with the aim to unravel the interplay between the immune system and the lymphatic vasculature during cardiac repair.

MATERIALS AND METHODS

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Experimental Models and Therapeutic Agents

We investigated cardiac lymphatic remodeling in 20 to 22 g wild-type C57Bl/6J mice (Janvier Laboratories, France), in 20 to 22 g C57Bl/6 mice deficient for MHC (major histocompatibility complex) II (MHCII^{Δ/Δ} as a result of disruption of the *IAb* gene) kindly provided by Dr J.P. van Meerwijk,²⁷ and in 200 to 220 g Wistar rats (RccHan:WIST from Harlan/Envigo) following MI induced by permanent coronary artery ligation.^{28,29} Only female mice were used in our studies due to their superior

survival rates post-MI, and only male rats were used as female rats display more rapid left ventricular (LV) dilation.³⁰ Modulation of cardiac lymphangiogenesis was performed using either systemic growth factor therapy with recombinant human VEGF-C_{C156S} protein (RnD system) as described,²⁵ or using viral gene vectors encoding hVEGF-C_{C156S} (human VEGF-C_{C156S}) or sVEGFR3 (soluble VEGFR3)-IgG construct.^{29,31,32} Briefly, protein therapy consisted of repeated (day 0, 2, 3, 4, and 6 post-MI) intraperitoneal injections of 2 µg/mouse (0.1 µg/g) of rhVEGF-C_{C156S} (recombinant human VEGF-C mutant selective for VEGFR3) or physiological saline in controls,²⁵ adenoviral therapy consisted of a single intraperitoneal injection on day 0 of adenoviral-5 vector (5×10⁸ viral particles) encoding hVEGF-C_{C156S} or lacZ as a control, and adeno-associated viral (AAV) gene delivery consisted of a single intraperitoneal injection 7 days before MI of AAV-9 vector (1×10¹¹ viral particles) encoding hVEGF-C_{C156S}, sVEGFR3, or scrambled sequence as a control.³³

Cardiac Functional, Histological, and Cellular Analyses

LV function was evaluated by echocardiography,²⁸ and cardiac hypertrophy-to-LV dilatation index was calculated as the ratio of diastolic LV wall thickness to LV diastolic diameter. Cardiac sections were analyzed by histology and immunohistochemistry to determine infarct size, lymphatic and blood vessel densities and sizes, and immune cell infiltration levels (macrophages and T cells) as determined using Fiji.³⁴ Cardiac whole mount-staining was performed²⁶ followed by a modified iDISCO+ clearing protocol³⁵ for imaging by lightsheet (ultramicroscope II, LaVision BioTec) and confocal laser scanning (Leica SP8, ×25) microscopy. For details see [Data Supplement](#).

Flow-Cytometry

Cells isolated from blood and hearts of mice were analyzed by flow cytometry.^{36,37} For details, see [Data Supplement](#). Results are expressed as % of parent population or as cells per mL blood or per mg cardiac tissue. Flow cytometric analyses were performed on an LSRFortessa (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo software (TreeStar, Inc, San Carlos, CA).

Prevention of T-Cell Recruitment

Fingolimod (1 mg/kg, FTY-720, Sigma-Aldrich) intraperitoneal pharmacological treatment was initiated immediately after MI in mice with repeated injections on days 1 and 2 post-MI to prevent cardiac T-cell recruitment acutely post-MI. MI controls received physiological saline. Cardiac functional and cellular analyses were performed as described above. For depletion of specific T-cell populations or cytokines, InVivoMab antibodies were administered by repeated intraperitoneal injections on day 0 and 3 post-MI in mice according to the manufacturer's instructions (BIOXCELL, NH). For details, see [Data Supplement](#).

Study Approval

Animal experiments performed in this study were approved by the regional ethics review board in line with E.U, French and Finnish

legislation (01181.01 / APAFIS [French Animal Experiment Ethical Commission] No. 8157-2016121311094625-v5 Normandy; B315557, Toulouse ENVT [École Nationale Vétérinaire de Toulouse]; ESAVI/6718/04.10.03/2012, Helsinki). A total of 250 C57Bl/6J female mice, 20 MHCII^{ΔA} and matched wild-type C57Bl/6 female mice, and 33 male Wistar rats surviving coronary ligation or sham-operation were included in this study.

Statistics

Data are presented as mean±SEM. Comparisons were performed to determine (1) impact of pathology (healthy versus MI controls); (2) effect of treatment (treated versus MI controls). Statistical analyses for comparisons of 2 independent groups were performed using either Student 2-tailed *t* test for groups with normal distribution or alternatively by Mann Whitney *U* test for samples where normality could not be ascertained based on D'Agostino and Pearson omnibus normality test. For comparisons of ≥3 groups, either 1-way ANOVA followed by Bonferroni posthoc (for parameters with n>7 with normal distribution) or alternatively Kruskal-Wallis nonparametric analysis followed by Dunn posthoc multiple comparison (for parameters with n<8, or with n>7 but with nongaussian distribution) were performed. Finally, longitudinal echocardiography studies in rats were analyzed by paired 2-way ANOVA followed by Bonferroni posthoc. Outlier samples were identified as an individual value exceeding group mean±4SD in groups with n≥7. All analyses were performed using GraphPad Prism software.

RESULTS

Sustained VEGF-C Delivery Is Required for Therapeutic Lymphangiogenesis

We previously showed that cardiac lymphatic remodeling after MI in rats included expansion of lymphatic capillaries accompanied by precollector slimming and rarefaction of open lymphatic vessels, used as a proxy of cardiac precollectors, both in the infarct and in the viable LV wall, leading to poor lymphatic transport capacity during the first months post-MI.²⁶ To stimulate cardiac lymphangiogenesis post-MI previous studies have used protein therapy with VEGFR3-selective VEGF-C, either by intramyocardial injection, coupled to biopolymers for spatio-temporally controlled growth factor release, in rats,²⁶ or by intraperitoneal repeated injections of VEGF-C_{C156S} protein in mice.^{25,38}

We set out to compare the efficacy of systemic intraperitoneal protein therapy versus gene therapy with either adenoviral or AAV vectors to deliver VEGFR3-selective human VEGF-C_{C156S}^{31,32} with the aim to stimulate cardiac lymphangiogenesis following MI induced by permanent coronary artery ligation in mice. Importantly, we confirmed that VEGFR3 expression was essentially restricted to lymphatic vessels, and not blood vessels, both in healthy and post-MI mouse hearts (Figure IIA in the [Data Supplement](#)). Control MI mice were injected with saline, adenoviral-lacZ,

or noncoding scrambled sequence AAV control vectors, respectively. First, we found that intraperitoneal delivery of recombinant human VEGF- C_{156S} protein failed to increase circulating VEGF-C levels in mice (Figure IIIA in the [Data Supplement](#)) and did not increase cardiac lymphangiogenesis (Figure IIIB through IIID in the [Data Supplement](#)). Second, we found that adenoviral gene delivery led to a potent, but transient, increase in VEGF-C plasma levels (Figure IVA in the [Data Supplement](#)), in line with the expected anti-adenoviral immune response that rapidly eliminates transduced cells. Such transient elevation of circulating VEGF-C levels was not sufficient to stimulate lymphatic expansion. Indeed, cardiac lymphatic proliferation and densities were not increased in adenoviral-VEGF- C_{156S} -treated mice, as compared to adenoviral-lacZ MI controls (Figure IVB and IVC in the [Data Supplement](#)). In contrast, AAV-VEGF- C_{156S} gene therapy induced a potent and sustained increase in plasma levels (Figure IVA in the [Data Supplement](#)), as well as elevated and prolonged cardiac expression of hVEGF- C_{156S} (Figure 1A, Figure IVD in the [Data Supplement](#)). This resulted in a 3-fold increase in lymphatic endothelial proliferation rates and lymphatic densities already by 7 days post-MI, as compared to AAV-scrambled sequence MI controls (Figure IVB, IVC, and IVE in the [Data Supplement](#)). Surprisingly, despite persistently elevated circulating and cardiac hVEGF-C levels in the AAV-VEGF- C_{156S} group, cardiac lymphatic proliferation (Figure 1B), but not density (Figure 1C), in the viable LV returned to baseline by 21 days post-MI, indicating that factors other than VEGF-C bioavailability contribute to cardiac lymphatic expansion. For our subsequent studies, we thus focused on the AAV gene delivery approach to determine the functional impact of cardiac lymphangiogenesis post-MI.

AAV-VEGF- C_{156S} Gene Delivery Prevents Cardiac Lymphatic Rarefaction Post-MI in Mice

In AAV-MI control mice, following initial destruction of lymphatics in the infarct zone (Figure 1E, Figure 2B) and rarefaction of lymphatic vessels in the viable LV bordering the infarct (Figure 1C through E), the subsequent endogenous lymphangiogenic response appeared weaker than in rats. Indeed, VEGF-C expression was not increased in the viable LV at either 7 days (Figure IVD in the [Data Supplement](#)) or 21 days post-MI (Figure 1A). In contrast, in the infarct, VEGF-C-expressing macrophages were observed at 7 days (Figure IVD in the [Data Supplement](#)). Accordingly, lymphatic proliferation only tended to increase in the infarct (Figure 2A) and not in the viable LV (Figure 1B). Similar as in rats, there was severe rarefaction and slimming of open lymphatics in the viable LV (Figure 1D, Figure VA through VD in the [Data Supplement](#)) and in the infarct (Figure 2B), and loss of button-like junctions in lymphatic capillaries, together suggestive of lymphatic transport dysfunction (Figure VE in the [Data Supplement](#)).

As mentioned above, AAV-VEGF- C_{156S} gene delivery substantially increased lymphangiogenesis in viable LV (Figure 1B through 1D), but it did not increase infarct lymphangiogenesis as compared with AAV-MI controls (Figure 2A through 2D). Cardiac whole-mount staining further revealed an expanded lymphatic network in the viable LV bordering the infarct in AAV-VEGF- C_{156S} -treated mice at 21 days post-MI, including regeneration of straight, valved precollector segments reaching towards the base of the aorta (Figure 1E). In agreement with potent stimulation of cardiac lymphatic growth in viable LV of AAV-VEGF- C_{156S} -treated mice, cardiac expression analyses revealed increased levels of lymphatic-selective markers *Lyve1* (lymphatic vessel endothelial receptor 1), *Flt4* (*Vegfr3*), and podoplanin (*Pdpr*) at 21 days post-MI as compared to AAV-MI controls (Figure 1F). Together, these findings indicated that persistent therapeutic stimulation of VEGFR3 signaling in the heart sufficed to accelerate lymphatic capillary expansion but also to limit MI-induced loss of open lymphatic vessels in the viable LV, similar to our previous findings with cardiac-targeted lymphangiogenic protein therapy in rats.²⁶ Furthermore, we found that the stimulation of lymphangiogenesis was restricted to the heart following AAV-9 VEGF- C_{156S} gene therapy because although transgene expression also occurred in the liver, it was not sufficient to stimulate liver lymphangiogenesis in the absence of other triggers such as inflammation or edema (data not shown). Finally, AAV-VEGF- C_{156S} gene therapy did not influence infarct scar size, heart-to-body weight ratio, cardiomyocyte hypertrophy, or cardiac angiogenesis and arteriolar remodeling as compared to AAV-MI controls (Figure VIA through VIJ in the [Data Supplement](#)).

Therapeutic Lymphangiogenesis Limits Cardiac Inflammation and Dysfunction Post-MI in Mice

We next set out to investigate the functional impact of therapeutic lymphangiogenesis on cardiac inflammation in the acute (7 days) and chronic (21 days) phases of repair and recovery after MI. We hypothesized that expansion of cardiac lymphatics, as induced by AAV-VEGF- C_{156S} therapy, would accelerate resolution of inflammation by expediting cardiac efflux of proinflammatory immune cells.

First, we analyzed the kinetics and profile of cardiac inflammation in the viable LV bordering the infarct in saline-injected MI control mice using immunohistochemistry and flow cytometry. We found that cardiac CD68⁺ macrophage density increased rapidly during the first-week post-MI (Figure VIIA and VIID in the [Data Supplement](#)). These macrophages were initially mostly of classical M1 type (negative for CD206, and positive for CCR2 [chemokine receptor 2]; Figure VIIB, VIIE, VIIG in the [Data Supplement](#)). Furthermore, CD3⁺ total T-cell densities peaked already by day 3 in the viable LV, with persistent elevation of CD8⁺ T cells observed at

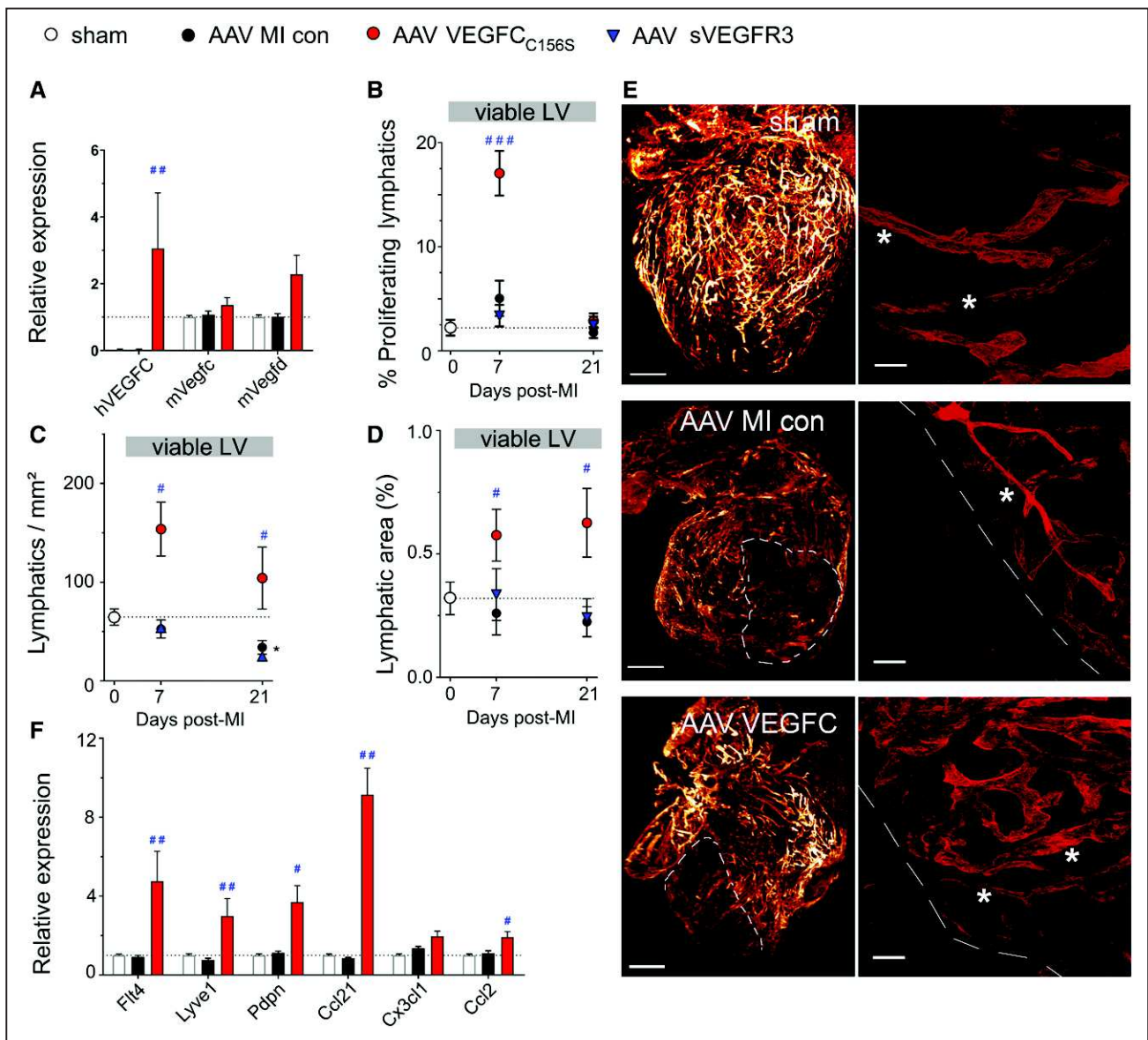


Figure 1. Adeno-associated viral (AAV)-VEGF (vascular endothelial growth factor)-CC156S therapy stimulates cardiac lymphangiogenesis postmyocardial infarction (MI).

Mice were treated with AAV-hVEGF (human VEGF)-C_{156S} gene therapy (red circles, n=8), sVEGFR3 (vascular endothelial growth factor receptor 3; AAV-sVEGFR3, blue triangles, n=5-7), or AAV-scrambled virus (MI controls, black circles, n=8), and sham-operated mice (white circles, n=7-9) served as healthy controls. Cardiac gene expression of lymphangiogenic factors at 21 days post-MI (A). Lymphangiogenesis in the viable left ventricular (LV) wall bordering the infarct was evaluated as % proliferating lymphatic vessels (B), lymphatic densities (C), and lymphatic area at 7 or 21 days post-MI (D). Examples of light sheet imaging (E, left) of Lyve1⁺ (lymphatic vessel endothelial receptor 1) cardiac lymphatics in healthy mice, in AAV-MI controls, and VEGFC-treated (AAV-VEGF-C_{156S}) mice at 21 d post-MI. Infarct outlined by white dashed lines. Scale bar=1 mm; ×0.8. Confocal imaging (E, right) of viable LV areas in the same samples. Cardiac precollectors indicated by white asterisk. Scale bar=50 μm; ×25. Relative cardiac expression of lymphatic-related genes in sham (n=8), MI controls (AAV-scrambled virus, n=8), and VEGFC-treated (AAV-hVEGF-C_{156S}, n=5) at 21 days post-MI (F). Kruskal-Wallis followed by Dunn posthoc test. *P<0.05 vs sham; #P<0.05; ##P<0.01; ###P<0.001 vs AAV-MI controls. con indicates control.

7 days post-MI (Figure VIIC, VIIF, VIIH, VIII in the [Data Supplement](#)).

Second, we investigated cardiac immune cell population dynamics in both the acute and chronic phases post-MI in our AAV-treated groups. In AAV-MI control mice, similar as in saline-treated MI mice, the cardiac levels of proinflammatory immune cells, including M1 macrophages and CD3⁺ T cells, were transiently elevated in

both infarct (Figure 3E through 3G) and viable LV (Figure 3A and 3B). At 7 days, the cardiac T-lymphocyte population included 48±3% CD4⁺ and 41±2% CD8⁺ cells among all CD3⁺ T cells in the noninfarcted LV wall in AAV-MI controls. In contrast, cardiac-infiltrating Tregs were very sparse at all time points analyzed (1.8±0.5 cells/mm² observed in infarct at 7 days post-MI, representing only 2% to 5% of all CD4⁺ T cells).

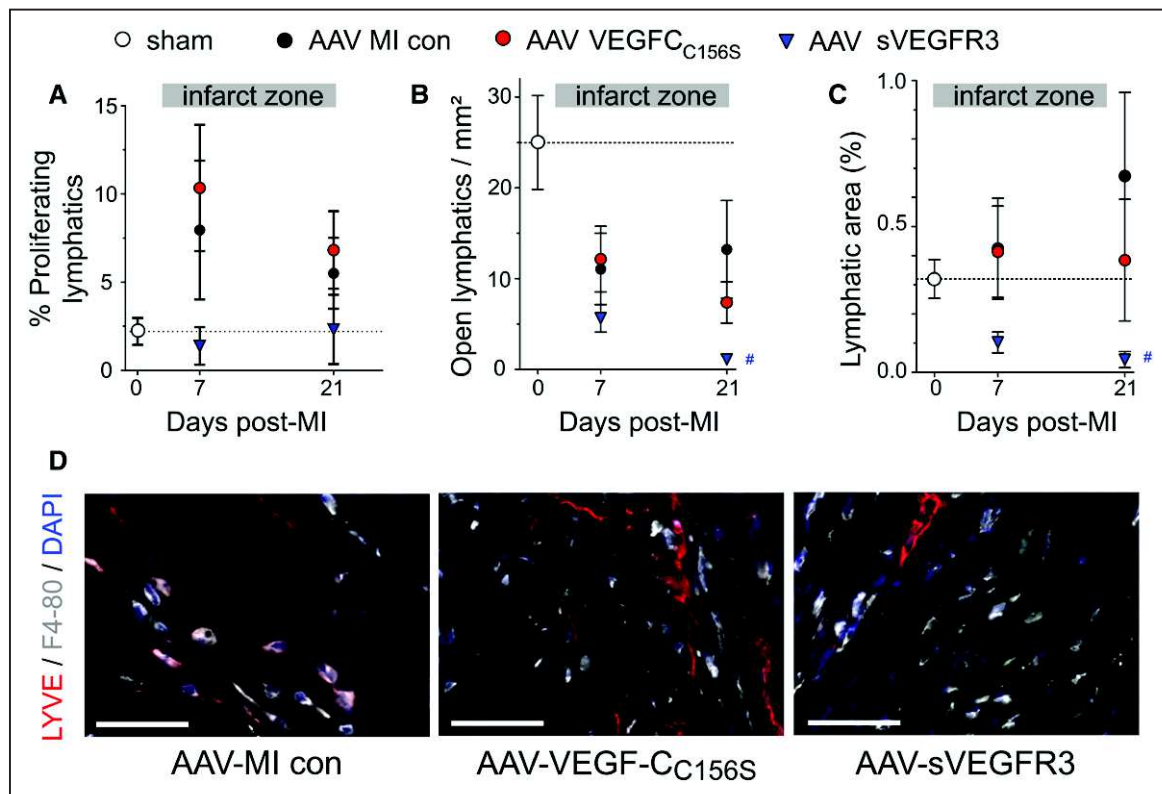


Figure 2. Adeno-associated viral (AAV)-sVEGFR3 (soluble vascular endothelial growth factor receptor 3) therapy inhibits infarct lymphangiogenesis postmyocardial infarction (MI).

Mice were treated with AAV-hVEGF (human VEGF)-C_{C156S} gene therapy (red circles, n=8), sVEGFR3 (AAV-sVEGFR3, blue triangles, n=5–7), or AAV-scrambled virus (MI controls, black circles, n=8), and sham-operated mice (white circle, n=7–9) served as healthy controls. Lymphangiogenesis in the infarct scar was evaluated as % proliferating lymphatic vessels (A), open lymphatic densities (B), and lymphatic area at 7 or 21 days post-MI (C). Examples (D) at 21 days post-MI of infarct zone left ventricular lymphatics (Lyve1 [lymphatic vessel endothelial receptor 1], red), macrophages (F4-80, gray), and cell nuclei (DAPI, blue); $\times 20$ magnification, scale bar=50 μm . Note LYVE1-expressing macrophages close to lymphatic vessels. con indicates control.

AAV-VEGF-C_{C156S} lymphangiogenic therapy led to a substantial reduction in both T-cell and macrophage densities in the viable LV (Figure 3A and 3B). Importantly, this decrease was restricted to M1 proinflammatory macrophages, as the numbers of M2-like regenerative macrophages did not differ from AAV-MI controls (5 ± 2 versus 5 ± 1 M2-like cells/mm² at 21 days). In contrast, in the infarct zone, total CD3⁺ and CD8⁺ T-cell densities were unaltered (Figure 3E through 3G). These data revealed expedited resolution of inflammation by expanded and activated cardiac lymphatics only in the viable LV, but not in the infarct zone where lymphatics remain severely altered despite the lymphangiogenic therapy (Figure 1E, Figure 2B). In addition to lymphatic vessel expansion, AAV-VEGF-C_{C156S}-treated mice displayed increased cardiac expression of the LEC-derived chemokine *Ccl21* (Figure 1F), which may mediate lymphatic clearance of cardiac-infiltrating T cells, notably naive/central memory cells expressing the cognate CCR7 receptor. Similarly, cardiac *Ccl2* levels were also increased, whereas *Cx3cl1* levels were unaltered (Figure 1). Taken together, we found that stimulation of lymphangiogenesis with AAV-VEGF-C_{C156S} reduced T-cell densities only in the

viable LV and not in the infarct where lymphatics remained highly dysfunctional and presumably incapable of mediating immune cell exit.

We next evaluated the functional cardiac impact at 21 days post-MI by echocardiography. We found that AAV-MI control mice displayed similar cardiac dysfunction and remodeling as MI mice injected with saline (Table 1, Table I in the [Data Supplement](#)), indicating that AAV gene delivery does not adversely affect the functional cardiac response to injury.

AAV-VEGF-C_{C156S} therapy improved cardiac function, including LV fractional shortening (Figure 3C) and LV anterior wall thickening fraction (33 ± 6 versus $21 \pm 2\%$. LV anterior wall thickness, $P=0.07$, Table 1) as compared to AAV-MI controls. In contrast, it did not alter LV wall thickness or scar maturation (Figure 3D, 3H through 3I). This promisingly reveals that selective stimulation of cardiac lymphangiogenesis, and the associated accelerated resolution of cardiac inflammation in the viable LV, suffices to improve cardiac function after MI.

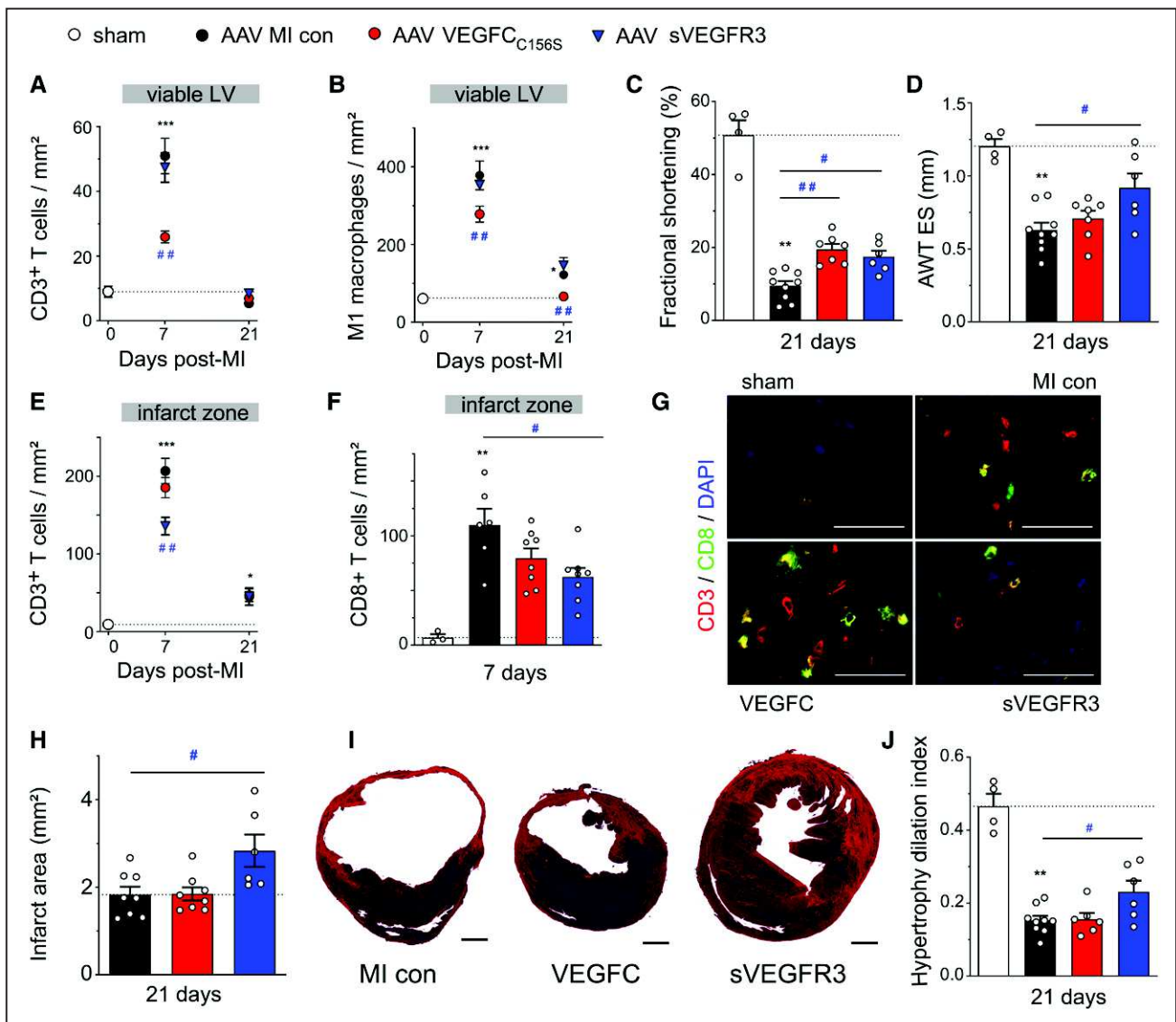


Figure 3. Adeno-associated viral (AAV) delivery of VEGF (vascular endothelial growth factor)-CC156S reduces cardiac inflammation and improves cardiac function, while AAV-sVEGFR3 (soluble VEGF receptor 3) therapy reduces infarct scar T-cell levels and wall thinning leading to improved cardiac function in mice postmyocardial infarction (MI). Cardiac densities in the viable left ventricular (LV) of CD3⁺ T cells (A) and M1 pro-inflammatory macrophages (CD68⁺/CD206⁻ cells), (B) were determined by immunohistochemistry in MI controls (AAV-scramble, black circles, n=8), and VEGFC (AAV-VEGF-C_{C156S}, red circles, n=7-8) or sVEGFR3 (AAV-sVEGFR3, blue triangles, n=5-7) treated mice at 7 and 21 d post-MI. Healthy sham levels (n=7-9) are indicated by white circles / bars. Cardiac function and remodeling were analyzed by echocardiography at 21 days post-MI to determine LV fractional shortening (C) and LV anterior wall thickness in end-systole (AWT ES, D). Infarct densities of CD3⁺ total T cells (E) and CD8⁺ T-cell subpopulation (F). Examples of CD8⁺ T-cell density in the infarct at 7 d post-MI (G). CD3 (red), CD8 (green), DAPI (blue), ×20 magnification, scale bar=50 μm. Infarct scar remodeling evaluated in Sirius red-stained histological sections as absolute infarct area (H) at 21 days post-MI in MI controls (AAV-scramble, n=8), VEGFC-(AAV-hVEGF-C_{C156S}, n=7-8) and sVEGFR3-(AAV-sVEGFR3, n=5-7) treated mice. Examples of infarct scar remodeling. Scale bar=1 mm (I). LV hypertrophy/dilatation index was calculated from echocardiographic parameters at 21 days post-MI (J). Kruskal-Wallis, Dunn posthoc test. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 vs sham; #P<0.05; ##P<0.01 vs MI control. con indicates control.

Soluble VEGFR3 Inhibits Infarct Lymphangiogenesis Post-MI in Mice

To investigate the impact of the endogenous lymphangiogenic response post-MI, we next applied a VEGF-C/VEGF-D trap (sVEGFR3), delivered by an AAV vector, to block VEGF-C/-D signaling in the heart. Due to the low endogenous level of VEGF-C

and VEGF-D expression and poor lymphangiogenesis in mice post-MI, notably in the viable LV (Figure 1A and 1B), AAV-sVEGFR3 inhibition of lymphatic proliferation did not reach significance (AAV-sVEGFR3: 1.4±1.0 versus AAV-MI control: 8.0±4.0% proliferating vessels in the infarct at 7 days post-MI, P=0.12, Figure 2A) nor did it reduce total lymphatic densities (AAV-sVEGFR3: 27±15 versus AAV-MI control:

Table 1. Functional Cardiac Evaluation at 21 Days Post-MI in Mouse AAV Study

	Sham	AAV-Scr		AAV-VEGF-C _{C156S}			AAV-sVEGFR3
	Mean±SEM	Mean±SEM	vs Sham	Mean±SEM	vs AAV-Scr	Mean±SEM	vs AAV-Scr
AWT ED, mm	0.81±0.03	0.52±0.04	<i>P</i> <0.01	0.54±0.04	n.s	0.65±0.06	n.s
AWT ES, mm	1.21±0.05	0.63±0.05	<i>P</i> <0.01	0.71±0.05	n.s	0.92±0.10	<i>P</i> <0.05
AW FT, %	49±6	21±2	<i>P</i> <0.05	33±6	<i>P</i> =0.07	42±7	<i>P</i> <0.05
PWT ED, mm	0.96±0.07	0.84±0.09	n.s	0.84±0.08	n.s	1.13±0.13	n.s
PW ES, mm	1.24±0.05	1.05±0.13	n.s	1.00±0.11	n.s	1.34±0.16	n.s
PW FT, %	31±6	24±4	n.s	17±5	n.s	18±5	n.s
LVEDD, mm	2.7±0.2	5.4±0.1	<i>P</i> <0.05	5.4±0.3	n.s	5.1±0.4	n.s
LVESD, mm	1.3±0.2	4.9±0.1	<i>P</i> <0.05	4.4±0.3	n.s	4.2±0.4	n.s
FS, %	51±4	10±1	<i>P</i> <0.01	19±1	<i>P</i> <0.01	17±2	<i>P</i> <0.05
VTI, cm	3.0±0.1	2.2±0.1	<i>P</i> <0.01	2.1±0.1	n.s	2.4±0.2	n.s
HR, bpm	422±9	424±4	n.s	438±18	n.s	423±16	n.s
SV, mL/beat	0.08±0.00	0.06±0.00	<i>P</i> <0.01	0.06±0.00	n.s	0.07±0.00	n.s
CO, mL/min	35±1	26±2	<i>P</i> <0.01	25±1	n.s	28±2	n.s
CI, mL/(min·g)	1.7±0.1	1.2±0.1	<i>P</i> <0.01	1.2±0.1	n.s	1.3±0.1	n.s

Multiple comparisons by Kruskal Wallis analysis followed by Dunn posthoc. AAV indicates adeno-associated viral; AW FT, anterior wall fractional thickening; AWT ED, end-diastolic anterior wall thickness; AWT ES, end-systolic anterior wall thickness; CI, cardiac index; CO, cardiac output; FS, LV fractional shortening; HR, heart rate; LV, left ventricular; LVEDD, LV end-diastolic diameter; LVESD, LV end-systolic diameter; MI, myocardial infarction; n.s, nonsignificant; PW FT, posterior wall fractional thickening; PWT ED, end-diastolic posterior wall thickness; PWT ES, end-systolic posterior wall thickness; Scr, scrambled sequence; SV, stroke volume; sVEGFR3, soluble vascular endothelial growth factor receptor 3; and VTI, velocity-time integral.

58±12 vessels/mm² in the infarct at 21 days post-MI, *P*=0.12). However, open lymphatic vessel density and total lymphatic area in the infarct zone was markedly reduced at 21 days (Figure 2B through 2D), revealing a key role for endogenous VEGF-C and VEGF-D in limiting MI-induced rarefaction of open lymphatic vessels in the infarct. Although AAV-sVEGFR3 did not influence infarct scar size, heart-to-body weight ratio, cardiomyocyte hypertrophy, or angiogenesis (Figure VIA through VID in the [Data Supplement](#)), arteriogenesis was reduced in the viable LV at 21 days post-MI, as compared to AAV-MI controls, although arterial sizes tended to be increased (Figure VIE through VIG in the [Data Supplement](#)). This indirectly suggests that endogenous VEGF-C and VEGF-D ligands may participate in regulation of arteriogenesis post-MI acting via VEGFR2 expressed by blood vascular endothelial cells, as previously published,³⁹ as we did not detect VEGFR3 expression in cardiac blood vessels post-MI (Figure II in the [Data Supplement](#)).

Soluble VEGFR3 Limits Infarct T-Cell Levels and Reduces Deleterious Cardiac Remodeling

Investigating next the functional cardiac impact of the VEGF-C/VEGF-D trap, we expected that the treatment would not influence cardiac immune cell levels nor cardiac function post-MI, given its limited effects on cardiac lymphangiogenesis beyond the infarct. Indeed, AAV-sVEGFR3 treatment, which, as mentioned above, did not reduce total lymphatic density as compared to AAV-MI controls, did not aggravate cardiac

inflammation in the viable LV and both T-cell and M1 macrophage densities were found to be unaltered (Figure 3A and 3B). Surprisingly, at 7 days post-MI in the infarct, where AAV-sVEGFR3 aggravated MI-induced loss of open lymphatic vessels (Figure 2C), we found a marked reduction of cardiac T-cell levels, both total CD3⁺ T-cell and CD8⁺ T-cell subpopulation (Figure 3E through 3G), as compared to AAV-MI controls. A similar effect of the VEGF-C/VEGF-D trap on limiting cardiac T-cell infiltration has been described previously in a mouse model of allograft transplantation,¹³ although its mechanistic explanation awaits further studies.

Echocardiographic analyses revealed unexpectedly that sVEGFR3 treatment improved cardiac function as compared to AAV-MI controls. Indeed, both fractional shortening and LV wall thickness (Figure 3C and 3D), notably of the anterior myocardial segment, were improved. Given that LV cardiomyocyte hypertrophy was not increased (Figure VIC in the [Data Supplement](#)), this prevention of MI-induced LV wall thinning observed in sVEGFR3-treated mice likely reflected increased scar thickness/strength linked to reduced infarct T-cell levels. Indeed, previous studies have shown improved infarct healing in the absence of T cells.⁴⁰ In support of this mechanism, infarct thinning was found to be reduced, and scar area increased at 21 days post-MI by sVEGFR3 treatment (Figure 3H and 3I). As a direct hemodynamic consequence of reduced wall thinning, cardiac hypertrophy-to-LV dilatation index was improved (Figure 3J), explaining

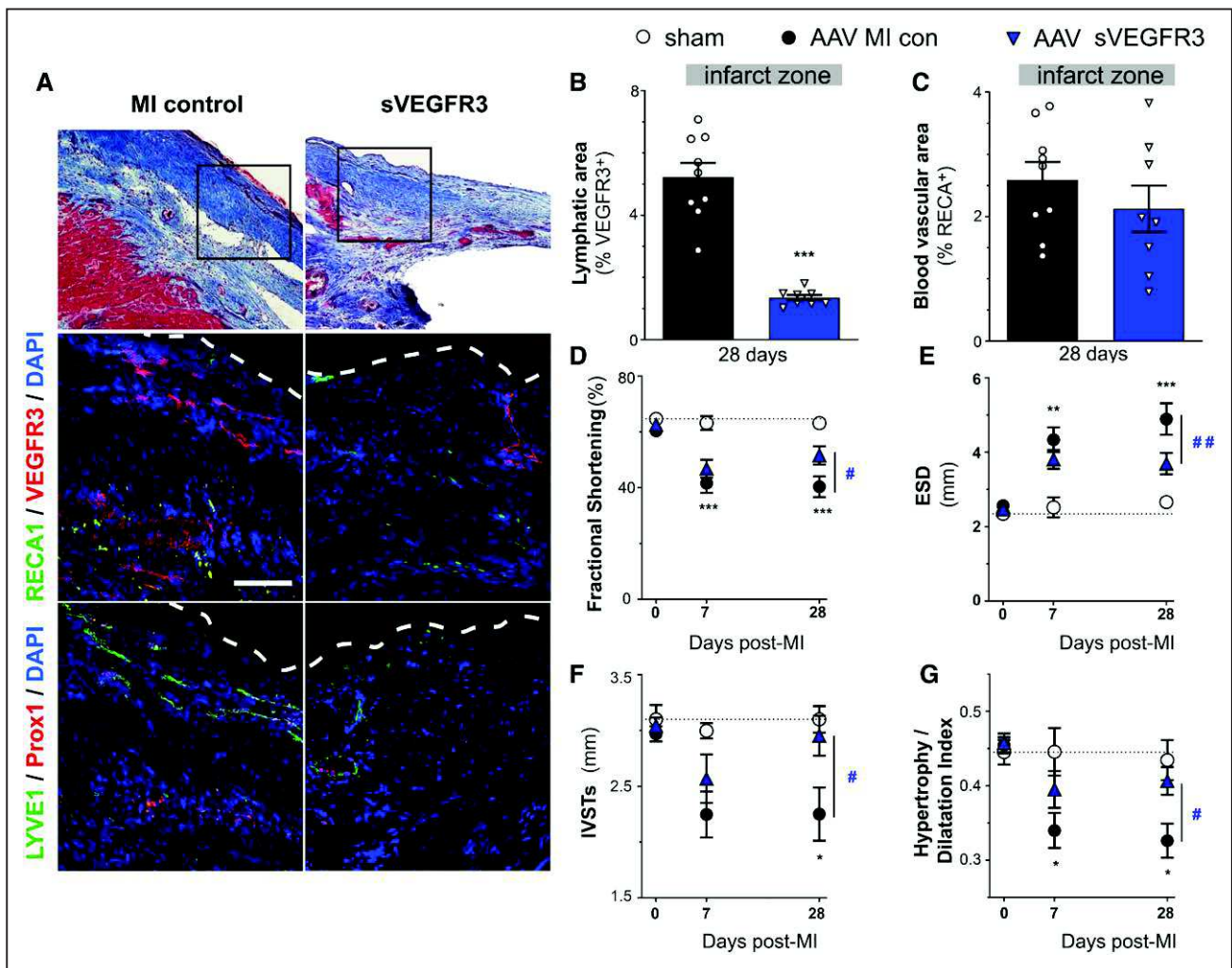


Figure 4. Adeno-associated viral (AAV)-sVEGFR3 (soluble vascular endothelial growth factor receptor 3) therapy suppresses infarct lymphangiogenesis and improves cardiac function and remodeling in rats postmyocardial infarction (MI).

Lymphatic remodeling was investigated in cardiac sections from MI controls (AAV-scramble, black circles, n=8) and sVEGFR3-treated (AAV-sVEGFR3, blue triangles, n=9) rats. Examples of blood vessels and lymphatics in the infarct zone at 28 d post-MI (A): middle panel: lymphatics (VEGFR3, red), and blood vessels (RECA1, green); bottom panel: lymphatics (Lyve1 [lymphatic vessel endothelial receptor 1], green; Prox1 [homeobox gene homologue *Drosophila prospero* gene], red). $\times 20$, scale bar=50 μ m. White dashed lines outline infarct epicardium. Quantification of VEGFR3⁺ lymphatic area (B) and RECA1⁺ blood vascular area (C) in the infarct at 28 days post-MI. Comparison by Student 2-tailed t test: *** P <0.001 vs MI control. Cardiac function was investigated by serial echocardiography in healthy sham rats (open circles, n=4), MI controls (AAV-scramble, black circles, n=13), and sVEGFR3-treated (AAV-sVEGFR3, blue triangles, n=10) MI rats. Left ventricular (LV) fractional shortening (D), end-systolic diameter (ESD, E), systolic interventricular septal wall thickness (IVSTs, F) were measured, and LV hypertrophy/dilatation index (G) calculated. Two-way ANOVA, followed by Bonferroni posthoc: * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001 vs sham; # P <0.05, ## P <0.01 vs MI control. RECA indicates rat endothelial cell antigen.

the improvement of cardiac function observed in sVEGFR3-treated mice.

To confirm the beneficial effects of sVEGFR3 on cardiac function post-MI, we extended our studies to a rat MI model, again using AAV gene delivery of either sVEGFR3 or a scrambled sequence in MI controls. We again found that sVEGFR3 reduced lymphangiogenesis in the infarct, but had no effect on angiogenesis (Figure 4A through 4C). Serial echocardiography revealed that cardiac function, notably fractional shortening, was improved at 28 days post-MI (Figure 4D). Furthermore, sVEGFR3 reduced LV

dilation (Figure 4E) and interventricular septal wall thinning (Figure 4F) and, as a consequence, improved cardiac hypertrophy-to-LV dilatation index, as compared to AAV-MI controls (Figure 4G, Table 2). This suggested, similar to our findings in mice, that cardiac function was improved by sVEGFR3 treatment due to reduced LV wall thinning linked to delayed infarct scar remodeling. Taken together, our studies suggest that sVEGFR3 treatment reduced infarct thinning by limiting cardiac infiltration of T cells. This led to prevention of deleterious LV wall remodeling post-MI resulting in improved cardiac function.

Table 2. Functional Evaluation by Echocardiography at 7 and 28 Days Post-MI in Rat AAV Study

	Sham		AAV-scr				AAV-sVEGFR3			
	7 d	28 d	7 d	vs Sham	28 d	vs Sham	7 d	vs AAV-Scr	28 d	vs AAV-Scr
IVS ED, mm	1.3±0.1	1.3±0.1	1.3±0.1	n.s.	1.2±0.1	n.s.	1.5±0.1	<i>P</i> <0.01	1.5±0.1	<i>P</i> <0.001
IVS ES, mm	3.0±0.1	3.1±0.1	2.2±0.2	n.s.	2.3±0.2	<i>P</i> <0.05	2.3±0.2	<i>P</i> <0.05	2.3±0.2	<i>P</i> <0.05
IVS FT, %	128±9	145±15	74±9	<i>P</i> <0.05	77±12	<i>P</i> <0.001	67±10	n.s.	90±11	n.s.
PWT ED, mm	1.5±0.1	1.6±0.1	1.7±0.1	n.s.	1.8±0.1	n.s.	1.7±0.1	n.s.	1.9±0.1	n.s.
PW ES, mm	3.0±0.1	3.1±0.2	2.7±0.1	n.s.	2.9±0.1	n.s.	3.0±0.1	n.s.	3.2±0.1	<i>P</i> <0.05
PW FT, %	100±12	100±13	57±6	<i>P</i> <0.001	60±6	<i>P</i> <0.01	78±7	<i>P</i> <0.05	73±7	n.s.
LVEDD, mm	6.8±0.4	7.2±0.4	7.3±0.2	n.s.	8.1±0.3	n.s.	7.1±0.1	n.s.	7.6±0.2	n.s.
LVESD, mm	2.5±0.3	2.7±0.1	4.3±0.3	<i>P</i> <0.01	4.9±0.4	<i>P</i> <0.000	3.8±0.3	n.s.	3.7±0.3	<i>P</i> <0.01
FS, %	63±2	63±2	42±3	<i>P</i> <0.001	40±4	<i>P</i> <0.001	47±3	n.s.	52±3	<i>P</i> <0.05
SV, mL/beat	0.69±0.09	0.84±0.13	0.66±0.03	n.s.	0.83±0.05	n.s.	0.67±0.03	n.s.	0.84±0.05	n.s.

Multiple comparisons by 2-way ANOVA followed by Bonferroni posthoc. AAV indicates adeno-associated viral; FS, LV fractional shortening; IVS ED, end-diastolic interventricular septum wall thickness; IVS ES, end-systolic interventricular septum wall thickness; IVS FT, interventricular septum fractional thickening; LV, left ventricular; LVEDD, LV end-diastolic diameter; LVESD, LV end-systolic diameter; MI, myocardial infarction; n.s., nonsignificant; PW FT, posterior wall fractional thickening; PWT ED, end-diastolic posterior wall thickness; PWT ES, end-systolic posterior wall thickness; Scr, scrambled sequence; SV, stroke volume; and sVEGFR3, soluble vascular endothelial growth factor receptor 3.

Cardiac-Infiltrating CD4⁺ and CD8⁺ T Cells Suppress Lymphangiogenesis Post-MI

We next sought to investigate the cellular mechanisms orchestrating the cardiac lymphatic response to ischemic injury. Previous studies have revealed that immune cells contribute to regulation of lymphangiogenesis in many tissues.^{78,41} However, whether cardiac-infiltrating immune cells influence lymphangiogenesis post-MI has not been previously investigated. As mentioned above, our data in AAV-MI controls indicated that macrophages present in the infarct at day 7 may have contributed to scar lymphangiogenesis by locally producing VEGF-C (Figure IVD in the [Data Supplement](#)). We next turned our attention to T lymphocytes, given their well-documented acute deleterious effects on infarct remodeling, including both direct and indirect effects on cardiomyocytes, fibroblast, and vascular cells.^{27,42,43} We hypothesized that CD4⁺ helper or CD8⁺ cytotoxic T cells additionally may contribute to the poor endogenous cardiac lymphangiogenic response observed acutely post-MI in our mouse model. To prevent T-cell mobilization and cardiac entry after MI, we treated mice with an S1P (sphingosine-1-phosphate) receptor agonist, Fingolimod, as described.³³ Due to the angiogenic and lymphangiogenic effects associated with chronic S1P stimulation,^{44,45} we restricted treatment to the first 48 hours following MI to selectively target acute-phase cardiac T-cell recruitment. We found, as expected, that Fingolimod potently reduced circulating and cardiac T-cell levels (Figure 5A through 5C, Figure VIIIA in the [Data Supplement](#)). However, by 21 days post-MI, cardiac T cells in the viable LV of control MI mice returned to healthy sham levels, and no difference was observed in the Fingolimod group at this later time point. Similarly, in the infarct, where MI controls displayed persistently

elevated T-cell levels, acute-phase Fingolimod treatment did not suppress chronic phase T-cell levels. Interestingly, Fingolimod-induced prevention of cardiac T-cell recruitment at 3 days post-MI led to a significant reduction of M1 proinflammatory macrophage densities in the viable LV at 7 days post-MI (Figure 5D).

Prevention of cardiac T-cell recruitment by Fingolimod strikingly reduced MI-induced lymphatic rarefaction, with increased density of total lymphatics (Figure 5E) as well as open lymphatics observed in the viable LV (Figure 5F and 5G), as compared to MI controls. Although cardiac LEC proliferation rates were not increased by Fingolimod (Fingolimod: 15.1±2.3 versus MI controls: 13.2±1.6% proliferating lymphatics at 3 days), cardiac lymphatic density at 7 days post-MI was inversely correlated with cardiac T-cell density (Figure VIIIC in the [Data Supplement](#)). Remarkably, the results observed at 7 days in the viable LV of Fingolimod-treated mice (Figure 5E and 5F) closely mirror our findings with the AAV-VEGF-C^{156S} therapy (Figure 1C, Figure VC in the [Data Supplement](#)), indicating that cardiac-recruited T cells mediate adverse lymphatic remodeling and rarefaction after MI. However, different from lymphangiogenic gene therapy, the lymphatic density was reduced by 21 days post-MI in the Fingolimod-treated group (Figure 5E and 5F), although T-cell levels at this later stage were no longer elevated in the viable LV (Figure 5C). This indicates that beyond stimulation of initial LEC growth or survival post-MI, the maintenance of newly formed lymphatic vessels requires prolonged expression of lymphangiogenic factors. This may explain why AAV therapy, but not adenoviral therapy, induced cardiac lymphatic expansion post-MI.

In the infarct, Fingolimod-induced acute suppression of T cells similarly increased lymphatic density by 7 days (Figure VIIIB in the [Data Supplement](#)). However, the

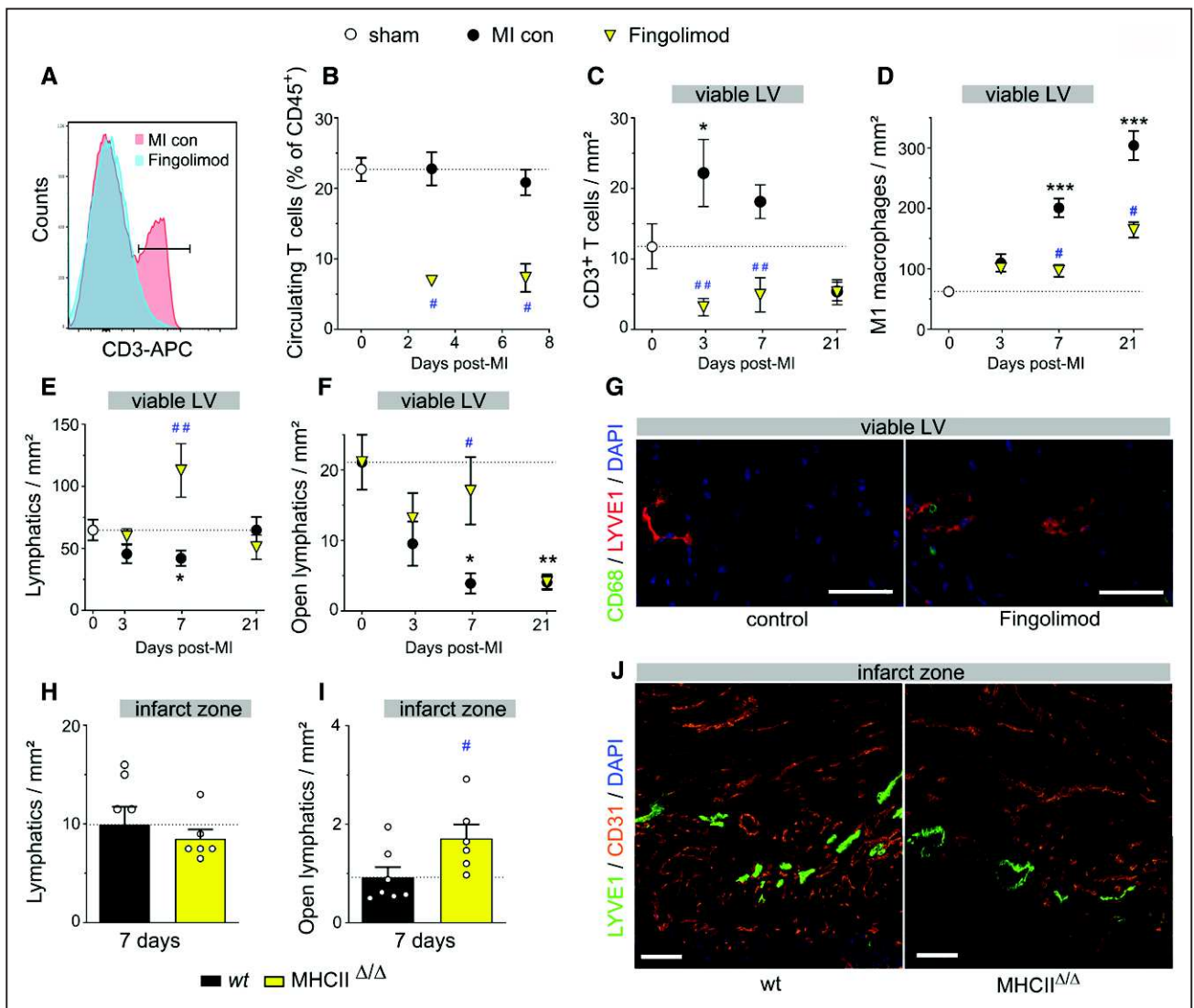


Figure 5. Cardiac-infiltrating T cells suppress lymphangiogenesis in mice postmyocardial infarction (MI). Circulating T-cell levels (A and B) were determined by flow cytometry in saline-injected MI controls (black circles, n=4–5) and Fingolimod-treated wild-type (wt) MI mice (yellow triangles, n=4–5) at 3 and 7 days post-MI and healthy sham mice (white circles, n=4). Cardiac sections were analyzed to determine densities of CD3⁺ total T cells (C), M1 proinflammatory macrophages (D), lymphatic vessels (E), and open lymphatic vessels (F) in the viable left ventricular (LV) of saline-injected MI controls (black circles, n=4–13) and Fingolimod-treated MI mice (yellow triangles, n=7–9) at 3, 7 and 21 days post-MI. Healthy sham levels (n=5–10) indicated by white circle. One-way ANOVA, Dunn posthoc test. **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001 vs sham; #*P*<0.05; ##*P*<0.01 vs MI controls. Examples of cardiac lymphatics (Lyve1 [lymphatic vessel endothelial receptor 1], red) in the viable LV at 7 days post-MI (G). ×20, scale bar=50 μm. Note peri-lymphatic macrophages (CD68, green). Analysis of lymphatic remodeling in wt (black, n=7) vs MHC (major histocompatibility complex) II^{Δ/Δ} CD4⁺ T cell-deficient (yellow, n=6) mice at 7 days post-MI assessed as densities of total lymphatic vessel (H) and open lymphatic vessels (I and J) in the infarct zone. Kruskal-Wallis followed by Dunn posthoc test. #*P*<0.05 vs wt MI controls. Examples of Lyve1⁺ (green) lymphatics and CD31⁺ blood vessels (red) in the infarct zone at 7 days post-MI (J). ×10, scale bar=50 μm. APC indicates antigen-presenting cell.

MI-induced early slimming and rarefaction of open lymphatic vessels was not prevented (Figure VIIIID through VIIIIF in the [Data Supplement](#)), likely due to incomplete inhibition of T-cell invasion by Fingolimod in the infarct (Figure VIIIA in the [Data Supplement](#)). Surprisingly, by 21 days post-MI, both total lymphatic density and open vessel density were increased in the infarct in Fingolimod-treated mice, as compared to MI controls, despite the return of T cells to control MI levels. This indicates

that only T-cell activity in the acute post-MI phase limits lymphangiogenesis. In contrast, blood vessel rarefaction, observed during the first-week post-MI, was not significantly altered by Fingolimod (Figure VIIIH in the [Data Supplement](#)). Furthermore, in agreement with previous findings,⁴⁶ at 21 days post-MI, although infarct size was not altered (Figure VIIIG in the [Data Supplement](#)), cardiac function and remodeling were improved in Fingolimod-treated mice as compared to MI controls

(Figure VIII through VIIIK and Table I in the [Data Supplement](#)). Indeed, Fingolimod treatment, similar to sVEGFR3 treatment, reduced LV wall thinning and improved cardiac hypertrophy-to-LV dilatation index (Table I and Figure VIIIK in the [Data Supplement](#)). Taken together, our data demonstrate that T cells recruited to the heart in the acute-phase post-MI contribute to lymphatic loss and deleterious remodeling after MI.

To determine which subset of T cells was responsible for the deleterious impact on cardiac lymphatics post-MI, we next investigated lymphatic remodeling in MHCII^{ΔΔ} mice that lack CD4⁺ T cells. We found that infarct sizes were similar between wild-type mice and MHCII^{ΔΔ} mice at 7 days post-MI (Figure IXA in the [Data Supplement](#)). Cardiac lymphatic densities and total lymphatic areas were similar in CD4⁺-deficient mice as compared to wild-type mice both at baseline (before MI) and at 7 days post-MI (Figure 5H, Figure IXB in the [Data Supplement](#)). In contrast, open lymphatic vessel density in the infarct was significantly increased at 7 days post-MI in mice lacking CD4⁺ T cells (Figure 5I and 5J), consistent with the data from Fingolimod-treated mice. Furthermore, in the absence of cardiac-infiltrating CD4⁺ T cells in MHCII^{ΔΔ} mice, flow cytometric evaluation revealed increased cardiac macrophage density but decreased levels of proinflammatory M1 (CD206⁻/CD86⁺) macrophages at 7 days post-MI (Figure IXC and IXD in the [Data Supplement](#)), similar as our findings with Fingolimod (Figure 5D).

To confirm the specific involvement of cardiac-infiltrating T cells, we next applied *in vivo* depleting antibodies to acutely block CD4⁺ or CD8⁺ T-cell subsets immediately post-MI. Additionally, given that IFN- γ has been proposed as a major T-cell-derived lymphangiogenic inhibitor,^{8,47} we evaluated the impact of neutralizing antibodies against this Th1 cytokine. Flow cytometry at 2 and 8 days post-MI confirmed selective knockdown of circulating CD4⁺ or CD8⁺ T cells (Figure 6A and 6B). Immunohistochemistry of cardiac sections at 8 days post-MI similarly confirmed selective depletion of cardiac T-cell subsets (Figure 6C and 6D). We found that CD4⁺ or CD8⁺ depletion prevented lymphatic rarefaction post-MI (Figure 6E through 6G), although it did not reduce lymphatic precollector slimming (Figure XD in the [Data Supplement](#)). Interestingly, whereas neutralization of IFN γ did not alter circulating or cardiac T- or B-cell levels (Figure 6A through 6C, Figure XA and XB in the [Data Supplement](#)), it partially blocked MI-induced deleterious lymphatic remodeling, including loss of open lymphatic vessels in the heart (Figure XC and XE in the [Data Supplement](#)). In conclusion, our data reveal that cardiac-infiltrating CD4⁺ and CD8⁺ T cells exert potent deleterious effects on cardiac lymphatics and contribute, in part, through IFN γ , to rarefaction of both lymphatic capillaries and precollectors in the acute-phase post-MI.

DISCUSSION

In this study, we demonstrated that therapeutic stimulation of lymphatic vessel growth in the heart required sustained elevated expression of lymphangiogenic growth factors, as achieved by AAV but not adenoviral gene therapy. Moreover, although we previously demonstrated that lymphangiogenesis may be induced by intramyocardial sustained-release of VEGF-C protein, we found that systemic delivery of recombinant human VEGF-C_{C156S} protein, as proposed recently,^{25,38} was inefficient to increase cardiac lymphangiogenesis. Indeed, although our study revealed no increase in either plasma VEGF-C levels or lymphatic proliferation in the heart in response to repeated intraperitoneal injections of VEGF-C_{C156S} protein, the previous studies, based on the same approach, notably did not provide any evidence of increased circulating or cardiac VEGF-C levels.^{25,38} Consequently, our data support the concept of strict time- and dose-dependence of VEGF-C delivery to achieve therapeutic lymphangiogenesis in the heart. Promisingly, our study revealed that therapeutic expansion of lymphatic vessels accelerated resolution of cardiac inflammation with reduction of both cardiac T lymphocytes and M1 proinflammatory macrophages in the viable LV. This selective improvement of immune cell clearance, without modification of angiogenesis or cardiomyocyte hypertrophy, significantly reduced cardiac dysfunction. To further advance our understanding of how cardiac lymphangiogenesis is regulated after MI, with the aim to develop better therapies, future studies may benefit from assessment not only of VEGF-C/VEGF-D but also of the molecular partners essential for their proteolytic processing, CCBE1 (collagen- and calcium-binding EGF domains 1) and ADAMTS3 (a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type I motif 3).⁴⁸

Our findings of the cardiac functional benefit with sVEGFR3 treatment in both mouse and rat MI models were completely unexpected. The absence of aggravation of cardiac inflammation was likely due to the low endogenous level of lymphangiogenesis observed in the viable LV post-MI, leading to limited functional impact of antilymphangiogenic therapy. However, in both mice and rats, we found reduced LV wall thinning with sVEGFR3 due to delayed infarct scar remodeling. These beneficial functional cardiac effects of sVEGFR3 were observed in female mice. Interestingly, a recent study also investigating sVEGFR3 treatment in male mice reported increased post-MI mortality linked to cardiac rupture.⁴⁹ This apparent discrepancy with our findings may be explained by the sex-dependence of extracellular matrix remodeling post-MI, with weaker scars formed in male mice.⁵⁰ It is likely that the sVEGFR3-induced delay in infarct maturation, due to prevention of T-cell infiltration, is beneficial only in female mice, as in males, the scar will rupture if not rapidly matured. Importantly, we observed functional cardiac

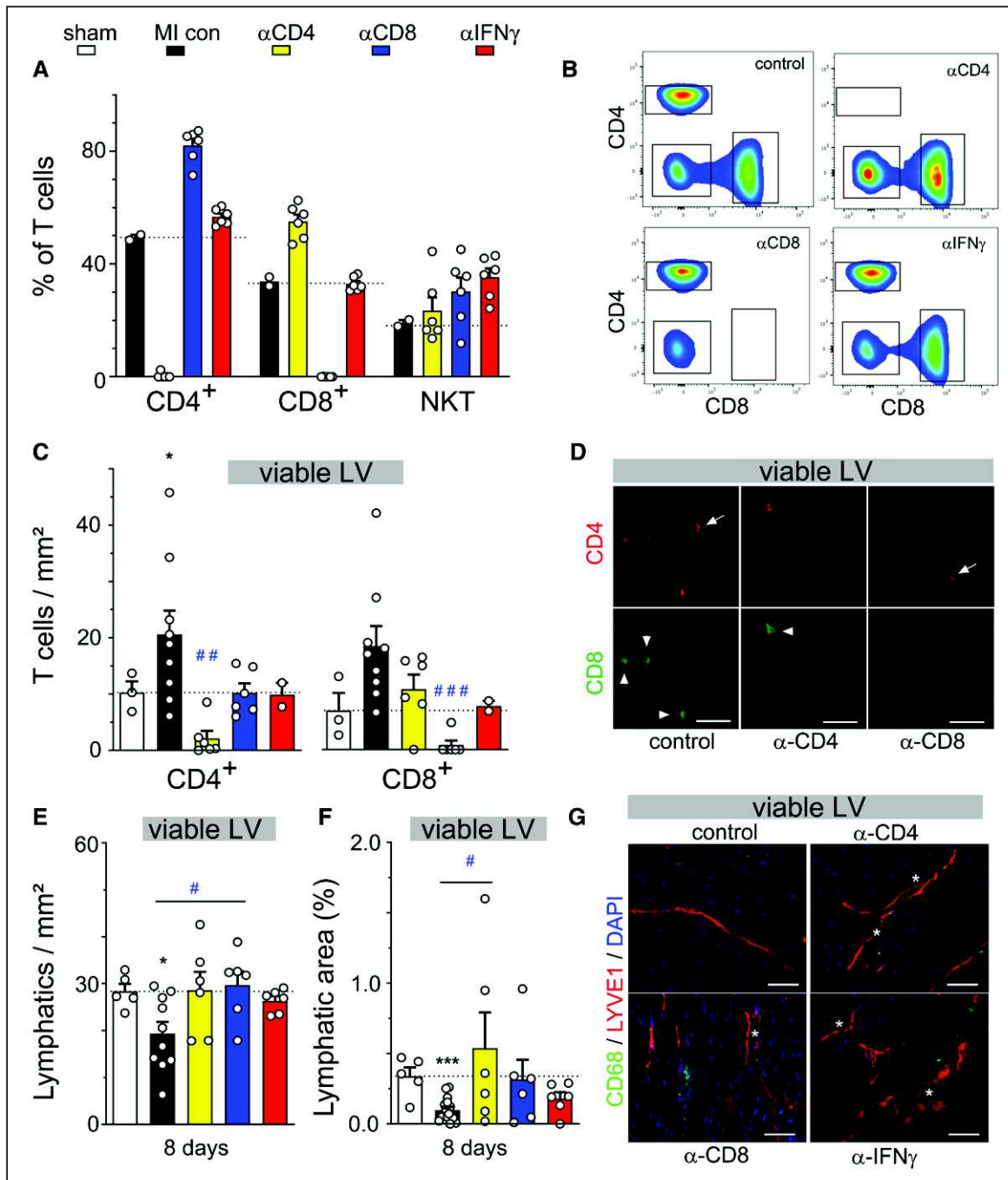


Figure 6. Depletion of CD4 and CD8, but not NKT, T-cell subpopulations prevents rarefaction of cardiac lymphatics acutely postmyocardial infarction (MI).

Assessment by flow cytometry at 8 days post-MI of circulating T-cell populations (A and B) in control MI mice (black, n=2), CD4-depleted mice (yellow, n=6), CD8-depleted mice (blue, n=6), and mice treated with an IFN (interferon) γ -neutralizing antibody (red, n=6). Evaluation by immunohistochemistry of viable left ventricular (LV) at 8 days post-MI of CD4+ and CD8+ cardiac T-cell densities (C) and total lymphatic density (E) and lymphatic area (F) in healthy sham mice (white, n=3–5) control MI mice (black, n=10), CD4-depleted mice (yellow, n=6), CD8-depleted mice (blue, n=6), and anti-IFN γ -treated mice (red, n=7). Examples of cardiac T-cell densities (D) and lymphatic densities (G) in viable LV at 8 days post-MI. CD4+ cells indicated by arrow, CD8+ cells by arrowhead, and open lymphatics indicated by asterisk. $\times 20$, scale bar=50 μ m. Kruskal-Wallis followed by Dunn posthoc test. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ vs sham; # $P < 0.05$; ### $P < 0.001$ vs MI controls.

benefit of sVEGFR3 treatment in male rats, which have thicker scars than mice. This indicates that both sex and species-differences in post-MI wall strength may influence the risk/benefit of acute-phase T-cell-modulating

therapies. This issue will require further mechanistic studies. Taken together, our data revealed that whereas stimulation of cardiac lymphangiogenesis with VEGF-C_{156S} was beneficial after MI, due to accelerated resolution

of inflammation in the viable LV wall, treatment with the VEGF-C/VEGF-D trap also attenuated cardiac remodeling due to reduced infarct thinning by suppression of recruitment/expansion/activation of T cells in the infarct. These lymphangiogenesis-independent immunomodulatory effects of sVEGFR3 remain to be further explored. However, the beneficial effects previously reported with sVEGFR3 therapy in another model of cardiac inflammation are noteworthy in this context: in a mouse cardiac allograft model adenoviral delivery of sVEGFR3 reduced cardiac CD8⁺ T-cell levels.¹³ This was proposed to be linked to decreased cardiac-derived DC homing to the spleen, due to reduced cardiac lymphatic expression of *Ccl21*, a major lymphatic chemokine for DCs and T cells. In addition, it is possible that endogenous VEGF-C and VEGF-D may directly influence cardiac recruitment, maturation, and activation of cardiac DCs that express both VEGFR2 and VEGFR3.⁵¹ In agreement, our preliminary data indicate significantly reduced mature CD103⁺ CD11c⁺ DC levels in the heart of sVEGFR3-treated mice as compared to AAV-MI controls (sVEGFR3: 18±5 versus AAV-MI control: 64±19 mature DCs/mm², $P < 0.01$). This suggests that treatment with sVEGFR3 may have reduced antigen presentation by cardiac DCs post-MI, which would limit recruitment or expansion of T cells in the infarct. However, increased cardiac DCs levels in the viable LV has been proposed to protect the remodeling postischemic heart by limiting M1 proinflammatory macrophage recruitment, inducing a beneficial inflammatory-to-reparative macrophage shift but also by stimulating Treg expansion in cardiac-draining lymph nodes. Of note, this mechanism has been proposed to be crucial for maintenance of lymphocyte tolerance to self-antigens following cardiac injury.^{52–54} Future studies are needed to address the potential impact of lymphangiogenesis on cardiac immune tolerance after injury.

Finally, in this study, we uncovered a dominant-negative role of cardiac-infiltrating T cells, both CD4⁺ helper and CD8⁺ cytotoxic T cells, on the endogenous cardiac lymphangiogenic response acutely post-MI. There are many previous reports demonstrating the deleterious short- and long-term cardiac effects of T cells, especially CD4⁺ helper cells, on cardiomyocytes, macrophages, and fibroblasts.^{27,42,43} Our data revealed that, in addition, infiltrating CD4⁺ and CD8⁺ T cells reduce cardiac lymphatic vessel survival acutely post-MI, in part via IFN γ secretion, rendering the vessels less responsive to endogenous lymphangiogenic stimuli. A similar direct negative impact of CD4⁺ T cells on lymphatics has been described in both inflamed skin and lymph nodes.^{3,41} However, it is noteworthy that cardiac lymphatic slimming (reduced lymphatic diameters) was not influenced by Fingolimod or IFN γ neutralization, nor by AAV-VEGF-C_{C156S} therapy or sVEGFR3 treatment, suggesting involvement of factors other than T-cell-derived cytokines or the VEGF-C/VEGF-D/VEGFR3 axis.⁵⁵ Interestingly, adrenomedullin

was recently shown to increase vessel diameters in female mice post-MI.⁵⁶ Additionally, it has been reported that apelin-deficient male mice display increased endogenous lymphangiogenesis post-MI, potentially linked to elevated cardiac recruitment of VEGF-C-secreting B cells.⁵⁷ Conversely, apelin overexpression by gene therapy limited cardiac inflammation (macrophage density and IL [interleukin]-1 β levels) post-MI and reduced lymphangiogenic responses. Hence inflammation may both drive and oppose cardiac lymphangiogenesis. The tipping point remains to be determined and may relate to local T- and B-cell balance in the heart, similar as suggested for remodeling lymph nodes.^{7,8}

A key weakness of our study is that we opted for a pretreatment approach with the AAV gene therapy, with the aim to achieve similar post-MI acute-phase expression kinetics of VEGF-C_{C156S} as with adenoviral gene therapy to compare these treatments. It thus remains to be determined whether AAV-mediated therapeutic gene delivery after MI will be equally efficient to stimulate lymphatic repair, reduce cardiac inflammation, and improve cardiac function. Given that our AAV therapy led to long-term growth factor delivery, it is likely that this approach will be suitable to stimulate cardiac lymphangiogenesis also when administered post-MI. Moreover, it will be important to assess whether the chronic, low-grade inflammation that occurs months after MI in patients prone to heart failure development is similarly amenable to improvement by lymphangiogenic therapy. Furthermore, in our model, there was no significant fibrosis in the viable LV at 21 days post-MI, and it thus remains to be determined whether lymphangiogenic gene therapy may reduce interstitial cardiac fibrosis post-MI similar, as we reported previously in rats. Finally, the effects on cardiac remodeling and function of combined stimulation of cardiac angiogenesis and lymphangiogenesis post-MI remain to be investigated.

Taken together, our findings revealed that cardiac inflammation and lymphangiogenic responses are closely interconnected. We propose that while therapeutic stimulation of lymphatic remodeling by gene therapy may provide a novel approach to limit cardiac inflammation in cardiovascular diseases, T-cell-targeted therapy, including anti-IFN γ treatment,⁵⁸ may act in part by enhancing endogenous lymphangiogenic responses post-MI leading to improved lymphatic drainage with accelerated cardiac fluid and immune cell clearance, both essential for optimal cardiac functional recovery and repair.

ARTICLE INFORMATION

Received October 23, 2019; accepted April 30, 2020.

Affiliations

From the Normandy University, UniRouen, Inserm (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale) UMR1096 (EnVI Laboratory), FHU REMOD-VHF, Rouen, France (H.M., A.D., V.T., I.B., J.P.H., S.R., J.R., S.F., V.R., P.M.); Normandy

University, UniRouen, Inserm UMR1239 (DC2N Laboratory), Mont Saint Aignan, France (D.G., Y.A.); Normandy University, UniRouen, PRIMACEN, Mont Saint Aignan, France (D.S.); Wihuri Research Institute and Translational Cancer Biology Program, Research Programs Unit, Faculty of Medicine, University of Helsinki, Finland (R.K., K.A.H., K.A.); Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), Inserm UMR1048, Université de Toulouse III, France (N.P., M.B.); and Normandy University, UniRouen, Inserm (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale) UMR1234 (PANTHER Laboratory), Rouen, France (G.R., S.A.).

Acknowledgments

M. Houssari and E. Brakenhielm designed and carried out protein and gene therapies in mice; M. Houssari and A. Dumesnil performed and analyzed immunohistochemistry and histology. V. Tardif, A. Dumesnil, and J. Rondeaux performed and analyzed flow cytometry together with G. Riou, V. Tardif, and S. Adriouch designed the antibody-depletion experiments. I. Boukhalfa performed and analyzed echocardiography in mice; R. Kivelä, K.A. Hemanthakumar, and K. Alitalo designed, performed, and analyzed the rat myocardial infarction (MI) study; N. Pizzinat and M. Bizou designed, performed, and analyzed the MHCIIΔ/Δ mouse MI study and edited the final article; D. Godefroy and D. Schapman carried out and postprocessed light-sheet and confocal imaging, respectively; J.P. Henry carried out mouse MI model; M. Houssari, S. Fraineau, and S. Renet designed and carried out cardiac gene expression analyses in mice; Y. Anouar contributed reagents/materials/analysis tools; R. Kivelä and K. Alitalo designed and produced adenoviral and adeno-associated viral (AAV) gene vectors and edited the final article, P. Mulder guided echocardiography analyses and development of gene therapy protocols, and P. Mulder and V. Richard edited the final article; E. Brakenhielm and M. Houssari prepared the article draft. All authors approved the final version of the article. We thank Morgane Grosset and Paul Rouault at Normandy University for assistance with the mouse MI model, Päivi Leinikka, and Eero Mervaala at Helsinki University for carrying out the rat MI model, and the AAV Gene Transfer and Cell Therapy Core Facility and Biomedicum imaging unit at the University of Helsinki for their expert help.

Sources of Funding

The research leading to these results received funding from the ERA-CVD Research Programme, which is a transnational R&D programme jointly funded by national funding organizations (ANR-16-ECVD-0004) within the framework of the ERA-NET ERA-CVD. The project also benefitted from funds from the FHU REMOD-VHF (Inserm U1096 laboratory), and generalized institutional funds (Inserm U1096 laboratory) from French Inserm and the Normandy Region together with the European Union: Europe gets involved in Normandie with European Regional Development Fund (ERDF): CPER/FEDER 2015 (DO-IT) and CPER/FEDER 2016 (PACT-CBS).

Disclosures

None.

REFERENCES

- Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature*. 2005;438:946–953. doi: 10.1038/nature04480
- Randolph GJ, Ivanov S, Zinselmeyer BH, Scallan JP. The Lymphatic System: Integral Roles in Immunity. *Annu Rev Immunol*. 2017;35:31–52. doi: 10.1146/annurev-immunol-041015-055354
- Randolph GJ, Miller NE. Lymphatic transport of high-density lipoproteins and chylomicrons. *J Clin Invest*. 2014;124:929–935. doi: 10.1172/JCI71610
- Wiig H, Schröder A, Neuhofer W, Jantsch J, Kopp C, Karlsen TV, Boschmann M, Goss J, Bry M, Rakova N, et al. Immune cells control skin lymphatic electrolyte homeostasis and blood pressure. *J Clin Invest*. 2013;123:2803–2815. doi: 10.1172/JCI60113
- Liao S, Cheng G, Conner DA, Huang Y, Kucherlapati RS, Munn LL, Ruddle NH, Jain RK, Fukumura D, Padera TP. Impaired lymphatic contraction associated with immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:18784–18789. doi: 10.1073/pnas.1116152108
- Scallan JP, Zawieja SD, Castorena-Gonzalez JA, Davis MJ. Lymphatic pumping: mechanics, mechanisms and malfunction: Lymphatic pumping mechanisms. *J Physiol*. 2016;594(20):5749–5768. doi: 10.1113/JP272088
- Angeli V, Ginhoux F, Lodrà J, Quemeneur L, Frenette PS, Skobe M, Jessberger R, Merad M, Randolph GJ. B cell-driven lymphangiogenesis in inflamed lymph nodes enhances dendritic cell mobilization. *Immunity*. 2006;24:203–215. doi: 10.1016/j.immuni.2006.01.003
- Kataru RP, Kim H, Jang C, Choi DK, Koh BI, Kim M, Gollamudi S, Kim YK, Lee SH, Koh GY. T lymphocytes negatively regulate lymph node lymphatic vessel formation. *Immunity*. 2011;34:96–107. doi: 10.1016/j.immuni.2010.12.016
- Förster R, Braun A, Wörbs T. Lymph node homing of T cells and dendritic cells via afferent lymphatics. *Trends Immunol*. 2012;33:271–280. doi: 10.1016/j.it.2012.02.007
- Aebischer D, Iolyeva M, Halin C. The inflammatory response of lymphatic endothelium. *Angiogenesis*. 2014;17:383–393. doi: 10.1007/s10456-013-9404-3
- Huggenberger R, Ullmann S, Proulx ST, Pytowski B, Alitalo K, Detmar M. Stimulation of lymphangiogenesis via VEGFR-3 inhibits chronic skin inflammation. *J Exp Med*. 2010;207:2255–2269. doi: 10.1084/jem.20100559
- D'Alessio S, Correale C, Tacconi C, Gandelli A, Pietrogrande G, Vetrano S, Genua M, Arena V, Spinelli A, Peyrin-Biroulet L, et al. VEGF-C-dependent stimulation of lymphatic function ameliorates experimental inflammatory bowel disease. *J Clin Invest*. 2014;124:3863–3878. doi: 10.1172/JCI72189
- Nykänen AI, Sandelin H, Krebs R, Keränen MA, Tuuminen R, Kärpänen T, Wu Y, Pytowski B, Koskinen PK, Ylä-Herttua S, et al. Targeting lymphatic vessel activation and CCL21 production by vascular endothelial growth factor receptor-3 inhibition has novel immunomodulatory and antiatherosclerotic effects in cardiac allografts. *Circulation*. 2010;121:1413–1422. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.910703
- Dieterich LC, Seidel CD, Detmar M. Lymphatic vessels: new targets for the treatment of inflammatory diseases. *Angiogenesis*. 2014;17:359–371. doi: 10.1007/s10456-013-9406-1
- Frangogiannis NG. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodeling. *Nat Rev Cardiol*. 2014;11:255–265. doi: 10.1038/nrcardio.2014.28
- Swirski FK, Nahrendorf M. Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. *Science*. 2013;339:161–166. doi: 10.1126/science.1230719
- Nahrendorf M, Pittet MJ, Swirski FK. Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation*. 2010;121:2437–2445. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.916346
- Flaht-Zabost A, Gula G, Ciszek B, Czarnowska E, Jankowska-Steifer E, Madej M, Niderla-Bielińska J, Radomska-Leśniowska D, Ratajska A. Cardiac mouse lymphatics: developmental and anatomical update. *Anat Rec Hoboken NJ*. 2007;297(6):1115–1130. doi: 10.1002/ar.22912
- Brakenhielm E, Alitalo K. Cardiac lymphatics in health and disease. *Nat Rev Cardiol*. 2019;16:56–68. doi: 10.1038/s41569-018-0087-8
- Dashkevich A, Bloch W, Antonyan A, Fries JU, Geissler HJ. Morphological and quantitative changes of the initial myocardial lymphatics in terminal heart failure. *Lymphat Res Biol*. 2009;7:21–27. doi: 10.1089/lrb.2008.10.10
- Kholová I, Dragneva G, Cermáková P, Laidinen S, Kaskenpää N, Hazes T, Cermáková E, Steiner I, Ylä-Herttua S. Lymphatic vasculature is increased in heart valves, ischaemic and inflamed hearts and in cholesterol-rich and calcified atherosclerotic lesions. *Eur J Clin Invest*. 2011;41:487–497. doi: 10.1111/j.1365-2362.2010.02431.x
- Ishikawa Y, Akishima-Fukasawa Y, Ito K, Akasaka Y, Tanaka M, Shimokawa R, Kimura-Matsumoto M, Morita H, Sato S, Kamata I, et al. Lymphangiogenesis in myocardial remodeling after infarction. *Histopathology*. 2007;51:345–353. doi: 10.1111/j.1365-2559.2007.02785.x
- Perin EC, Tian M, Marini FC III, Silva GV, Zheng Y, Baimbridge F, Quan X, Fernandes MR, Gahremanpour A, Young D, et al. Imaging long-term fate of intramyocardially implanted mesenchymal stem cells in a porcine myocardial infarction model. *PLoS One*. 2011;6:e22949. doi: 10.1371/journal.pone.0022949
- Sun QN, Wang YF, Guo ZK. Reconstitution of myocardial lymphatic vessels after acute infarction of rat heart. *Lymphology*. 2012;45:80–86.
- Klotz L, Norman S, Vieira JM, Masters M, Rohling M, Dubé KN, Bollini S, Matsuzaki F, Carr CA, Riley PR. Cardiac lymphatics are heterogeneous in origin and respond to injury. *Nature*. 2015;522:62–67. doi: 10.1038/nature14483
- Henri O, Poueche C, Houssari M, Galas L, Nicol L, Edwards-Lévy F, Henry JP, Dumesnil A, Boukhalfa I, Banquet S, et al. Selective Stimulation of Cardiac Lymphangiogenesis Reduces Myocardial Edema and Fibrosis Leading to Improved Cardiac Function Following Myocardial Infarction. *Circulation*. 2016;133:1484–97; discussion 1497. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020143
- Laroumanie F, Douin-Echinard V, Pozzo J, Lairez O, Tortosa F, Vinel C, Delage C, Calise D, Dutaur M, Parini A, et al. CD4+ T cells promote the transition from hypertrophy to heart failure during chronic pressure overload. *Circulation*. 2014;129:2111–2124. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007101

28. Besnier M, Galaup A, Nicol L, Henry JP, Coquerel D, Gueret A, Mulder P, Brakenhielm E, Thuillez C, Germain S, et al. Enhanced angiogenesis and increased cardiac perfusion after myocardial infarction in protein tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *FASEB J*. 2014;28:3351–3361. doi: 10.1096/fj.13-245753
29. Kivelä R, Bry M, Robciuc MR, Räsänen M, Taavitsainen M, Silvola JM, Saraste A, Hulmi JJ, Anisimov A, Mäyränpää MI, et al. VEGF-B-induced vascular growth leads to metabolic reprogramming and ischemia resistance in the heart. *EMBO Mol Med*. 2014;6:307–321. doi: 10.1002/emmm.201303147
30. Chen YF, Redetzke RA, Sivertson RM, Coburn TS, Cypher LR, Gerdes AM. Post-myocardial infarction left ventricular myocyte remodeling: are there gender differences in rats? *Cardiovasc Pathol*. 2011;20:e189–e195. doi: 10.1016/j.carpath.2010.09.007
31. Visuri MT, Honkonen KM, Hartiala P, Tervala TV, Halonen PJ, Junkkari H, Knuutinen N, Ylä-Herttua S, Alitalo KK, Saarikko AM. VEGF-C and VEGF-C156S in the pro-lymphangiogenic growth factor therapy of lymphedema: a large animal study. *Angiogenesis*. 2015;18:313–326. doi: 10.1007/s10456-015-9469-2
32. Antila S, Karaman S, Nurmi H, Airavaara M, Voutilainen MH, Mathivet T, Chilov D, Li Z, Koppinen T, Park JH, et al. Development and plasticity of meningeal lymphatic vessels. *J Exp Med*. 2017;214:3645–3667. doi: 10.1084/jem.20170391
33. Anisimov A, Alitalo A, Korpisalo P, Soronen J, Kaijalainen S, Leppänen VM, Jeltsch M, Ylä-Herttua S, Alitalo K. Activated forms of VEGF-C and VEGF-D provide improved vascular function in skeletal muscle. *Circ Res*. 2009;104:1302–1312. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.197830
34. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9:676–682. doi: 10.1038/nmeth.2019
35. Belle M, Godefroy D, Couly G, Malone SA, Collier F, Giacobini P, Chédotal A. Tridimensional Visualization and Analysis of Early Human Development. *Cell*. 2017;169:161–173.e12. doi: 10.1016/j.cell.2017.03.008
36. Barbay V, Houssari M, Mekki M, Banquet S, Edwards-Lévy F, Henry JP, Dumesnil A, Adriouch S, Thuillez C, Richard V, et al. Role of M2-like macrophage recruitment during angiogenic growth factor therapy. *Angiogenesis*. 2015;18:191–200. doi: 10.1007/s10456-014-9456-z
37. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med*. 2007;204:3037–3047. doi: 10.1084/jem.20070885
38. Vieira JM, Norman S, Villa Del Campo C, Cahill TJ, Barnette DN, Gunadasa-Rohling M, Johnson LA, Greaves DR, Carr CA, Jackson DG, et al. The cardiac lymphatic system stimulates resolution of inflammation following myocardial infarction. *J Clin Invest*. 2018;128:3402–3412. doi: 10.1172/JCI97192
39. Rissanen TT, Markkanen JE, Gruchala M, Heikura T, Puranen A, Kettunen MI, Kholová I, Kauppinen RA, Achen MG, Stacker SA, et al. VEGF-D is the strongest angiogenic and lymphangiogenic effector among VEGFs delivered into skeletal muscle via adenoviruses. *Circ Res*. 2003;92:1098–1106. doi: 10.1161/01.RES.0000073584.46059.E3
40. Yang Z, Day YJ, Toufektsian MC, Xu Y, Ramos SI, Marshall MA, French BA, Linden J. Myocardial infarct-sparing effect of adenosine A2A receptor activation is due to its action on CD4+ T lymphocytes. *Circulation*. 2006;114:2056–2064. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.649244
41. Gousopoulos E, Proulx ST, Bachmann SB, Scholl J, Dionysiou D, Demiri E, Halin C, Dieterich LC, Detmar M. Regulatory T cell transfer ameliorates lymphedema and promotes lymphatic vessel function. *JCI Insight*. 2016;1:e89081. doi: 10.1172/jci.insight.89081
42. Weirather J, Hofmann UD, Beyersdorf N, Ramos GC, Vogel B, Frey A, Ertl G, Kerkau T, Frantz S. Foxp3+ CD4+ T cells improve healing after myocardial infarction by modulating monocyte/macrophage differentiation. *Circ Res*. 2014;115:55–67. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.303895
43. Bansal SS, Ismail MA, Goel M, Patel B, Hamid T, Rokosh G, Prabhu SD. Activated T Lymphocytes are Essential Drivers of Pathological Remodeling in Ischemic Heart Failure. *Circ Heart Fail*. 2017;10:e003688. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.116.003688
44. Yoon CM, Hong BS, Moon HG, Lim S, Suh PG, Kim YK, Chae CB, Gho YS. Sphingosine-1-phosphate promotes lymphangiogenesis by stimulating S1P1/Gi/PLC/Ca2+ signaling pathways. *Blood*. 2008;112:1129–1138. doi: 10.1182/blood-2007-11-125203
45. Weichand B, Popp R, Dziubla S, Mora J, Strack E, Elwakeel E, Frank AC, Scholich K, Pierre S, Syed SN, et al. S1PR1 on tumor-associated macrophages promotes lymphangiogenesis and metastasis via NLRP3/IL-1 β . *J Exp Med*. 2017;214:2695–2713. doi: 10.1084/jem.20160392
46. Hofmann U, Hu K, Walter F, Burkard N, Ertl G, Bauersachs J, Ritter O, Frantz S, Bonz A. Pharmacological pre- and post-conditioning with the sphingosine-1-phosphate receptor modulator FTY720 after myocardial ischaemia-reperfusion. *Br J Pharmacol*. 2010;160:1243–1251. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00767.x
47. Zampell JC, Avraham T, Yoder N, Fort N, Yan A, Weitman ES, Mehrara BJ. Lymphatic function is regulated by a coordinated expression of lymphangiogenic and anti-lymphangiogenic cytokines. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012;302:C392–C404. doi: 10.1152/ajpcell.00306.2011
48. Jeltsch M, Jha SK, Tvorogov D, Anisimov A, Leppänen VM, Holopainen T, Kivelä R, Ortega S, Kärpanen T, Alitalo K. CCBE1 enhances lymphangiogenesis via A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs-3-mediated vascular endothelial growth factor-C activation. *Circulation*. 2014;129:1962–1971. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002779
49. Vuorio T, Ylä-Herttua E, Laakkonen JP, Laidinen S, Liimatainen T, Ylä-Herttua S. Downregulation of VEGFR3 signaling alters cardiac lymphatic vessel organization and leads to a higher mortality after acute myocardial infarction. *Sci Rep*. 2018;8:16709. doi: 10.1038/s41598-018-34770-4
50. Fang L, Gao XM, Moore XL, Kiriazis H, Su Y, Ming Z, Lim YL, Dart AM, Du XJ. Differences in inflammation, MMP activation and collagen damage account for gender difference in murine cardiac rupture following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;43:535–544. doi: 10.1016/j.yjmcc.2007.06.011
51. Hajrasouliha AR, Funaki T, Sadrai Z, Hattori T, Chauhan SK, Dana R. Vascular endothelial growth factor-C promotes alloimmunity by amplifying antigen-presenting cell maturation and lymphangiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53:1244–1250. doi: 10.1167/iovs.11-8668
52. Anzai A, Anzai T, Nagai S, Maekawa Y, Naito K, Kaneko H, Sugano Y, Takahashi T, Abe H, Mochizuki S, et al. Regulatory role of dendritic cells in postinfarction healing and left ventricular remodeling. *Circulation*. 2012;125:1234–1245. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.052126
53. Choo EH, Lee JH, Park EH, Park HE, Jung NC, Kim TH, Koh YS, Kim E, Seung KB, Park C, et al. Infarcted Myocardium-Primed Dendritic Cells Improve Remodeling and Cardiac Function After Myocardial Infarction by Modulating the Regulatory T Cell and Macrophage Polarization. *Circulation*. 2017;135:1444–1457. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.023106
54. Van der Borght K, Scott CL, Nindl V, Bouché A, Martens L, Sichien D, Van Moorleghem J, Vanheerswynghe M, De Prijck S, Saey Y, et al. Myocardial Infarction Primes Autoreactive T Cells through Activation of Dendritic Cells. *Cell Rep*. 2017;18:3005–3017. doi: 10.1016/j.celrep.2017.02.079
55. Vaahntomeri K, Karaman S, Mäkinen T, Alitalo K. Lymphangiogenesis guidance by paracrine and pericellular factors. *Genes Dev*. 2017;31:1615–1634. doi: 10.1101/gad.303776.117
56. Trincot CE, Xu W, Zhang H, Kulikauskas MR, Caranasos TG, Jensen BC, Sabine A, Petrova TV, Caron KM. Adrenomedullin Induces Cardiac Lymphangiogenesis After Myocardial Infarction and Regulates Cardiac Edema Via Connexin 43. *Circ Res*. 2019;124:101–113. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313835
57. Tatin F, Renaud-Gabardos E, Godet A-C, Hantelys F, Pujol F, Morfioise F, Calise D, Viars F, Valet P, Masri B, et al. Apelin modulates pathological remodeling of lymphatic endothelium after myocardial infarction. *JCI Insight*. 2017;2(12):93887. doi:10.1172/jci.insight.93887
58. Levick SP, Goldspink PH. Could interferon-gamma be a therapeutic target for treating heart failure? *Heart Fail Rev*. 2014;19:227–236. doi: 10.1007/s10741-013-9393-8

Article de collaboration n°2

Kramer JS, Woltersdorf S, Duflot T, Hiesinger K, Lillich FF, Knöll F, Wittmann SK, Klingler FM, Brunst S, Chaikuad A, Morisseau C, Hammock BD, Buccellati C, Sala A, Rovati GE, Leuillier M, Fraineau S, **Rondeaux J**, Hernandez-Olmos V, Heering J, Merk D, Pogoryelov D, Steinhilber D, Knapp S, Bellien J, Proschak E. Discovery of the First in Vivo Active Inhibitors of the Soluble Epoxide Hydrolase Phosphatase Domain. *J Med Chem.* **2019** Sep 26;62(18):8443-8460. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b00445.

Ce second article s'intéresse à l'époxyde hydrolase soluble (sEH). Cette enzyme est une cible pharmacologique émergente. Elle est bifonctionnelle et présente deux activités catalytiques différentes, situées dans deux domaines distincts. Bien que le rôle physiologique du domaine hydrolase C-terminal soit bien étudié, on connaît peu son activité phosphatase, située dans le domaine phosphatase N-terminal de la sEH (sEH-P). Dans cet article, les auteurs rapportent la découverte et l'optimisation du premier inhibiteur de la sEH-P humaine et de rat qui soit applicable *in vivo*. L'analyse de la structure aux rayons X du domaine phosphatase de sEH complexé avec un inhibiteur donne un aperçu de la base moléculaire de l'inhibition de sEH-P par les petites molécules et aide à rationaliser les relations structure-activité. L'acide 4-(4-(3,4-Dichlorophényl)-5-phényloxazol-2-yl)butanoïque (22b, SWE101) présente un excellent profil pharmacocinétique et pharmacodynamique chez le rat et permet d'étudier le rôle physiologique et physiopathologique de sEH-P *in vivo*.

Mon implication dans ces travaux correspond à la mise en évidence *in vitro* de l'efficacité de cet inhibiteur chez le rat et l'Homme. Plus précisément, j'ai réalisé, à partir de prélèvements sanguins chez le rat ou l'Homme, l'isolement des PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells ou cellules mononuclées du sang), puis leur mise en culture en présence ou non de l'inhibiteur. J'ai ensuite récupéré le surnageant de culture et réalisé l'extraction des ARNm de ces PBMC après 12, 24 ou 48h de culture.

Discovery of the First in Vivo Active Inhibitors of the Soluble Epoxide Hydrolase Phosphatase Domain

Jan S. Kramer,^{†,¶} Stefano Woltersdorf,^{†,¶} Thomas Duflot,^{‡,§} Kerstin Hiesinger,[†] Felix F. Lillich,[†] Felix Knöll,[†] Sandra K. Wittmann,[†] Franca-M. Klingler,[†] Steffen Brunst,[†] Apirat Chaikuad,^{†,§,Ⓛ} Christophe Morisseau,^{||} Bruce D. Hammock,^{||} Carola Buccellati,^{Ⓛ,●} Angelo Sala,^{Ⓛ,●} G. Enrico Rovati,^{Ⓛ,●} Matthieu Leuillier,[#] Sylvain Fraineau,[#] Julie Rondeaux,[#] Victor Hernandez-Olmos,^{†,▽} Jan Heering,^{†,▽} Daniel Merk,^{†,Ⓛ} Denys Pogoryelov,[○] Dieter Steinhilber,[†] Stefan Knapp,^{†,‡,Ⓛ} Jeremy Bellien,^{#,◆} and Ewgenij Proschak^{*,†,Ⓛ}

[†]Institute of Pharmaceutical Chemistry, Goethe-University Frankfurt, Max-von-Laue-Strasse 9, 60438 Frankfurt am Main, Germany

[‡]Laboratory of Pharmacokinetics, Toxicology and Pharmacogenetics, Rouen University Hospital, 76000 Rouen, France

[§]Structural Genomics Consortium, Buchmann Institute for Life Sciences, Goethe-University Frankfurt, Max-von-Laue-Strasse 15, 60438 Frankfurt am Main, Germany

^{||}Department of Entomology and Nematology and UC Davis Comprehensive Cancer Center, University of California Davis, Davis, California 95616, United States

[Ⓛ]Department of Pharmacological and Biomolecular Sciences, University of Milan, Via Balzaretti 9, 20133 Milan, Italy

[#]Normandie Université, UNIROUEN, INSERM U1096, 1 rue de Germont, 76000 Rouen, France

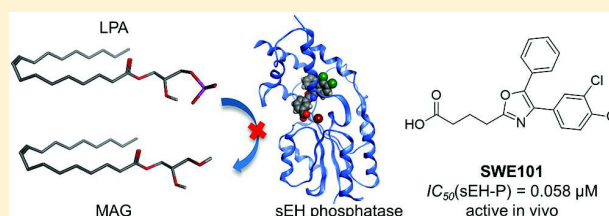
[▽]Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology IME, Branch for Translational Medicine and Pharmacology TMP, Theodor-Stern-Kai 7, 60596 Frankfurt am Main, Germany

[○]Institute of Biochemistry, Goethe-University Frankfurt, Max-von-Laue-Strasse 9, 60438 Frankfurt am Main, Germany

[◆]Department of Clinical Pharmacology, Rouen University Hospital, 76000 Rouen, France

Supporting Information

ABSTRACT: The emerging pharmacological target soluble epoxide hydrolase (sEH) is a bifunctional enzyme exhibiting two different catalytic activities that are located in two distinct domains. Although the physiological role of the C-terminal hydrolase domain is well-investigated, little is known about its phosphatase activity, located in the N-terminal phosphatase domain of sEH (sEH-P). Herein we report the discovery and optimization of the first inhibitor of human and rat sEH-P that is applicable in vivo. X-ray structure analysis of the sEH phosphatase domain complexed with an inhibitor provides insights in the molecular basis of small-molecule sEH-P inhibition and helps to rationalize the structure–activity relationships. 4-(4-(3,4-Dichlorophenyl)-5-phenyloxazol-2-yl)butanoic acid (**22b**, SWE101) has an excellent pharmacokinetic and pharmacodynamic profile in rats and enables the investigation of the physiological and pathophysiological role of sEH-P in vivo.



INTRODUCTION

Homodimeric soluble epoxide hydrolase (sEH) consists of two functionally different domains that are connected by a flexible proline-rich linker.¹ The C-terminal domain catalyzes the conversion of epoxyeicosatrienoic acids (EETs) and related epoxy fatty acids (EpFAs) to the corresponding α,β -diols. The role of this hydrolase activity of sEH is well-studied, and inhibitors of the C-terminal domain (sEHIs) hold promising therapeutic potential for various diseases, including diabetes, fibrosis, chronic pain, and cardiovascular and neurodegenerative diseases.² The very broad therapeutic scope of sEHIs is based on the hypothesis that while an accumulation of EpFAs has no or little effect under physiological conditions, they can

prevent mitochondrial dysfunction and reduce subsequent reactive oxygen species (ROS) formation and endoplasmic reticulum stress conditions.³ Accordingly, sEHIs targeting the hydrolase domain are in the focus of drug discovery, and two candidates have already reached clinical development.^{2,4}

In contrast to the well-understood function of the C-terminal hydrolase domain, the role of the N-terminal phosphatase domain remains unclear. In 2003, Cronin et al.⁵ and Newman et al.⁶ independently reported the phosphatase activity of the N-terminal domain of sEH (sEH-P). In vitro,

Received: March 14, 2019

Published: August 22, 2019

sEH-P is able to hydrolyze diverse lipid phosphates, including farnesyl pyrophosphate,⁷ sphingosine-1-phosphate, and lysophosphatidic acid.^{8,9} The mechanism of lipid phosphate hydrolysis is well-investigated.¹⁰ However, neither the endogenous substrate nor its physiological and possibly pathophysiological role have yet been identified.¹¹ Several molecules with sEH-P inhibitory activity have been identified to date (Figure 1). Sodium dodecyl sulfate (**1**, SDS)⁷ and *N*-

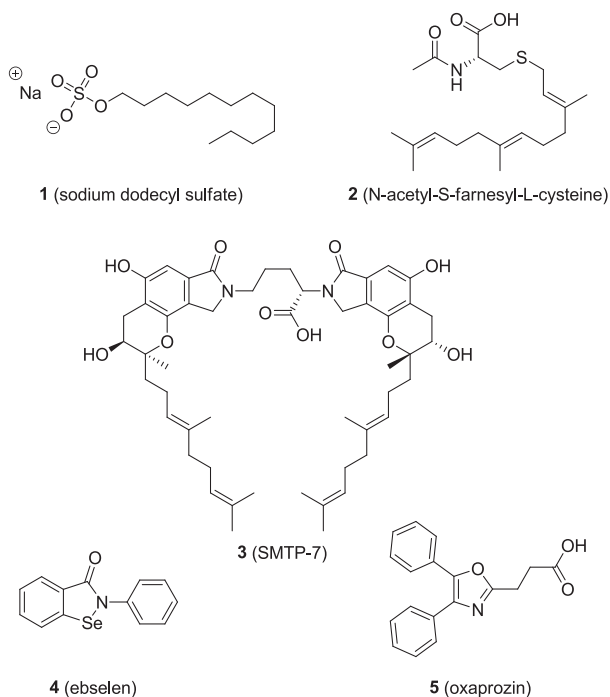


Figure 1. Structures of previously identified sEH-P inhibitors 1–5.

acetyl-S-farnesyl-L-cysteine (**2**)^{12,13} are lipid-like inhibitors of sEH-P. SMTP-7 (**3**) is an investigational thrombolytic drug for treatment of ischemic stroke that simultaneously inhibits both the hydrolase and phosphatase activities of sEH.¹⁴ The development of high-throughput screening assays for sEH-P led to the discovery of ebselen (**4**)¹⁵ and oxaprozin (**5**)¹⁶ as novel sEH-P inhibitors. While **4** also affects the sEH hydrolase activity, **5** is a selective but weak inhibitor of sEH-P ($IC_{50} = 5 \mu M$). In this study, we investigated the structure–activity relationships (SARs) of oxazole-based sEH-P inhibitors using the nonsteroidal antiarthritic drug **5** as a starting point.

RESULTS AND DISCUSSION

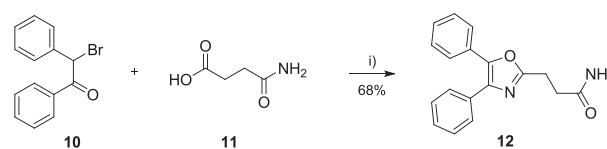
Chemistry. The 2,4,5-trisubstituted oxazole scaffold of compound **5** is accessible via Blümlein–Lewy synthesis or

starting from α -acyloxy ketones. In both methods, an α -bromodeoxybenzoin or benzoin derivative can be employed as the starting material to generate the heterocycle. However, crossed benzoin derivatives with two different aryl moieties are not easily accessible, whereas asymmetric deoxybenzoin can be obtained from O-protected cyanohydrins, as reported by Stork et al.,¹⁷ and are subsequently converted into α -bromoketones. This approach allows very flexible alteration of the oxazole scaffold at all three substituent positions and enables a comprehensive SAR analysis.

To investigate the importance of the carbon in the alkyl linker of **5**, thioglycolic acid derivative **9** was synthesized in two steps via the reaction of 4,5-diphenyloxazole-2-thiol (**6**) and methyl 2-bromoacetate (**7**) to give methyl ester **8**, which was subsequently hydrolyzed (Scheme 1).

Amide derivative **12** was obtained from the reaction of commercially available α -bromodeoxybenzoin (**10**) and succinic acid (**11**) under basic conditions to afford an α -acyloxy ketone, which under heating in acetic acid in the presence of excess of ammonium acetate cyclized to give oxazole **12** (Scheme 2).

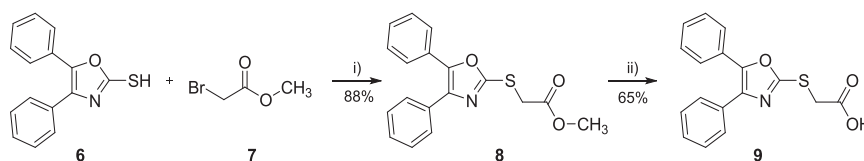
Scheme 2^a



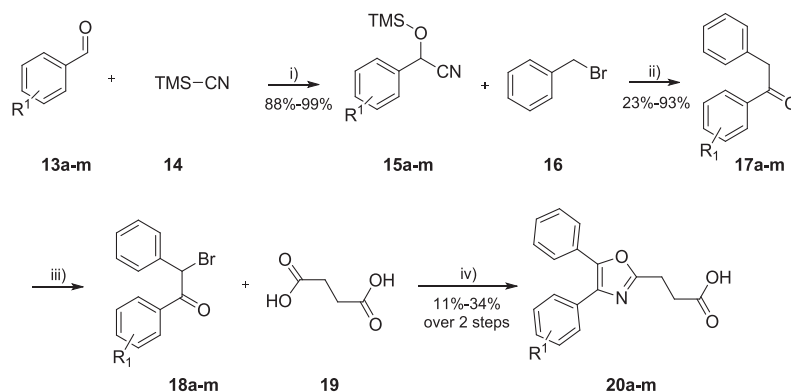
^aReagents and conditions: (i) 1. Et₃N, acetonitrile, 45 °C, 6 h; 2. NH₄OAc, AcOH, reflux, 3 h.

The synthesis of oxaprozin derivatives **20a–m**, with alterations in the 4-phenyl moiety of the oxazole core structure, started from benzaldehydes **13a–m**, as shown in Scheme 3. The substitution strategy followed the Topliss optimization scheme.¹⁸ Benzaldehydes **13a–m** were treated with trimethylsilyl cyanide (TMSCN, **14**) in the presence of a catalytic amount of triethylamine under neat conditions to yield silyl-protected cyanohydrins **15a–m**. As described by Stork et al.,¹⁷ O-protected cyanohydrins are easily deprotonated at the α -position by LDA in THF to obtain stable nucleophiles at low temperatures, which can react with an electrophile, in this case benzyl bromide (**16**). The desired deoxybenzoin **17a–m** were subsequently obtained by cleaving the remaining silyl ether group of the intermediate with tetrabutylammonium fluoride (TBAF) solution. Deoxybenzoin derivatives **17a–m** were then transformed to the appropriate α -bromodeoxybenzoin **18a–m** under heating with bromine in dichloromethane. The respective α -bromodeoxybenzoin **18a–m** were subsequently reacted with succinic acid (**19**) under basic conditions to

Scheme 1^a



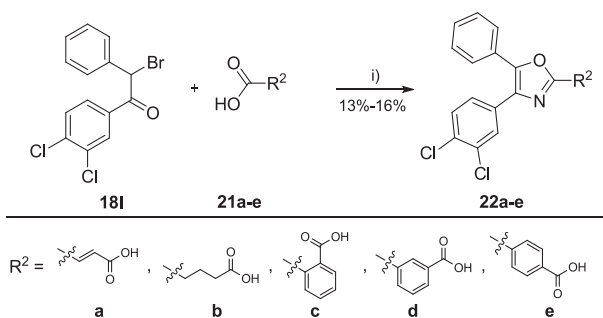
^aReagents and conditions: (i) Et₃N, THF, rt, 24 h; (ii) KOH, MeOH/H₂O/THF, 70 °C, 15 min μw .

Scheme 3^a

^aReagents and conditions: (i) Et₃N, 24 h; (ii) 1. LDA, THF, -78 °C → rt, 24 h; 2. TBAF, 30 min; (iii) Br₂, CHCl₃, reflux, 2 h; (iv) 1. Et₃N, MeCN, 45 °C, 6 h; 2. NH₄OAc, AcOH, reflux, 3 h.

produce α -acyloxy ketones, which under heating in acetic acid in the presence of excess of ammonium acetate yielded oxaprozin derivatives **20a–m**.

The synthesis of oxaprozin derivatives **22a–e** with alterations of the oxazole 2-substituent is depicted in Scheme 4. Starting from intermediate **18l**, **22a–e** were obtained by the

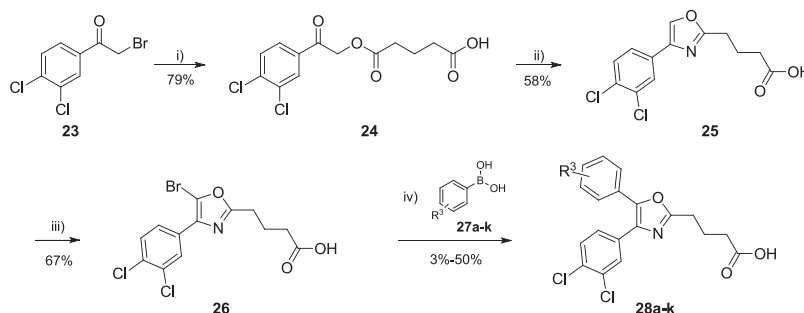
Scheme 4^a

^aReagents and conditions: (i) 1. **21a–e**, Et₃N, MeCN, 45 °C, 6 h; 2. NH₄OAc, AcOH, reflux, 3 h.

same strategy as described above for oxaprozin derivatives **20a–m** using dicarboxylic acids **21a–e** with different lengths and rigidities.

For alteration of the 5-phenyl moiety of the oxazole ring, a different synthetic approach was chosen to reduce the synthetic effort. The adjusted strategy (Scheme 5) employed the reaction of 3,4-dichlorophenylacetyl bromide (**23**) and glutaric acid (**21b**) under basic conditions to obtain α -acyloxy ketone **24**, which in turn reacted under heating in BF₃·Et₂O in the presence of excess acetamide to form oxazole **25**. The oxazole 5-position was then activated for the subsequent Suzuki cross-coupling by the introduction of bromine using NBS in acetonitrile, yielding key intermediate **26** for final modifications. Oxazole **26** was successfully coupled with the appropriate boronic acid derivatives **27a–k** in DMF/water with tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) as the catalyst and potassium phosphate as the base to afford oxaprozin derivatives **28a–k**.

Structure–Activity Relationships. The exploration of the SARs of substituted oxazoles was performed using a fluorescence-based enzyme activity assay as reported previously.¹⁶ In this kinetic assay, the conversion of the fluorogenic substrate fluorescein diphosphate (FDP) by the recombinant sEH-P domain is monitored to assess the inhibitory potency of the test compounds. Bioisosteric replacement of the β -methylene bridge by sulfur (**9**) slightly diminished the potency, while replacement of the carboxylate by a primary amide (**12**) resulted in complete loss of activity

Scheme 5^a

^aReagents and conditions: (i) **21b**, Et₃N, acetone, TLC control; (ii) acetamide, BF₃·Et₂O, 140 °C, 30 h; (iii) NH₄OAc, NBS, acetonitrile, rt, 1.5 h; (iv) **27a–k**, K₃PO₄, 2:1 DMF/H₂O, Pd(PPh₃)₄, 55–80 °C, 30–48 h.

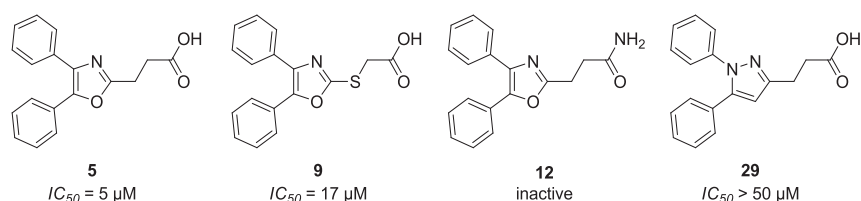


Figure 2. Initial diversification of 5.

(Figure 2). Replacement of the oxazole core by a pyrazole core (29) was also not tolerated.

The next optimization round addressed the 4-position of the oxazole ring (Table 1). Ortho-substituted phenyl moieties (as

Table 1. Optimization of the 4-Position of the Oxazole Core

Cpd	R	IC ₅₀ [μM]	Cpd	R	IC ₅₀ [μM]
5		5 ± 1	20g		44 ± 5
20a		40 ± 12	20h		3 ± 1
20b		33 ± 7	20i		18 ± 3
20c		10 ± 1	20j		2 ± 1
20d		7 ± 1	20k		0.12 ± 0.06
20e		9 ± 1	20l		17 ± 2
20f		33 ± 7	20m		9 ± 2

present in compounds 20a and 20b) were poorly tolerated, while meta-substituted phenyl residues (20c and 20d) retained similar potency as 5. The SAR of para-substituted phenyl residues at the 4-position of the oxazole core was more sophisticated. While fluorine (20e) only slightly diminished the potency, larger electron-withdrawing moieties such as trifluoromethyl (20f) and nitrile (20g) led to a loss of activity. A chlorine substituent at this position (20h) slightly enhanced inhibitory potency, while an electron-releasing methoxy moiety (20i) decreased the activity. Following the Topliss optimization scheme,¹⁸ a second chlorine substituent was introduced at the meta position of the phenyl ring (20k), which led to a more than 10-fold increase in sEH-P inhibition. Other variants

of the chlorine substitution pattern (20l and 20m) did not lead to potency improvement.

We then addressed optimization of the oxazole 2-position to adjust the interactions of the important carboxylate moiety (Table 2). While rigidization of the flexible ethyl linker by a

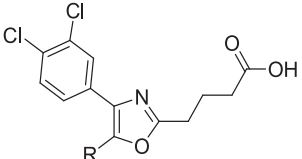
Table 2. Optimization of the Linker at the 2-Position of the Oxazole Core













Cpd	R	IC ₅₀ [μM]
20k		0.12 ± 0.06
22a		0.51 ± 0.08
22b		0.058 ± 0.005
22c		15 ± 1
22d		0.15 ± 0.04
22e		12 ± 2

double bond resulted in a 2-fold loss of potency (22a), the introduction of an additional methylene (22b) further improved the inhibitory activity. Replacement of the propyl bridge by a rigid phenyl linker (22d) demonstrated that optimal interactions of the carboxylate are achieved at a distance of four bonds from the oxazole core. The conformationally restrained ortho- and para-substituted benzoic acids did not retain this high potency (22c and 22e).

Finally, the impact of the phenyl substituent at the 5-position of the oxazole was investigated while the 3,4-dichlorophenyl substituent at the 4-position and the propionic acid at the 2-position were maintained (Table 3). When the phenyl substituent was omitted, the potency dropped dramatically (25), but it was partially restored by introduction of a bromine substituent (26). Pyridine moieties were not favored (28a and 28b), while almost every substituent at the ortho or meta position was well-tolerated, with a slight preference for fluorine (compound 28e) or linear substituents such as nitrile (28g) or ethynyl (28j). However, no further

Table 3. Optimization of the 5-Position of the Oxazole Core



Cpd	R	IC ₅₀ [μM]	Cpd	R	IC ₅₀ [μM]
25	H	>50	28e		0.12 ± 0.02
26	Br	3 ± 1	28f		0.31 ± 0.05
22b		0.058 ± 0.005	28g		0.12 ± 0.01
28a		20 ± 1	28h		0.41 ± 0.19
28b		4 ± 1	28i		0.31 ± 0.04
28c		0.31 ± 0.04	28j		0.14 ± 0.01
28d		0.28 ± 0.01	28k		0.23 ± 0.11

potency improvement over **22b** and **22d** was achieved, rendering these oxaprozin derivatives as the most active sEH-P inhibitors for further characterization.

In Vitro Characterization of 22b and 22d. To verify the binding of the most potent compound, **22b**, to sEH-P, orthogonal biophysical assays were performed. Differential scanning fluorimetry (DSF), also known as the thermal shift assay, was conducted with the N-terminal domain and the C-terminal domain of sEH. The N-terminal domain was stabilized by **22b**, while the reference inhibitor of the sEH hydrolase activity, *N*-cyclohexyl-*N'*-(4-iodophenyl)urea (CIU),¹⁹ had no stabilizing effect on the phosphatase domain (Figure 3A). A full list of the DSF experiments with additional reference inhibitors is included in the Supporting Information. In contrast, **22b** did not stabilize the C-terminal domain, whose melting point was, however, significantly increased by CIU (Figure 3B). Isothermal titration calorimetry revealed tight binding of **22b** to the N-terminal domain of sEH with a K_d value of 0.3 μM (Figure 3C). Analysis of the thermodynamic properties of binding revealed balanced enthalpic and entropic contributions to the binding free energy (Figure 3C inset).

Compound **5** (oxaprozin) is an approved nonselective inhibitor of cyclooxygenases 1 and 2. Therefore, the inhibitory potency of **22b** toward cyclooxygenases was investigated (Table 4). **22b** exhibited slightly lower potency toward both cyclooxygenase isoforms compared with **5**, which inhibits COX-1 with an IC₅₀ of 0.74 μM (29% CV) and COX-2 with an IC₅₀ of 0.11 μM (38% CV). Furthermore, agonistic potency

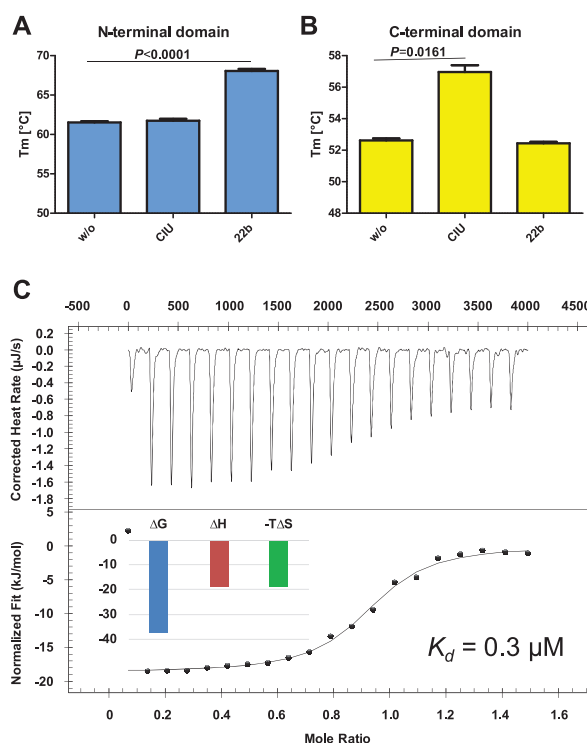


Figure 3. Biophysical characterization of **22b**. (A) **22b** stabilized the N-terminal domain of sEH in the differential scanning fluorimetry (DSF) assay, but the sEH hydrolase inhibitor CIU did not. (B) **22b** did not stabilize the C-terminal domain of sEH, in contrast to CIU. The concentration of the inhibitors in the DSF experiments was 50 μM. The statistical significance of the measured melting points compared with the DMSO control was determined by a two-tailed *t* test using GraphPad Prism (version 7.05; GraphPad Software, Inc.). (C) ITC measurements of the formation of the complex between **22b** and the sEH N-terminal domain. Shown are (top) raw binding heats of each injection and (bottom) normalized binding heats fitted to a single binding site model (solid line). The thermodynamic parameters of this titration experiment are shown in the inset.

Table 4. Selectivity Screen of **22b** and Oxaprozin (**5**) toward Diverse Targets of Fatty Acid Mimetics^a

target	effect	
	22b	5
COX-1	IC ₅₀ = 1.2 μM (20% CV)	IC ₅₀ = 0.74 μM (29% CV)
COX-2	IC ₅₀ = 0.42 μM (9.6% CV)	IC ₅₀ = 0.11 μM (38% CV)
PPARα	inactive at 10 μM	inactive at 10 μM
PPARβ/δ	inactive at 10 μM	inactive at 10 μM
PPARγ	29 ± 1% at 10 μM	inactive at 10 μM
FXR	inactive at 10 μM	inactive at 10 μM
LXRα	inactive at 10 μM	inactive at 10 μM
LXRβ	inactive at 10 μM	inactive at 10 μM
RXRα	77 ± 2% at 10 μM	14.4 ± 0.4% at 10 μM

^aAll values were measured at least twice as duplicates ($n \geq 2$). Values for nuclear receptors are mean ± SD% transactivation of the reference agonist; "inactive" denotes no statistically significant reporter transactivation at the indicated concentration.

toward peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARγ) and retinoid X receptor alpha (RXRα) was observed,

which needs to be considered when using **22b** in cellular assays.

In order to understand the structural basis of sEH-P inhibition by oxazole-based compounds, experiments involving cocrystallization of the sEH-P domain with oxazole inhibitors **22b** and **22d** were performed. While the most affine inhibitor **22b** did not yield crystals, **22d** cocrystallized with sEH-P. Figure 4A shows the N-terminal domain with the bound

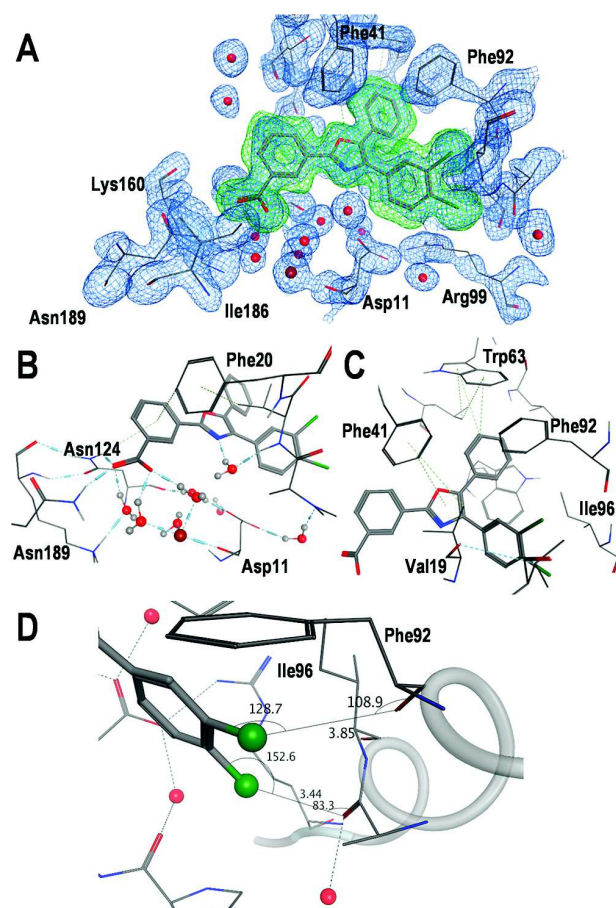


Figure 4. X-ray structure of **22d** in complex with the N-terminal domain of sEH (PDB code 5MWA). (A) $2F_o - F_c$ electron density map at 1σ of **22d** in the binding pocket (blue mesh) and the polder omit map at 3σ (green mesh). (B) Interactions of the carboxylate headgroup with the Mg^{2+} ion mediated by water molecules. (C) Hydrophobic interaction of the phenyl residues. (D) Interactions of the chlorine substituents with backbone carbonyl atoms.

compound **22d**, while Figure 4B and Figure 4C show details of the inhibitor interaction. The main interaction of **22d** with the protein is mediated by its carboxyl group, which forms hydrogen bonds with residues Asn124 and Asn189 as well as three water molecules. Two of these water molecules are tightly coordinated by a magnesium ion that is present in the

active site. In addition, the nitrogen of the oxazole ring forms a water-mediated hydrogen bond with the backbone NH of Val19. The aromatic oxazole system exhibits aromatic edge-to-face interactions with the side chain of Phe41. The phenyl substituents fit tightly into deeply buried hydrophobic pockets. Figure 4C shows that the phenyl substituent at the 5-position of the oxazole core of the inhibitor is in close proximity to the amino acids Trp126, Phe92, Leu60, Trp63, Leu53, and Phe41, which constitute the most hydrophobic surface area of the binding site. Furthermore, these residues belong to a region in the structure where the most prominent structural changes upon inhibitor binding were observed. The environment around the 3,5-dichlorophenyl group at the 4-position of the oxazole core comprises three hydrophobic amino acids (Ile96, Val19, and Trp126) in close proximity to this ring system. Here the importance of the chlorine substituents can be explained by contacts toward backbone carbonyl oxygens of Phe92 and Ile 96, comparable to ones observed by Heroven et al.²⁰ and Falke et al.²¹ (Figure 4D). The phenyl ring at the 2-position of the oxazole core carrying the carboxyl group is positioned in close proximity to the entrance of the active site. The amino acids Phe20, Phe41, Val19, and Thr50 shield one side of the phenyl ring, while the other side is mainly solvent-exposed.

In order to investigate the applicability of **22b** in typical model organisms in vivo, the inhibitory potencies against full-length (fl) human, mouse, and rat sEH were compared (Table 5). **22b** inhibited the phosphatase activity of the full-length human enzyme, but its potency was significantly decreased compared with that for the isolated N-terminal domain. Furthermore, the sEH-H activity was also affected, showing an IC_{50} of about $9 \mu M$. Most strikingly, **22b** did not inhibit either the hydrolase or phosphatase activity of mouse sEH, while rat sEH-P was selectively impaired.

In order to explain the lack of activity against mouse sEH, residues in close proximity to the inhibitor in the enzyme were investigated. Five amino acids that differed in the human and mouse enzymes were identified, namely, Val19Ile, Phe20Ala, Phe41Tyr, Leu60Phe, and Ile96Met. The rat protein features the same sequence changes as mouse protein except for Phe41, which remains unchanged in the rat protein compared to human sEH. To investigate the influence of these five sequence changes on inhibitor binding, in silico mutagenesis of the sEH-P complex structure was performed using the MOE software suite. Figure 5 shows the influence of the mutations on the shape of the binding site. We identified Phe41Tyr as the most significant difference between the human and mouse enzymes, while Leu60Phe might also have a slight influence on the inhibitor binding. The reason for the prominent effect of the Phe41Tyr mutation on inhibitor binding is the addition of the hydroxyl group, which collides with the oxazole core of **22d**, efficiently blocking the inhibitor binding. Phe41 is not altered in rat sEH, which supports the model shown in Figure 5.

Structural analysis of the binding of **22d** to sEH-P suggests a possible explanation of the pronounced difference between

Table 5. Inhibitory Activities of Oxaprozin (**5**) and **22b** against sEH Enzymes from Different Species

	human fl sEH		mouse fl sEH		rat fl sEH	
	sEH-H	sEH-P	sEH-H	sEH-P	sEH-H	sEH-P
5 IC_{50} (μM)	>300	70.0 ± 3.0	>300	35.5 ± 5.8	>300	62.5 ± 1.9
22b IC_{50} (μM)	9.5 ± 0.5	4 ± 1	>30	>30	>30	2.8 ± 2.2

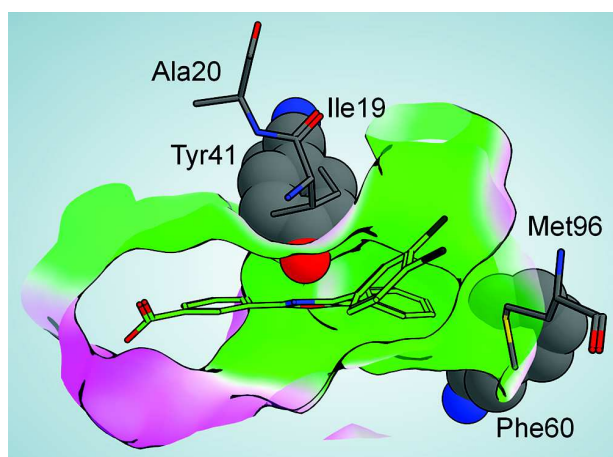


Figure 5. Analysis of sequence changes in different species and their implications for inhibitor potency. The crystal structure of the human sEH-P was used to calculate the surface of the receptor binding site (with hydrophobic and hydrophilic areas shown in green and pink, respectively) with the bound inhibitor **22d**. In addition, the five amino acids in the binding pocket that differ between human and mouse sEH were mutated in silico and are shown in the picture. The two most significant changes, Tyr41 and Phe60, are shown in the space-filling representation.

inhibition of the full-length enzyme and the isolated sEH-P domain. Although the structure was refined at high resolution (1.55 Å), the positions of amino acids 74–84 and 131–138 could not be determined because of disorder, resulting in a lack of interpretable electron density in these regions. A comparison of the crystal structure with the crystallized full-length protein revealed that the areas that were not modeled in our structure have quite high B-factors in full length sEH (PDB code SALU).²² Additionally, the protein sequences of the human and mouse enzymes show high sequence variability in the areas 82–88 and 89–100 as well as 130–146. Comparison with one of the published full-length sEH crystal structures (PDB code SALU)²² showed that binding of the inhibitor led to a prominent induced fit in the binding site (Figure 6A). The phenyl ring at the 5-position of the oxazole core pushes Leu60 and Trp126 toward the interface between the N-terminal and C-terminal domains. This leads to movement of the interacting residues Asp128 and Arg130. These structural changes lead to shifts in residues Met145, His146, and Glu142, which are in contact with the interface between the N-terminal and C-terminal domains (Figure 6B,C).

The structural data suggest that there is a probability that the C-terminal domain hinders the binding of **22d** to the N-terminal domain in the context of the full-length enzyme. Therefore, we performed kinetic experiments to validate the mode of inhibition and determine the K_i of **22b** toward the isolated N-terminal domain and full-length sEH (Figure 7). We used DiFMUP, an sEH-P substrate with only one phosphate moiety, as a substrate and determined K_M values of 219.9 μM for the isolated N-terminal domain and 628.5 μM for full-length sEH. We were able to demonstrate that **22b** is a competitive inhibitor under both conditions tested. We determined K_i values of 0.05 μM for the isolated N-terminal domain and 4.8 μM for full-length sEH, in agreement with the discrepancy we observed for the IC_{50} values using FDP as the substrate.

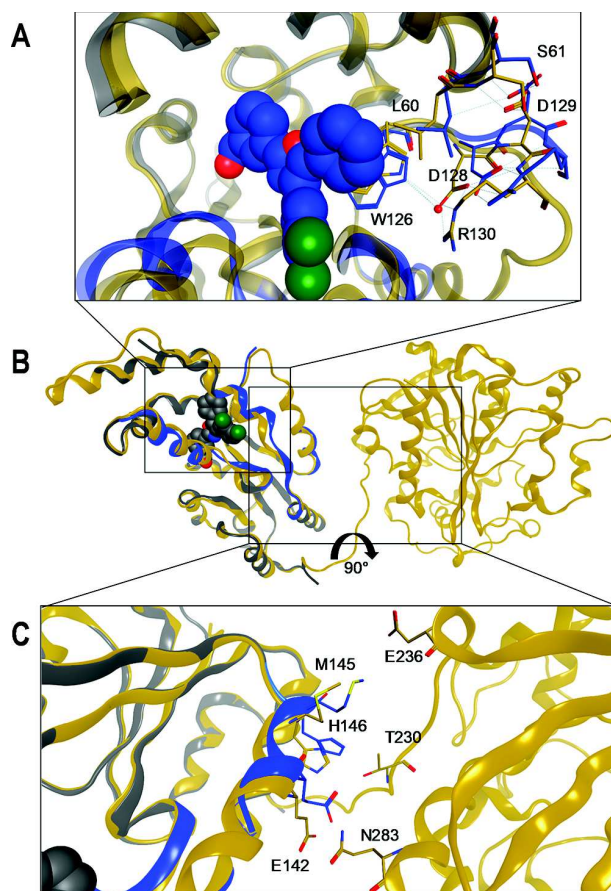


Figure 6. Induced-fit binding of **22d** to the N-terminal domain leads to structural distortion of the interface with the C-terminal domain. (A) Binding site of **22d**. (B) Global view of the superposed proteins (PDB codes SMWA and SALU). (C) Interface between the N-terminal and C-terminal domains.

Because of the decreased activity of **22b** against full length sEH-P compared with the isolated N-terminal domain as well as its inhibitory activity against sEH-H in the full-length enzyme (Table 5), we also evaluated and compared the inhibitory behaviors of previously published sEH-P inhibitors. Initial DSF experiments showed that only compounds **2** and **22b** are able to stabilize the N-terminal domain of sEH (Table 6; also see the Supporting Information). SDS (**1**) displays inhibitory potency against N-terminal and full-length sEH-P while leaving sEH-H almost unaffected. *N*-Acetyl-*S*-farnesyl-L-cysteine (**2**) potentially inhibits the phosphatase activity of the single N-terminal domain and full-length sEH without affecting the hydrolase activity. In contrast, ebselen (**4**) potentially and unselectively inhibits the activities of both separated sEH domains and the full-length enzyme. **22b** is the most potent inhibitor of the phosphatase activity of the N-terminal domain. However, as mentioned above, the activity toward full-length sEH-P is markedly reduced, and in the full-length protein, both domains are inhibited with similar IC_{50} values (Table 6). These results were surprising because the initial screening hit oxaprozin (**5**) inhibited the N-terminal domain while leaving the sEH-H unaffected.¹⁶ Taken together, these results show that the weak activity of current inhibitors limits their applications as chemical probes in cellular assay systems and that interspecies differences in the sEH-P active site need to be

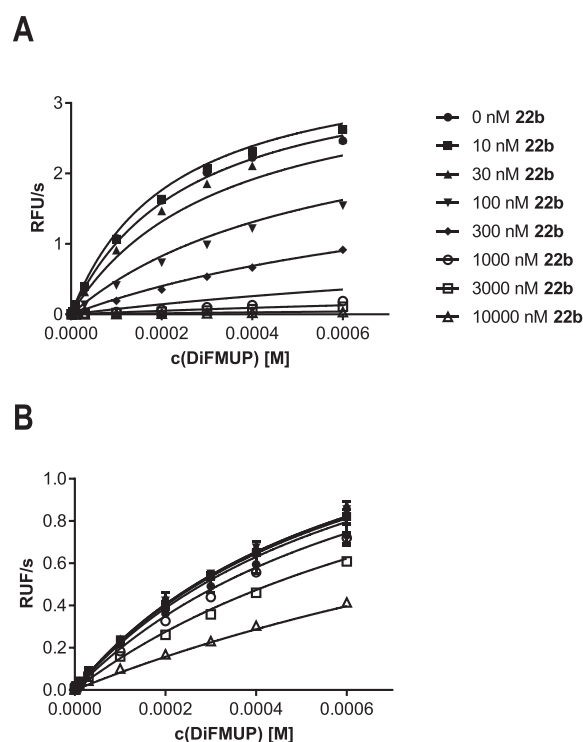


Figure 7. Determination of K_i for **22b** on (A) the isolated sEH-P domain and (B) full-length sEH by a mixed-model inhibition fit in GraphPad Prism (version 7.05).

considered in murine model systems. Furthermore, reported post-translational modifications of sEH by nitration²³ or phosphorylation¹² might also influence inhibitor binding.

In order to characterize **22b** as a suitable inhibitor to study the role of sEH-P in vivo, a pharmacokinetic/pharmacodynamic study was conducted. After acute administration of 30 mg/kg p.o. to male Sprague-Dawley (SD) rats, the evolution of the plasma concentration of **22b** was monitored over 8 h. **22b** displayed excellent exposure, reaching a maximum concentration of 48 $\mu\text{g/mL}$ (128 μM) and a calculated plasma half-life of 7 h (Figure 8A). Despite the inhibition of the conversion of the artificial fluorogenic substrate PHOME by sEH-H observed in vitro (Table 6), treatment with **22b** did not influence the ratio of the main epoxy fatty acids metabolized by sEH-H to their respective diols, as quantified in rat plasma by LC-MS/MS (Figure 8B). However, the ratios of different monoacylglycerols (MAGs) to the corresponding lysophosphatidic acids (LPAs) were significantly shifted toward the LPA species, as expected (Figure 8C). This is a strong indication that the role of sEH-P is determined by the degradation of different LPAs, as suggested in two independent

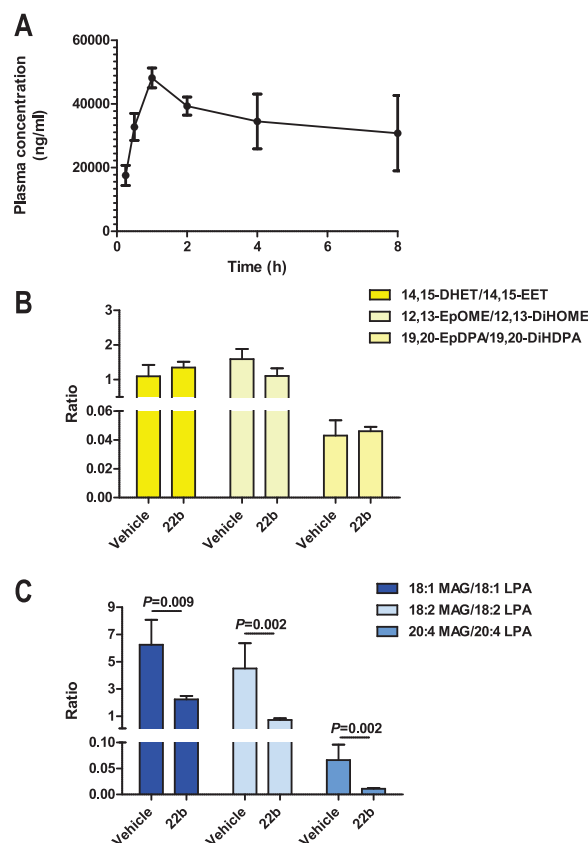


Figure 8. In vivo studies of **22b** in male SD rats. (A) Evolution of the plasma concentration of **22b** after acute administration of 30 mg/kg p.o. in SD rats ($n = 3$) with a peak concentration (C_{max}) of 128 μM . (B) Ratios of the epoxy fatty acids 14,15-epoxyeicosatrienoic acid (14,15-EET), 12,13-epoxyoctadecenoic acid (12,13-EpOME), and 19,20-epoxydocosapentaenoic acid (19,20-EpDPA) to their respective diols 14,15-dihydroxyeicosatrienoic acid (14,15-DHET), 12,13-dihydroxyoctadecenoic acid (12,13-DiHOME), and 19,20-dihydroxydocosapentaenoic acid (19,20-DiDPA) as quantified in rat plasma 8 h after acute oral administration of **22b** or vehicle ($n = 3$ per group). (C) Ratios of 1-oleyl lysophosphatidic acid (sn1-18:1 LPA), 1-linoleyl LPA (sn1-18:2 LPA), and 1-arachidonoyl LPA (sn1-20:4 LPA) to their corresponding monoacylglycerol (MAG) species for **22b** and vehicle 8 h after administration as quantified in rat plasma ($n = 3$ per group).

studies by Morisseau⁸ and Oguro.⁹ In order to confirm that the results we obtained in vivo are transferable to a human system, we incubated human peripheral blood mononuclear cells (PMBCs) with 30 μM **22b**. In this system we also observed a reduction of the MAG/LPA ratio (Figure S2). Still, properly chosen control substances are required for use of **22b** in

Table 6. DSF Experiments with the Isolated sEH N-Terminal Domain and Inhibitory Activities of sEH-P Inhibitors against the Isolated Human sEH Domains and Full-Length Human sEH Enzyme

compd	sEH-P DSF ($^{\circ}\text{C}$)	sEH-H IC_{50} (μM)	sEH-P IC_{50} (μM)	fl sEH-H IC_{50} (μM)	fl sEH-P IC_{50} (μM)
1	-0.6 ± 1.8	101 ± 22	2.3 ± 0.2	>300	5.5 ± 0.4
2	3.4 ± 0.7	>300	0.55 ± 0.01	>300	2.04 ± 0.13
4	n.d.	0.11 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.42 ± 0.03
22b	6.6 ± 0.8	12 ± 1	0.058 ± 0.005	9.5 ± 0.5	4 ± 1

cellular and in vivo experiments because of its residual activity toward COX enzymes and some nuclear receptors (Table 4).

CONCLUSIONS

In this study, we have reported the optimization of oxazole-based ligands of the N-terminal domain of sEH. The structure–activity relationships revealed an important role of the 3,4-dichlorophenyl substituent at the 4-position of the oxazole core. Optimization led to the identification of **22b** and **22d** as potent inhibitors of the sEH-P activity in vitro. The reported X-ray structure of the potent ligand **22d** bound to the sEH-P domain provided first insights into inhibitor binding to sEH-P. A prominent induced fit upon inhibitor binding was observed. Significant interspecies differences in the sEH-P active site that need to be considered when using sEH-P inhibitors can be rationalized by the X-ray structure. In vivo studies confirmed that **22b** is active in rats with favorable pharmacokinetics and revealed the involvement of sEH-P in LPA hydrolysis. Hence, this study has reported the first in vivo active inhibitor to study the elusive physiological and pathophysiological role of sEH-P.

EXPERIMENTAL SECTION

Chemistry Materials and General Procedures. All of the solvents and chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Munich, Germany), Acros Organics (Geel, Belgium), Alfa-Aesar GmbH & Co KG (Karlsruhe, Germany), TCI Europe (Zwijndrecht, Belgium), or Apollo Scientific Ltd. (Manchester, England) and used without further purification. Analytical thin-layer chromatography (TLC) was performed with F254 TLC plates (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) visualized with ultraviolet light (254 nm). Column chromatography was performed with technical-grade solvent mixtures specified in the corresponding experiments with Fluka silica gel 60 (230–400 mesh ASTM). ^1H NMR spectra were recorded on a DPX 250 (250 MHz) or AV300 (300 MHz) spectrometer (Bruker, Karlsruhe, Germany). ^1H NMR data are reported in the following order: chemical shift (δ) in parts per million downfield relative to tetramethylsilane (internal reference nondeuterated solvent); multiplicity (br, broad; s, singlet; d, doublet; dd, doublet of doublets; t, triplet; q, quadruplet; m, multiplet); number of protons; approximate coupling constant (J) in hertz. ^{13}C NMR spectra were recorded on an AV300 (75 MHz) or AV500 (125 MHz) spectrometer (Bruker). HPLC and mass analyses were performed on a LCMS 2020 system (Shimadzu, Duisburg, Germany) with a MultoHigh UC column (50 mm \times 2 mm) from CS Chromatography-Service GmbH (Langerwehe, Germany) or a Luna 10 μ C18(2) 100A column (250 mm \times 4.60 mm) for analytical purposes and a Luna 10 μ C18(2) (250 mm \times 21.20 mm) column for preparative purposes from Phenomenex LTD Deutschland (Aschaffenburg, Germany). Conditions were as follows: acetonitrile/0.1% aqueous formic acid as the eluent at a flow rate of 0.5 mL/min (UPLC), 0.1 mL/min (Scout column), or 21 mL/min (semi-preparative) at room temperature. UV absorption was monitored at 254 and 280 nm, while the electrospray ionization (ESI) detector produced positive ion (+) as well as negative ion (–) spectra. The purities of all final compounds were 95% or higher as determined by HPLC using the following method (except in the case of compound **9**): gradient of 50% to 10% acetonitrile over 10 min and then holding at 10% acetonitrile for another 10 min. Compound **9** was monitored with an isocratic method with 50% acetonitrile. Integrated peaks of the chromatogram at $\lambda = 254$ and 280 nm were used to define the purity. MALDI-HRMS was performed on a MALDI LTQ Orbitrap XL instrument (Thermo Scientific, USA).

Methyl 2-((4,5-Diphenyloxazol-2-yl)thio)acetate (8). To a solution of 4,5-diphenyloxazole-2-thiol (0.75 g, 2.94 mmol, 1.0 equiv) in 10 mL of THF was added 0.83 mL of triethylamine (5.87 mmol, 2.0 equiv) at room temperature. After 10 min, methyl 2-bromoacetate

(0.31 mL, 3.23 mmol, 1.1 equiv) was added, and the mixture was stirred overnight followed by filtration over Celite and concentration of the filtrate under reduced pressure. The residue was purified via column chromatography, eluting with 5:1 hexane/ethyl acetate (Hex/EtOAc), to yield 0.85 g of the product (2.58 mmol, 88% yield). R_f : 0.28 (8:1 Hex/EtOAc). ^1H NMR (250 MHz, CD_3OD): $\delta = 7.51$ (m, 10H, Ph), 4.24 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 3.73 (s, 3H, $-\text{CH}_3$). ESI-MS: $m/z = 326.0$ $[\text{M} + \text{H}]^+$.

2-((4,5-Diphenyloxazol-2-yl)thio)acetic Acid (9). In a microwave vial, **8** (0.83 g, 2.58 mmol, 1 equiv) was dissolved in 4 mL of a 1:2:1 MeOH/water/THF mixture, and potassium hydroxide powder (0.43 g, 7.65 mmol, 3 equiv) was added. The vial was capped and heated to 70 $^\circ\text{C}$ for 15 min in the microwave. The solvent was removed, and the residue was taken up in 7 mL of water, acidified with 10% HCl to pH 5, and lyophilized. Recrystallization from EtOAc yielded 0.52 g of the raw product (1.67 mmol, 65% yield). R_f (RP): 0.64 (3:1 MeOH/water). ^1H NMR (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.46$ (m, 10H, Ph), 3.94 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): 171.3, 158.1, 146.4, 135.0, 130.5, 127.7, 127.6, 127.4, 127.2, 126.8, 125.3, 35.5. HRMS: calcd, $m/z = 312.06889$; found, $m/z = 312.06931$.

General Procedure for the Synthesis of Cyanohydrin Compounds 15a–m. To the appropriate benzaldehyde derivative **13a–m** (1 equiv) was added trimethylsilyl cyanide (**14**, TMSCN) (1 equiv) followed by triethylamine (0.2 equiv). If the starting material did not dissolve within 10 min, 1 mL of DCM was added. The solution was stirred overnight at room temperature. The mixture was diluted with DCM and washed with concentrated ammonium chloride solution and brine. The organic layer was filtered over silica gel and rinsed with 100 mL of DCM. The solvent was removed under reduced pressure, and the crude product was used without further purification. In most cases, a liquid was isolated.

2-(2-Fluorophenyl)-2-((trimethylsilyloxy)acetonitrile (15a). Yield: 1.28 g (colorless liquid; 96%). R_f : 0.76 (5:1 Hex/EtOAc). ^1H NMR (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.64$ (td, 1H, $J = 7.6$ Hz, 1.6 Hz, Ph-4H), 7.45–7.35 (m, 1H, Ph-6H), 7.23 (td, 1H, $J = 7.6$ Hz, 1.1 Hz, Ph-2H), 7.61 (td, 1H, $J = 8.7$ Hz, 1.1 Hz, Ph-5H), 5.76 (s, 1H, $-\text{CH}-$), 0.24 (s, 9H, $3 \times -\text{CH}_3$). ESI-MS: $m/z = 195.8$ $[\text{M} - \text{CN}]^-$.

2-(2-Chlorophenyl)-2-((trimethylsilyloxy)acetonitrile (15b). Yield: 607 mg (colorless liquid; quant.). R_f : 0.78 (9:1 Hex/EtOAc). ^1H NMR (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.74$ –7.70 (m, 1H, Ph-5H), 7.42–7.32 (m, 3H, Ph-3H,4H,6H), 5.80 (s, 1H, $-\text{CH}-$), 0.26 (s, 9H, $3 \times -\text{CH}_3$). ESI-MS: $m/z = 211.75$ $[\text{M} - \text{CN}]^-$.

3-(Cyanotrimethylsilyloxy)methylbenzonitrile (15c). Yield: 1.30 g (pale-yellow liquid; 94%). R_f : 0.09 (9:1 Hex/EtOAc). ^1H NMR (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.78$ (s, 1H, Ph-2H), 7.70–7.68 (m, 2H, Ph-4H,5H), 7.56 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz, Ph-6H), 5.52 (s, 1H, $-\text{CH}-$), 0.28 (s, 9H, $3 \times -\text{CH}_3$). ESI-MS: $m/z = 202.9$ $[\text{M} - \text{CN}]^-$.

2-(3-Fluorophenyl)-2-((trimethylsilyloxy)acetonitrile (15d). Yield: 1.35 g (pale-yellow liquid; quant.). R_f : 0.71 (5:1 Hex/EtOAc). ^1H NMR (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.43$ –7.34 (m, 1H, Ph-5H), 7.26–7.18 (m, 2H, Ph-2H,4H), 7.09 (td, 1H, $J = 8.5$ Hz, 2.5 Hz, Ph-6H), 5.49 (s, 1H, $-\text{CH}-$), 0.25 (s, 9H, $3 \times -\text{CH}_3$). ESI-MS: $m/z = 195.8$ $[\text{M} - \text{CN}]^-$.

2-(4-Fluorophenyl)-2-((trimethylsilyloxy)acetonitrile (15e). Yield: 1.41 g (colorless liquid; quant.). R_f : 0.56 (9:1 Hex/EtOAc). ^1H NMR (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.49$ –7.41 (m, 2H, Ph-2H,6H), 7.10 (pt, 2H, $J = 8.6$ Hz, Ph-3H,5H), 5.47 (s, 1H, $-\text{CH}-$), 0.24 (s, 9H, $3 \times -\text{CH}_3$). ESI-MS: $m/z = 195.8$ $[\text{M} - \text{CN}]^-$.

2-(4-Trifluoromethylphenyl)-2-((trimethylsilyloxy)acetonitrile (15f). Yield: 601 mg (pale-yellow liquid; 88%). R_f : 0.80 (3:1 Hex/EtOAc). ^1H NMR (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.69$ (d, 2H, $J = 8.6$ Hz, Ph-3H,5H), 7.61 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz, Ph-2H,6H), 5.55 (s, 1H, $-\text{CH}-$), 0.27 (s, 9H, $3 \times -\text{CH}_3$). ESI-MS: $m/z = 245.8$ $[\text{M} - \text{CN}]^-$.

4-(Cyanotrimethylsilyloxy)methylbenzonitrile (15g). Yield: 517 mg (yellow liquid; 90%). R_f : 0.57 (9:1 Hex/EtOAc). ^1H NMR (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.73$ (d, 2H, $J = 8.5$ Hz, Ph-3H,5H), 7.60 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz, Ph-2H,6H), 5.54 (s, 1H, $-\text{CH}-$), 0.27 (s, 9H, $3 \times -\text{CH}_3$). ESI-MS: $m/z = 202.0$ $[\text{M} - \text{CN}]^-$.

2-(4-Chlorophenyl)-2-((trimethylsilyloxy)acetonitrile (15h). Yield: 2.24 g (yellow liquid; 93%). R_f : 0.88 (9:1 Hex/EtOAc). ^1H

NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 7.04 (ps, 4H, Ph), 5.46 (s, 1H, -CH-), 0.24 (s, 9H, 3 \times -CH₃). ESI-MS: m/z = 211.8 [M - CN]⁻.

2-(4-Methoxyphenyl)-2-((trimethylsilyloxy)acetoneitrile (15i)). Yield: 604 mg (colorless liquid; quant.). R_f: 0.57 (5:1 Hex/EtOAc). ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 7.38 (d, 2H, J = 8.8 Hz, Ph-2H,6H), 6.92 (d, 2H, J = 8.8 Hz, Ph-3H,5H), 5.43 (s, 1H, -CH-), 3.82 (s, 3H, O-CH₃), 0.21 (s, 9H, 3 \times -CH₃). ESI-MS: m/z = 209.3 [M - CN]⁻.

2-(4-Chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-((trimethylsilyloxy)acetoneitrile (15j)). Yield: 722 mg (yellow liquid; 89%). R_f: 0.87 (5:1 Hex/EtOAc). ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 7.79 (s, 1H, Ph-2H), 7.59 (ps, 2H, Ph-5H,6H), 5.51 (s, 1H, -CH-), 0.27 (s, 9H, 3 \times -CH₃). ESI-MS: m/z = 279.7 [M - CN]⁻.

2-(3,4-Dichlorophenyl)-2-((trimethylsilyloxy)acetoneitrile (15k)). Yield: 673 mg (orange liquid; 98%). R_f: 0.69 (3:1 Hex/EtOAc). ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 7.57 (sd, 1H, J = 2.0 Hz, Ph-2H), 7.50 (d, 1H, J = 8.3 Hz, Ph-5H), 7.30 (dd, 1H, J = 8.3 Hz, 2.1 Hz, Ph-6H), 5.44 (s, 1H, -CH-), 0.26 (s, 9H, 3 \times -CH₃). ESI-MS: m/z = 245.7 [M - CN]⁻.

2-(2,4-Dichlorophenyl)-2-((trimethylsilyloxy)acetoneitrile (15l)). Yield: 680 mg (yellow liquid; 99%). R_f: 0.82 (5:1 Hex/EtOAc). ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 7.65 (d, 1H, J = 8.4 Hz, Ph-6H), 7.42 (sd, 1H, J = 2.0 Hz, Ph-3H), 7.35 (dd, 1H, J = 8.4 Hz, 2.0 Hz, Ph-5H), 5.73 (s, 1H, -CH-), 0.26 (s, 9H, 3 \times -CH₃). ESI-MS: m/z = 248.1 [M - CN]⁻.

2-(3,5-Dichlorophenyl)-2-((trimethylsilyloxy)acetoneitrile (15m)). Yield: 600 mg (brown liquid; 88%). R_f: 0.88 (5:1 Hex/EtOAc). ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 7.39–7.35 (m, 3H, Ph), 5.43 (s, 1H, -CH-), 0.27 (s, 9H, 3 \times -CH₃). ESI-MS: m/z = 245.7 [M - CN]⁻.

General Procedure for the Synthesis of Deoxybenzoin Compounds 17a–m. The appropriate cyanohydrin (2 mmol; 1 equiv) was dissolved in 3 mL of absolute THF and cooled to -78 °C. LDA (2.1 mmol, 1.05 equiv) was added, and the mixture was left to stir for 30 min, followed by the addition of benzyl bromide (16) (2.2 mmol, 1.1 equiv) in 1 mL of THF. The mixture was stirred for 2 h, allowed to warm to room temperature (RT), and stirred overnight. To the mixture was added 1 M TBAF solution (2 mL, 1 equiv), and the resulting mixture was stirred for another half an hour. The mixture was diluted with ethyl acetate, washed with saturated ammonium chloride solution and 0.5 M NaOH solution, and dried, and the solvent was removed. The yellow-orange residue (ca. 600 mg) was purified by column chromatography, eluting with 9:1 Hex/EtOAc. The purified product solidified upon standing.

1-(2-Fluorophenyl)-2-phenylethan-1-one (17a). Yield: 247 mg (yellow oil; 58%). R_f: 0.70 (5:1 Hex/EtOAc). ¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.86 (td, 1H, J = 7.6 Hz, 1.7 Hz, Ph-F-4H), 7.70–7.61 (m, 1H, Ph-F-6H), 7.38–7.15 (m, 7H, Ph, Ph-F-3H,5H), 4.31 (s, 2H, -CH₂-). ESI-MS: m/z = 214.8 [M + H]⁺.

1-(2-Chlorophenyl)-2-phenylethan-1-one (17b). Yield: 202 mg (pale-yellow liquid; 44%). R_f: 0.68 (9:1 Hex/EtOAc). ¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.72 (dd, 1H, J = 7.8 Hz, 1.6 Hz, Ph-Cl-6H), 7.53–7.48 (m, 2H, Ph-Cl-3H,4H), 7.72 (td, 1H, J = 6.7 Hz, 1.9 Hz, Ph-Cl-5H), 7.33–7.29 (m, 2H, Ph-3H,5H), 7.25–7.21 (m, 3H, Ph-2H,4H,6H), 4.29 (s, 2H, -CH₂-). ESI-MS: m/z = 230.8 [M]⁺.

3-(2-Phenylacetyl)benzoinitrile (17c). Yield: 320 mg (tan solid; 72%). R_f: 0.14 (9:1 Hex/EtOAc). ¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.49 (s, 1H, Ph-CN-2H), 8.30 (d, 1H, J = 8.0 Hz, Ph-CN-4H), 8.11 (d, 1H, J = 7.8 Hz, Ph-CN-6H), 7.52 (t, 1H, J = 7.8 Hz, Ph-CN-5H), 7.37–7.23 (m, 5H, Ph), 4.46 (s, 2H, -CH₂-). ESI-MS: m/z = 219.9 [M - H]⁻.

1-(3-Fluorophenyl)-2-phenylethan-1-one (17d). Yield: 200 mg (yellow solid; 47%). R_f: 0.60 (5:1 Hex/EtOAc). ¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.90 (d, 1H, J = 7.7 Hz, Ph-F-6H), 7.81 (dd, 1H, J = 7.7 Hz, 1.5 Hz, Ph-F-4H), 7.62–7.56 (m, 1H, Ph-F-2H), 7.49 (td, 1H, J = 9.2 Hz, 2.5 Hz, Ph-F-5H), 7.35–7.29 (m, 3H, Ph-2H,4H,6H), 7.27–7.23 (m, 2H, Ph-3H,5H), 4.41 (s, 2H, -CH₂-). ESI-MS: m/z = 214.9 [M + H]⁺.

1-(4-Fluorophenyl)-2-phenylethan-1-one (17e). Yield: 399 mg (pale-yellow solid; 93%). R_f: 0.43 (9:1 Hex/EtOAc). ¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.13 (t, 2H, J = 8.6 Hz, Ph-F-3H,5H), 7.39–

7.22 (m, 7H, Ph, Ph-F-2H,6H), 4.38 (s, 2H, -CH₂-). ESI-MS: m/z = 214.8 [M + H]⁺.

2-Phenyl-1-(4-(trifluoromethyl)phenyl)ethan-1-one (17f). Yield: 236 mg (white solid; 45%). R_f: 0.70 (3:1 Hex/EtOAc). ¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.22 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ph-CF₃-2H,6H), 7.90 (d, 2H, J = 8.1 Hz, Ph-CF₃-3H,5H), 7.35–7.22 (m, 5H, Ph), 4.47 (s, 2H, -CH₂-). ESI-MS: m/z = 264.8 [M + H]⁺.

4-(2-Phenylacetyl)benzoinitrile (17g). Yield: 213 mg (white solid; 45%). R_f: 0.39 (5:1 Hex/EtOAc). ¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.20 (d, 2H, J = 8.6 Hz, Ph-CN-2H,6H), 8.03 (d, 2H, J = 8.6 Hz, Ph-CN-3H,5H), 7.38–7.23 (m, 5H, Ph), 4.47 (s, 2H, -CH₂-). ESI-MS: m/z = 219.9 [M - H]⁻.

1-(4-Chlorophenyl)-2-phenylethan-1-one (17h). Yield: 192 mg (pale-yellow oil; 55%). R_f: 0.75 (9:1 Hex/EtOAc). ¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.93 (d, 2H, J = 8.6 Hz, Ph-Cl-2H,6H), 7.42 (d, 2H, J = 8.6 Hz, Ph-Cl-3H,5H), 7.35–7.23 (m, 5H, Ph), 4.25 (s, 2H, -CH₂-). ESI-MS: m/z = 230.8 [M + H]⁺.

1-(4-Methoxyphenyl)-2-phenylethan-1-one (17i). Yield: 286 mg (yellow liquid; 63%). R_f: 0.36 (5:1 Hex/EtOAc). ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 7.99 (d, 2H, J = 8.5 Hz, Ph-OCH₃-2H,6H), 7.30–7.20 (m, 5H, Ph), 6.92 (d, 2H, J = 8.5 Hz, Ph-OCH₃-3H,5H), 4.23 (s, 2H, -CH₂-), 3.85 (s, 3H, -CH₃). ESI-MS: m/z = 226.9 [M + H]⁺.

1-(4-Chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-2-phenylethan-1-one (17j). Yield: 213 mg (colorless liquid; 45%). R_f: 0.53 (5:1 Hex/EtOAc). ¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.32 (pd, 2H, Ph-3CF₃,4Cl-2H,6H), 7.92 (d, 1H, J = 8.8 Hz, Ph-3CF₃,4Cl-5H), 7.36–7.21 (m, 5H, Ph), 4.49 (s, 2H, -CH₂-). ESI-MS: m/z = 299.7 [M + H]⁺.

1-(3,4-Dichlorophenyl)-2-phenylethan-1-one (17k). Yield: 258 mg (pale-yellow solid; 49%). R_f: 0.59 (3:1 Hex/EtOAc). ¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.23 (sd, 1H, J = 2.0 Hz, Ph-3,4Cl-2H), 7.99 (dd, 1H, J = 8.3 Hz, 2.1 Hz, Ph-3,4Cl-6H), 7.81 (d, 1H, J = 8.3 Hz, Ph-3,4Cl-5H), 7.34–7.21 (m, 5H, Ph), 4.42 (s, 2H, -CH₂-). ESI-MS: m/z = 265.9 [M + H]⁺.

1-(2,4-Dichlorophenyl)-2-phenylethan-1-one (17l). Yield: 167 mg (pale-yellow liquid; 31%). R_f: 0.65 (9:1 Hex/EtOAc). ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 7.73 (sd, 1H, J = 2.0 Hz, Ph-2,4-diCl-3H), 7.35–7.19 (m, 7H, Ph, Ph-2,4-diCl-5H,6H), 4.24 (s, 2H, -CH₂-). ESI-MS: m/z = 265.8 [M + H]⁺.

1-(3,5-Dichlorophenyl)-2-phenylethan-1-one (17m). Yield: 151 mg (pale-yellow liquid; 26%). R_f: 0.60 (9:1 Hex/EtOAc). ¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.01 (sd, 2H, J = 1.9 Hz, Ph-3,5-diCl-2H,6H), 7.92 (sd, 1H, J = 1.9 Hz, Ph-3,5-diCl-4H), 7.36–7.23 (m, 5H, Ph), 4.44 (s, 2H, -CH₂-). ESI-MS: m/z = 265.9 [M + H]⁺.

General Procedure for the Synthesis of α -Bromoketone Compounds 18a–m. The deoxybenzoin derivative (1 equiv) was dissolved in chloroform, and bromine (1 equiv), dissolved in chloroform as well, was slowly added. The mixture was heated to reflux for 2 h, diluted with dichloromethane, washed with water and brine, dried, and concentrated under reduced pressure. The resulting liquid was used immediately without further purification.

General Procedure for the Synthesis of Oxaprozin Derivatives 12, 20a–m, and 22a–e. Succinic acid (11), succinic acid (19), or the corresponding dicarboxylic acid 21a–e (3 equiv) was dissolved in acetonitrile and treated with triethylamine (3 equiv). After 15 min, the α -bromoketone (1 equiv), dissolved in a minimal amount of acetonitrile, was added, and the mixture was stirred at 45 °C for 6 h. The solvent was removed, and the residue was diluted with ethyl acetate and washed with water and brine. A white resin was isolated. The residue was taken up in acetic acid (10 mL), and ammonium acetate (10 equiv) was added. The mixture was heated to reflux for another 3 h and then thrown on ice and extracted with ethyl acetate, and the residue was purified via column chromatography, eluting with 3:1 Hex/EtOAc + 3% AcOH. Yields were calculated for the two-step reaction starting from the deoxybenzoin. The products were further purified by preparative HPLC, yielding white solids.

3-(4,5-Diphenylloxazol-2-yl)propanamide (12). 11 was used starting from α -bromodeoxybenzoin. Yield: 296 mg (68%). R_f: 0.22 (98:2 DCM/MeOH). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.57–

7.32 (m, 1H, Ph, 1 × -NH₂), 6.87 (br, 1H, 1 × -NH₂), 3.04 (t, 2H, J = 7.3 Hz, CH₂-CONH₂), 2.62 (t, 2H, J = 7.3 Hz, CH₂-CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 172.4, 162.73, 144.4, 134.2, 132.0, 128.8, 128.7, 128.5, 128.4, 128.0, 127.3, 126.2, 31.3, 23.1. HRMS: calcd, *m/z* = 293.12845; found, *m/z* = 293.12880.

3-(4-(2-Fluorophenyl)-5-phenyloxazol-2-yl)propanoic Acid (20a). Yield: 58 mg (34%). *R*_f: 0.39 (3:1 Hex/EtOAc + 3% AcOH). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.31 (s, 1H, -COOH), 7.60–7.46 (m, 2H, Ph-F-4H,6H), 7.59–7.39 (m, 7H, Ph, Ph-F-3H,5H), 3.09 (t, 2H, J = 7.0 Hz, -CH₂-COOH), 2.79 (t, 2H, J = 7.0 Hz, -CH₂-CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 173.0, 162.4, 131.3, 131.3, 130.8, 130.7, 128.7, 128.4, 127.9, 124.8, 124.8, 124.7, 116.1, 115.8, 30.1, 22.8. HRMS: calcd, *m/z* = 312.10305; found, *m/z* = 312.10411.

3-(4-(2-Chlorophenyl)-5-phenyloxazol-2-yl)propanoic Acid (20b). Yield: 82 mg (29%; hygroscopic). *R*_f: 0.49 (3:1 Hex/EtOAc + 3% AcOH). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.33 (s, 1H, -COOH), 7.69–7.28 (m, 9H, Ph-Cl, Ph), 3.06 (t, 2H, J = 7.0 Hz, CH₂-COOH), 2.78 (t, 2H, J = 7.0 Hz, -CH₂-CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 173.0, 163.0, 141.8, 135.7, 133.3, 132.4, 131.8, 131.1, 130.1, 128.5, 128.0, 127.8, 127.8, 125.8, 30.2, 22.9. HRMS: calcd, *m/z* = 328.07350; found, *m/z* = 328.07482.

3-(4-(3-Cyanophenyl)-5-phenyloxazol-2-yl)propanoic Acid (20c). Yield: 39 mg (18%). *R*_f: 0.76 (3:1 Hex/EtOAc + 3% AcOH). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.36 (s, 1H, -COOH), 7.93 (s, 1H, Ph-CN-2H), 7.85 (d, 1H, J = 7.9 Hz, Ph-CN-4H), 7.81 (d, 1H, J = 7.9 Hz, Ph-CN-6H), 7.61 (t, 1H, J = 7.8 Hz, Ph-CN-5H), 7.55–7.51 (m, 3H, Ph-2H,4H,6H), 7.49–7.40 (m, 2H, Ph-3H,5H), 3.07 (t, 2H, J = 7.0 Hz, -CH₂-COOH), 2.79 (t, 2H, J = 7.0 Hz, -CH₂-CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 173.0, 162.8, 145.7, 133.2, 132.3, 131.7, 130.4, 130.0, 129.3, 129.1, 128.8, 127.8, 127.5, 126.6, 118.4, 111.8, 30.1, 22.8. HRMS: calcd, *m/z* = 319.10772; found, *m/z* = 319.10865.

3-(4-(3-Fluorophenyl)-5-phenyloxazol-2-yl)propanoic Acid (20d). Yield: 57 mg (24%). *R*_f: 0.23 (3:1 Hex/EtOAc + 3% AcOH). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.33 (s, 1H, -COOH), 7.55–7.53 (m, 2H, Ph-3H,5H), 7.48–7.41 (m, 4H, Ph-2H,4H,6H, Ph-F-2H), 7.39 (d, 1H, J = 7.8 Hz, Ph-F-6H), 7.31 (dd, 1H, J = 9.4 Hz, 1.1 Hz, Ph-F-4H), 7.18 (td, 1H, J = 7.8 Hz, 1.1 Hz, Ph-F-5H), 3.06 (t, 2H, J = 6.9 Hz, -CH₂-COOH), 2.78 (t, 2H, J = 7.0 Hz, -CH₂-CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 173.0, 162.5, 145.2, 134.3, 132.9, 130.7, 128.9, 128.0, 126.6, 123.1, 115.0, 113.8, 30.2, 22.8. HRMS: calcd, *m/z* = 312.10305; found, *m/z* = 312.10417.

3-(4-(4-Fluorophenyl)-5-phenyloxazol-2-yl)propanoic Acid (20e). Yield: 53 mg (19%). *R*_f: 0.30 (3:1 Hex/EtOAc + 3% AcOH). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.31 (s, 1H, -COOH), 7.60–7.56 (m, 2H, Ph-F-2H,6H), 7.53–7.50 (m, 2H, Ph-F-3H,5H), 7.47–7.39 (m, 3H, Ph-2H,4H,6H), 7.49 (t, 2H, J = 8.9 Hz, Ph-3H,5H), 3.06 (t, 2H, J = 7.1 Hz, -CH₂-COOH), 2.78 (t, 2H, J = 7.1 Hz, -CH₂-CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 173.0, 163.3, 162.3, 160.1, 144.4, 133.3, 129.4, 129.3, 128.9, 128.8, 128.4, 128.3, 128.2, 126.2, 115.7, 115.4, 30.1, 22.8. HRMS: calcd, *m/z* = 312.10305; found, *m/z* = 312.10410.

3-(5-Phenyl-4-(4-(trifluoromethyl)phenyl)oxazol-2-yl)propanoic Acid (20f). Yield: 71 mg (23%). *R*_f: 0.51 (3:1 hexane/EtOAc + 3% AcOH). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.31 (s, 1H, -COOH), 7.77 (ps, 4H, Ph-CF₃), 7.57–7.44 (m, 5H, Ph), 3.08 (t, 2H, J = 7.0 Hz, CH₂-COOH), 2.79 (t, 2H, J = 6.9 Hz, -CH₂-CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 173.0, 162.8, 145.84, 136.0, 132.7, 129.2, 129.0, 127.9, 127.6, 126.7, 125.6, 125.5, 30.1, 22.8. HRMS: calcd, *m/z* = 362.09985; found, *m/z* = 362.10073.

3-(4-(4-Cyanophenyl)-5-phenyloxazol-2-yl)propanoic Acid (20g). Yield: 24 mg (15%). *R*_f: 0.32 (3:1 Hex/EtOAc + 3% AcOH). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.32 (s, 1H, -COOH), 7.86 (d, 2H, J = 8.6 Hz, Ph-CN-3H,5H), 7.73 (d, 2H, J = 8.6 Hz, Ph-CN-2H,6H), 7.57–7.46 (m, 5H, Ph), 3.07 (t, 2H, J = 6.9 Hz, CH₂-COOH), 2.78 (t, 2H, J = 6.9 Hz, -CH₂-CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 173.0, 163.0, 146.4, 136.5, 132.6, 129.5,

129.1, 127.8, 127.6, 126.9, 118.6, 110.3, 30.1, 22.8. HRMS: calcd, *m/z* = 319.10772; found, *m/z* = 319.10820.

3-(4-(4-Chlorophenyl)-5-phenyloxazol-2-yl)propanoic Acid (20h). Yield: 19 mg (34%). *R*_f: 0.46 (3:1 Hex/EtOAc + 3% AcOH). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.31 (br, 1H, -COOH), 7.59–7.39 (m, 9H, Ph, Ph-Cl), 3.06 (t, 2H, J = 7.1 Hz, -CH₂-COOH), 2.78 (t, 2H, J = 7.0 Hz, -CH₂-CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 173.0, 162.5, 144.9, 133.1, 132.5, 130.7, 128.9, 128.9, 128.7, 128.6, 128.4, 128.1, 126.4, 30.1, 22.8. HRMS: calcd, *m/z* = 328.07350; found, *m/z* = 328.07469.

3-(4-(4-Methoxyphenyl)-5-phenyloxazol-2-yl)propanoic Acid (20i). Yield: 58 mg (16%). *R*_f: 0.12 (3:1 Hex/EtOAc + 3% AcOH). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.33 (s, 1H, -COOH), 7.55–7.36 (m, 7H, Ph, Ph-OCH₃-2H,6H), 6.99 (d, 2H, J = 8.5 Hz, Ph-OCH₃-3H,5H), 3.85 (s, 3H, -CH₃), 3.06 (t, 2H, J = 7.0 Hz, CH₂-COOH), 2.79 (t, 2H, J = 6.9 Hz, -CH₂-CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 173.1, 162.1, 159.0, 143.6, 134.2, 128.9, 128.7, 128.6, 128.5, 126.01, 124.2, 114.0, 55.0, 30.2, 22.9. HRMS: calcd, *m/z* = 324.12303; found, *m/z* = 324.12406.

3-(4-(4-Chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-5-phenyloxazol-2-yl)propanoic Acid (20j). Yield: 52 mg (11%). *R*_f: 0.32 (3:1 Hex/EtOAc + 3% AcOH). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.40 (s, 1H, -COOH), 8.01 (sd, 1H, J = 1.9 Hz, Ph-4Cl-3CF₃-2H), 7.88 (dd, 1H, J = 8.4 Hz, 1.9 Hz, Ph-4Cl-3CF₃-6H), 7.80 (d, 1H, J = 8.4 Hz, Ph-4Cl-3CF₃-5H), 7.63–7.51 (m, 5H, Ph), 3.13 (t, 2H, J = 6.8 Hz, CH₂-COOH), 2.84 (t, 2H, J = 6.8 Hz, -CH₂-CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 173.0, 162.9, 145.9, 132.1, 132.0, 131.7, 131.5, 129.5, 129.1, 127.7, 126.9, 30.1, 22.8. HRMS: calcd, *m/z* = 396.06088; found, *m/z* = 396.06074.

3-(4-(3,4-Dichlorophenyl)-5-phenyloxazol-2-yl)propanoic Acid (20k). Yield: 68 mg (21%). *R*_f: 0.43 (3:1 Hex/EtOAc + 3% AcOH). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.31 (s, 1H, -COOH), 7.74 (sd, 1H, J = 2.0 Hz, Ph-3,4-diCl-2H), 7.66 (d, 1H, J = 8.3 Hz, Ph-3,4-diCl-5H), 7.56–7.44 (m, 6H, Ph-3,4-diCl-6H, Ph), 3.06 (t, 2H, J = 7.0 Hz, CH₂-COOH), 2.78 (t, 2H, J = 6.9 Hz, -CH₂-CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 172.9, 162.7, 145.6, 132.5, 131.8, 131.3, 130.9, 130.4, 129.3, 129.0, 128.6, 127.8, 127.0, 126.7, 30.1, 22.8. HRMS: calcd, *m/z* = 362.03453; found, *m/z* = 362.03564.

3-(4-(2,4-Dichlorophenyl)-5-phenyloxazol-2-yl)propanoic Acid (20l). Yield: 50 mg (25%). *R*_f: 0.36 (3:1 Hex/EtOAc + 3% AcOH). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.30 (s, 1H, -COOH), 7.86 (sd, 1H, J = 1.0 Hz, Ph-2,4-diCl-3H), 7.62–7.58 (m, 2H, Ph-2,4-diCl-5H,6H), 7.45–7.26 (m, 5H, Ph), 3.04 (t, 2H, J = 7.0 Hz, CH₂-COOH), 2.78 (t, 2H, J = 7.0 Hz, -CH₂-CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 172.9, 163.2, 140.6, 136.2, 135.5, 134.3, 133.5, 130.9, 129.8, 128.53, 128.5, 128.0, 127.9, 127.4, 126.9, 126.0, 30.2, 22.8. HRMS: calcd, *m/z* = 362.03453; found, *m/z* = 362.03563.

3-(4-(3,5-Dichlorophenyl)-5-phenyloxazol-2-yl)propanoic Acid (20m). Yield: 23 mg (11%). *R*_f: 0.35 (3:1 Hex/EtOAc + 3% AcOH). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.31 (s, 1H, -COOH), 7.61–7.48 (m, 8H, Ph, Ph-3,5-diCl), 3.07 (t, 2H, J = 6.8 Hz, CH₂-COOH), 2.76 (t, 2H, J = 6.8 Hz, -CH₂-CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 173.0, 162.9, 146.1, 135.3, 134.3, 131.4, 129.6, 129.1, 127.6, 127.4, 126.9, 125.3, 30.1, 22.8. HRMS: calcd, *m/z* = 362.03453; found, *m/z* = 362.03575.

3-(4-(3,4-Dichlorophenyl)-5-phenyloxazol-2-yl)acrylic Acid (22a, Isomeric Mixture). Instead of succinic acid, maleic acid (**21a**) was used. Yield: 112 mg (yellow solid; 21%). *R*_f: 0.56 (2:1 Hex/EtOAc + 3% AcOH). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.88 (sd, 1H, J = 2.0 Hz, Ph-3,4-diCl-2H), 7.78 (sd, 0.4H, J = 2.0 Hz, Ph-3,4-diCl-2H), 7.69 (d, 1H, J = 8.4 Hz, Ph-3,4-diCl-5H), 7.69 (d, 1H, J = 8.4 Hz, Ph-3,4-diCl-5H), 7.67 (d, 0.4H, J = 8.4 Hz, Ph-3,4-diCl-5H), 7.65–7.45 (m, 9H, 2 × Ph, 2 × Ph-3,4-diCl-6H), 7.32 (d, 1.4H, J = 15.9 Hz, -CH=CH-), 6.87 (d, 1H, J = 15.9 Hz, =CH-COOH), 6.77 (d, 0.4H, J = 15.9 Hz, =CH-COOH). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 166.2, 166.2, 157.7, 157.5, 147.3, 143.8, 138.3, 134.5, 131.9, 131.9, 131.8, 131.5, 131.2, 131.1, 131.1, 130.8, 130.0, 129.2, 129.1, 129.0, 128.0, 128.0, 127.8, 127.5, 127.2, 127.1, 127.0, 126.7, 126.3. HRMS: calcd, *m/z* = 360.01888; found, *m/z* = 360.01937.

4-(4-(3,4-Dichlorophenyl)-5-phenyloxazol-2-yl)butanoic Acid (22b). Instead of succinic acid, glutaric acid (**21b**) was used. Yield: 121 mg (27%). *R_f*: 0.57 (2:1 Hex/EtOAc + 3% AcOH). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.40 (s, 1H, -COOH), 7.75 (sd, 1H, *J* = 1.9 Hz, *Ph*-3,4-diCl-2H), 7.66 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, *Ph*-3,4-diCl-5H), 7.56–7.44 (m, 6H, *Ph*, *Ph*-3,4-diCl-6H), 2.87 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, CH₂-COOH), 2.39 (t, 2H, *J* = 7.1 Hz, oxazole-CH₂-CH₂), 1.98 (q, 2H, *J* = 7.5 Hz, -CH₂-CH₂-CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 174.0, 163.2, 145.7, 132.6, 131.9, 131.4, 131.0, 130.4, 129.4, 129.1, 128.7, 127.9, 127.1, 126.8, 32.6, 26.5, 21.69. HRMS: calcd, *m/z* = 376.05018; found, *m/z* = 376.05145.

2-(4-(3,4-Dichlorophenyl)-5-phenyloxazol-2-yl)benzoic Acid (22c). Instead of succinic acid, phthalic acid (**21c**) was used. Yield: 70 mg (pale-yellow solid; 14%). *R_f*: 0.56 (2:1 Hex/EtOAc + 3% AcOH). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 13.40 (s, 1H, -COOH), 8.00 (dd, 1H, *J* = 6.8 Hz, 1.9 Hz, *Ph*-3,4-diCl-6H), 7.85 (sd, 1H, *J* = 1.9 Hz, *Ph*-3,4-diCl-2H), 7.78–7.57 (m, 7H, *Ph*-COOH, *Ph*-3H,5H, *Ph*-3,4-diCl-6H), 7.54–7.47 (m, 3H, *Ph*-2H,4H,6H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 169.1, 159.3, 146.8, 133.4, 133.3, 132.4, 131.6, 131.1, 130.9, 130.9, 129.7, 129.3, 129.2, 128.9, 127.6, 127.3, 126.9, 124.8. HRMS: calcd, *m/z* = 410.03453; found, *m/z* = 410.03509.

3-(4-(3,4-Dichlorophenyl)-5-phenyloxazol-2-yl)benzoic Acid (22d). Instead of succinic acid, isophthalic acid (**21d**) was used. Yield: 53 mg (11%). *R_f*: 0.48 (2:1 Hex/EtOAc + 3% AcOH). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 13.40 (bs, 1H, -COOH), 8.60 (t, 1H, *J* = 1.4 Hz, *Ph*-COOH-5H), 8.35–8.32 (m, 2H, *Ph*-COOH-2H,4H), 8.13–8.09 (m, 1H, *Ph*-COOH-6H), 7.88 (sd, 1H, 2.0 Hz, *Ph*-Cl-2H), 7.75–7.69 (m, 4H, *Ph*-Cl-5H, *Ph*-2H,4H,6H), 7.62 (dd, 1H, *J* = 8.4 Hz, 2.0 Hz, *Ph*-Cl-6H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 166.1, 159.0, 146.7, 133.7, 132.4, 131.8, 131.6, 131.1, 131.0, 130.3, 129.9, 129.8, 129.3, 129.1, 127.5, 127.5, 127.1, 126.7, 126.6. HRMS: calcd, *m/z* = 410.03453; found, *m/z* = 410.03460.

4-(4-(3,4-Dichlorophenyl)-5-phenyloxazol-2-yl)benzoic Acid (22e). Instead of succinic acid, terephthalic acid (**21e**) was used. Yield: 57 mg (pale-yellow solid; 12%). *R_f*: 0.53 (2:1 Hex/EtOAc + 3% AcOH). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 13.29 (bs, 1H, -COOH), 8.26–8.20 (m, 2H, *Ph*-COOH-3H,5H), 8.12–8.10 (m, 2H, *Ph*-COOH-2H,6H), 7.91 (dd, 1H, *J* = 8.7 Hz, 1.8 Hz, *Ph*-3,4-diCl-6H), 7.75–7.65 (m, 3H, *Ph*-3,4-diCl-2H, *Ph*-3H,5H), 7.62–7.77 (m, 1H, *Ph*-3,4-diCl-5H), 7.53–7.46 (m, 3H, *Ph*-2H,4H,6H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 166.7, 159.2, 143.5, 137.9, 132.7, 132.3, 131.9, 131.6, 131.2, 130.1, 129.7, 129.2, 129.0, 128.4, 127.9, 127.5, 127.0, 126.5, 126.3, 126.3. HRMS: calcd, *m/z* = 410.03453; found, *m/z* = 410.03478.

5-(2-(3,4-Dichlorophenyl)-2-oxoethoxy)-5-oxopentanoic Acid (24). To a solution of **21b** (3.3 g, 24.6 mmol, 3 equiv) in 150 mL of acetone was added triethylamine (3.5 mL, 24.6 mmol, 3 equiv), and the mixture was stirred at room temperature. After 30 min, 3,4-dichlorophenyl bromomethyl ketone (**23**) (2.3 g, 8.2 mmol, 1 equiv) was added in small portions, and the reaction was monitored by TLC. The mixture was concentrated under reduced pressure and taken up in 50 mL of 1 N hydrochloric acid, followed by extraction with dichloromethane. The solvent was dried over MgSO₄ and removed under reduced pressure, and the residue was purified via column chromatography, eluting with 98:2 DCM/MeOH + 1% AcOH, yielding 2.69 g of the product as a tan solid (97% yield). *R_f*: 0.20 (7:3 Hex/EtOAc + 0.1% AcOH). ¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 8.01 (sd, 1H, *J* = 2.0 Hz, *Ph*-2H), 7.74 (dd, 1H, *J* = 8.4 Hz, 2.0 Hz, *Ph*-6H), 7.59 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, *Ph*-5H), 5.29 (s, 2H, C(O)-CH₂-O), 2.57 (dt, 4H, *J* = 18.3 Hz, 7.2 Hz, 2 × C(O)-CH₂-CH₂-), 2.06 (quin, 2H, *J* = 7.1 Hz, CH₂-CH₂-CH₂). ESI-MS: *m/z* = 316.9 [M - 2H]⁻.

4-(4-(3,4-Dichlorophenyl)oxazol-2-yl)butanoic Acid (25). **24** (1.2 g, 3.7 mmol, 1 equiv), acetamide (1.1 g, 18.5 mmol, 5 equiv), and boron trifluoride diethyl etherate (0.5 mL, 3.7 mmol, 1 equiv) were mixed under neat conditions for 30 h at 140 °C. The mixture was poured into 50 mL of 1 N hydrochloric acid, followed by extraction with ethyl acetate. The combined organic phases were washed with brine and dried over MgSO₄, and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified via column chromatog-

raphy, eluting with 4:1 Hex/acetone, yielding 0.64 g of the product as a brown solid (58% yield). *R_f*: 0.20 (7:3 Hex/EtOAc + 0.1% AcOH). ¹H NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.13 (bs, 1H, -OH), 8.63 (s, 1H, oxazolyl-5H), 7.99 (sd, 1H, *J* = 1.9 Hz, *Ph*-2H), 7.77–7.66 (m, 2H, *Ph*-SH,6H), 2.83 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, -CH₂-C(O)), 2.35 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, oxazole-CH₂-), 1.94 (quin, 2H, *J* = 7.4 Hz, CH₂-CH₂-CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 178.3, 164.7, 138.6, 134.0, 133.0, 131.7, 131.0, 130.7, 127.3, 124.6, 32.9, 27.2, 21.8. HRMS: calcd, *m/z* = 300.01888; found, *m/z* = 300.01896.

4-(5-Bromo-4-(3,4-dichlorophenyl)oxazol-2-yl)butanoic Acid (26). To a solution of **25** (0.7 g, 2.3 mmol, 1.0 equiv) and ammonium acetate (0.2 g, 0.2 mmol, 0.1 equiv) in 20 mL of acetonitrile was added NBS (0.4 g, 2.4 mmol, 1.05 equiv) in small portions. The mixture was stirred for 1.5 h at room temperature, after which the solvent removed under reduced pressure and the residue was suspended in 100 mL of water. The solidified product was isolated by filtration and purified via column chromatography, eluting with 7:3 Hex/EtOAc + 1% AcOH, yielding 0.58 g of the title compound (67%). *R_f*: 0.29 (7:3 Hex/EtOAc + 0.1% AcOH). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.97 (sd, 1H, *J* = 2.0 Hz, *Ph*-2H), 7.82 (dd, 1H, *J* = 8.5 Hz, 2.1 Hz, *Ph*-6H), 7.71 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz, *Ph*-5H), 2.81 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, -CH₂-C(O)), 2.34 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, oxazole-CH₂-), 1.91 (quin, 2H, *J* = 7.4 Hz, CH₂-CH₂-CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 174.4, 165.9, 134.0, 132.0, 131.5, 131.2, 130.6, 127.6, 126.1, 118.0, 32.9, 27.0, 21.8. HRMS: calcd, *m/z* = 379.92734; found, *m/z* = 379.92693.

General Procedure for the Synthesis of Oxaprozin Derivatives 28a–k. A vial filled with 127 mg of K₃PO₄, 2 mL of water, and 1 mL of DMF was capped and degassed with argon using an ultrasonic bath. Afterward, tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (23 mg, 0.02 mmol, 0.1 equiv), **26** (76 mg, 0.2 mmol, 1.0 equiv), and the appropriate boronic acid derivative **27a–k** (0.2 mmol, 1.0 equiv) were added to the solution. The resulting mixture was degassed again and heated to 80 °C for 48 h. The mixture was diluted with 20 mL of EtOAc and filtered over silica gel. After the silica gel was rinsed several times with EtOAc, the solution was washed with 1 N hydrochloric acid and brine, dried over MgSO₄, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified via preparative HPLC.

4-(4-(3,4-Dichlorophenyl)-5-(pyridin-4-yl)oxazol-2-yl)butanoic Acid (28a). Pyridin-4-ylboronic acid (**27a**) was used as the coupling reagent. Yield: 2 mg (3%). *R_f*: 0.21 (98:2 DCM/MeOH + 0.1% AcOH). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.64 (d, 2H, *J* = 6.1 Hz, pyridinyl-3H,5H), 7.82 (sd, 1H, *J* = 2.0 Hz, *Ph*-2H), 7.73 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, *Ph*-5H), 7.56 (dd, 1H, *J* = 8.4 Hz, 2.0 Hz, *Ph*-6H), 7.45–7.53 (m, 2H, pyridinyl-2H,6H), 2.91 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, -CH₂-C(O)), 2.39 (t, 2H, *J* = 7.1 Hz, oxazole-CH₂-), 1.99 (quin, 2H, *J* = 7.4 Hz, CH₂-CH₂-CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 164.6, 150.5, 143.0, 140.7, 139.2, 137.8, 135.3, 134.9, 132.1, 131.7, 131.4, 131.2, 129.6, 127.9, 119.9, 32.8, 26.6, 21.7. HRMS: calcd, *m/z* = 377.04542; found, *m/z* = 377.04579.

4-(4-(3,4-Dichlorophenyl)-5-(pyridin-3-yl)oxazol-2-yl)butanoic Acid (28b). Pyridin-3-ylboronic acid (**27b**) was used as the coupling reagent. Yield: 8 mg (11%). *R_f*: 0.26 (98:2 DCM/MeOH + 0.1% AcOH). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.74 (sdd, 1H, *J* = 2.2 Hz, 0.7 Hz, pyridinyl-2H), 8.63 (dd, 1H, *J* = 4.8 Hz, 1.6 Hz, pyridinyl-4H), 7.91–8.01 (m, 1H, pyridinyl-6H), 7.77 (sd, 1H, *J* = 2.0 Hz, *Ph*-2H), 7.68 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, *Ph*-5H), 7.46–7.55 (m, 2H, *Ph*-6H, pyridinyl-5H), 2.90 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, -CH₂-C(O)), 2.40 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, oxazole-CH₂-), 1.92–2.08 (m, 2H, CH₂-CH₂-CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 174.0, 164.1, 150.0, 147.4, 143.1, 134.4, 133.4, 132.2, 131.6, 131.2, 130.9, 128.9, 127.2, 124.4, 124.1, 32.7, 26.6, 21.7. HRMS: calcd, *m/z* = 377.04542; found, *m/z* = 377.04623.

4-(4-(3,4-Dichlorophenyl)-5-(2-fluorophenyl)oxazol-2-yl)butanoic Acid (28c). (2-Fluorophenyl)boronic acid (**27c**) was used as the coupling reagent. Yield: 14 mg (18%). *R_f*: 0.42 (3:2 Hex/EtOAc + 0.1% AcOH). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.64 (sd, 1H, *J* = 1.5 Hz, *Ph*-3,4-diCl-2H), 7.45–7.07 (m, 6H, *Ph*-3,4-diCl-5H,6H, *Ph*-2-F), 2.89 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, -CH₂-C(O)), 2.48 (t, 2H, *J*

= 6.9 Hz, oxazole-CH₂-), 2.12 (quin, 2H, *J* = 7.3 Hz, CH₂-CH₂-CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 178.1, 163.9, 161.1, 157.7, 140.7, 134.9, 132.6, 131.8, 131.5, 130.5, 130.3, 128.8, 126.0, 124.6, 116.7, 116.4, 32.9, 27.2, 21.80. HRMS: calcd, *m/z* = 394.04075; found, *m/z* = 394.04059.

4-(4-(3,4-Dichlorophenyl)-5-(2,5-difluorophenyl)oxazol-2-yl)-butanoic Acid (28d). (2,5-Difluorophenyl)boronic acid (27d) was used as the coupling reagent. Yield: 22 mg (27%). *R*_f: 0.53 (3:2 Hex/EtOAc + 0.1% AcOH). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.70 (sd, 1H, *J* = 2.0 Hz, *Ph*-3,4-diCl-2H), 7.64 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, *Ph*-3,4-diCl-5H), 7.50–7.59 (m, 1H, *Ph*-3,4-diCl-6H), 7.33–7.49 (m, 3H, *Ph*-2,5-diF), 2.89 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, -CH₂-C(O)), 2.40 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, oxazole-CH₂-), 1.99 (quin, 2H, *J* = 7.4 Hz, CH₂-CH₂-CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 174.0, 164.6, 159.8, 156.6, 153.4, 138.9, 134.6, 132.0, 131.4, 130.9, 130.7, 128.1, 126.5, 119.0, 116.8, 32.7, 26.6, 21.7. HRMS: calcd, *m/z* = 412.03133; found, *m/z* = 412.03118.

4-(4-(3,4-Dichlorophenyl)-5-(3-fluorophenyl)oxazol-2-yl)-butanoic Acid (28e). (3-Fluorophenyl)boronic acid (27e) was used as the coupling reagent. Yield: 31 mg (40%). *R*_f: 0.44 (3:2 Hex/EtOAc + 0.1% AcOH). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.19 (s, 1H, -COOH), 7.78 (sd, 1H, *J* = 2.0 Hz, *Ph*-3,4-diCl-2H), 7.69 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, *Ph*-3,4-diCl-5H), 7.47–7.58 (m, 2H, *Ph*-3,4-diCl-6H, *Ph*-3-F-2H), 7.38 (pd, 2H, *J* = 7.4 Hz, *Ph*-3-F-4H,6H), 7.22–7.34 (m, 1H, *Ph*-3-F-5H), 2.88 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, -CH₂-C(O)), 2.40 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, oxazole-CH₂-), 1.99 (quin, 2H, *J* = 7.3 Hz, CH₂-CH₂-CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 178.2, 164.5, 163.4, 161.2, 144.9, 133.5, 132.9, 132.4, 131.9, 130.6, 130.1, 129.8, 127.0, 122.1, 115.9, 113.6, 32.9, 27.1, 21.8. HRMS: calcd, *m/z* = 394.04075; found, *m/z* = 394.03928.

4-(4-(3,4-Dichlorophenyl)-5-(3-methoxyphenyl)oxazol-2-yl)-butanoic Acid (28f). (3-Methoxyphenyl)boronic acid (27f) was used as the coupling reagent. Yield: 41 mg (50%). *R*_f: 0.24 (7:3 Hex/EtOAc + 0.1% AcOH). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.77 (sd, 1H, *J* = 2.0 Hz, *Ph*-3,4-diCl-2H), 7.65 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, *Ph*-3,4-diCl-5H), 7.52 (dd, 1H, *J* = 8.4 Hz, 2.0 Hz, *Ph*-3,4-diCl-6H), 7.38 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz, *Ph*-3-OCH₃-5H), 6.96–7.14 (m, 3 H, *Ph*-3-OCH₃-2H,4H,6H), 3.74 (s, 3H, -CH₃), 2.86 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, -CH₂-C(O)), 2.39 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, oxazole-CH₂-), 1.98 (quin, 2H, *J* = 7.3 Hz, CH₂-CH₂-CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 174.0, 163.2, 159.5, 145.5, 132.7, 132.1, 131.4, 130.9, 130.5, 130.4, 129.1, 128.9, 127.3, 119.1, 115.2, 112.0, 55.2, 32.8, 26.6, 21.8. HRMS: calcd, *m/z* = 406.06074; found, *m/z* = 406.06096.

4-(5-(3-Cyanophenyl)-4-(3,4-dichlorophenyl)oxazol-2-yl)-butanoic Acid (28g). (3-Cyanophenyl)boronic acid (27g) was used as the coupling reagent. Yield: 32 mg (40%). *R*_f: 0.17 (7:3 Hex/EtOAc + 0.1% AcOH). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.01 (s, 1H, *Ph*-3,4-diCl-2H), 7.84 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, *Ph*-3,4-diCl-5H), 7.89 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz, *Ph*-3,4-diCl-6H), 7.76 (st, 1H, *J* = 1.9 Hz, *Ph*-3-CN-2H), 7.60–7.72 (m, 2H, *Ph*-3-CN-4H,5H), 7.49 (dd, 1H, *J* = 8.4 Hz, 2.0 Hz, *Ph*-3-CN-6H), 2.89 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, -CH₂-C(O)), 2.40 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, oxazole-CH₂-), 2.00 (quin, 2H, *J* = 7.3 Hz, CH₂-CH₂-CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 174.0, 163.9, 143.6, 133.4, 132.7, 132.1, 131.6, 131.2, 131.1, 131.0, 130.4, 130.1, 129.2, 129.0, 127.3, 118.1, 112.4, 32.7, 26.6, 21.7. HRMS: calcd, *m/z* = 401.04542; found, *m/z* = 401.04548.

4-(4-(3,4-Dichlorophenyl)-5-(3-(trifluoromethyl)phenyl)oxazol-2-yl)-butanoic Acid (28h). (3-(Trifluoromethyl)phenyl)boronic acid (27h) was used as the coupling reagent. Yield: 11 mg (12%). *R*_f: 0.51 (3:2 Hex/EtOAc + 0.1% AcOH). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.86–7.77 (m, 4H, *Ph*-3,4-diCl, *Ph*-3-CF₃-6H), 7.73–7.67 (m, 2H, *Ph*-3-CF₃-2H,5H), 7.52 (dd, 1H, *J* = 8.4 Hz, 2 Hz, *Ph*-3-CF₃-4H), 2.90 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, -CH₂-C(O)), 2.40 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, oxazole-CH₂-), 1.99 (quin, 2H, *J* = 7.4 Hz, CH₂-CH₂-CH₂). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 173.8, 163.6, 143.8, 130.5, 132.0, 131.3, 130.8, 130.7, 130.3, 130.2, 129.7, 129.5, 128.7, 127.2, 125.5, 124.6, 122.8, 32.5, 26.3, 21.5. HRMS: calcd, *m/z* = 444.03756; found, *m/z* = 444.03752.

4-(4-(3,4-Dichlorophenyl)-5-(*m*-tolyl)oxazol-2-yl)butanoic Acid (28i). *m*-Tolylboronic acid (27i) was used as the coupling reagent.

Yield: 17 mg (21%). *R*_f: 0.16 (98:2 DCM/MeOH + 0.1% AcOH). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.76 (sd, 1H, *J* = 2.0 Hz, *Ph*-3,4-diCl-2H), 7.64 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, *Ph*-3,4-diCl-5H), 7.51 (dd, 1H, *J* = 8.4 Hz, 2.0 Hz, *Ph*-3,4-diCl-6H), 7.22–7.41 (m, 4H, *Ph*-3-CH₃), 2.86 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, -CH₂-C(O)), 2.39 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, oxazole-CH₂-), 2.32 (s, 3H, -CH₃), 1.98 (quin, 2H, *J* = 7.4 Hz, CH₂-CH₂-CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 173.9, 163.2, 145.9, 138.5, 132.7, 131.8, 131.4, 130.9, 130.4, 130.0, 129.0, 128.6, 127.9, 127.3, 127.0, 124.0, 32.7, 26.6, 21.8, 20.9. HRMS: calcd, *m/z* = 390.06583; found, *m/z* = 390.06567.

4-(4-(3,4-Dichlorophenyl)-5-(3-ethynylphenyl)oxazol-2-yl)-butanoic Acid (28j). (3-Ethynylphenyl)boronic acid (27j) was used as the coupling reagent. Yield: 8 mg (10%). *R*_f: 0.30 (7:3 Hex/EtOAc + 0.1% AcOH). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.79 (sd, 1H, *J* = 2.0 Hz, *Ph*-3,4-diCl-2H), 7.46–7.73 (m, 6H, *Ph*-3,4-diCl-5H,6H, *Ph*-3-C≡CH), 4.30 (s, 1H, C≡CH), 2.90 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, -CH₂-C(O)), 2.41 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, oxazole-CH₂-), 2.01 (quin, 2H, *J* = 7.3 Hz, CH₂-CH₂-CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 174.0, 163.6, 144.6, 132.6, 132.4, 132.3, 131.8, 131.6, 131.5, 131.0, 128.9, 128.7, 128.5, 127.3, 127.2, 122.6, 82.5, 81.8, 32.7, 26.6, 21.7. HRMS: calcd, *m/z* = 400.05018; found, *m/z* = 400.05005.

4-(5-(3-Chlorophenyl)-4-(3,4-dichlorophenyl)oxazol-2-yl)-butanoic Acid (28k). (3-Chlorophenyl)boronic acid (27k) was used as the coupling reagent. Yield: 4 mg (5%). *R*_f: 0.47 (3:2 Hex/EtOAc + 0.1% AcOH). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.78 (sd, 1H, *J* = 2.0 Hz, *Ph*-3,4-diCl-2H), 7.69 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, *Ph*-3,4-diCl-5H), 7.58–7.63 (m, 1H, *Ph*-3,4-diCl-6H), 7.47–7.54 (m, 4H, *Ph*-3-Cl), 2.88 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, -CH₂-C(O)), 2.39 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, oxazole-CH₂-), 1.99 (quin, 2H, *J* = 7.3 Hz, CH₂-CH₂-CH₂). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 174.0, 163.7, 144.2, 133.8, 133.0, 132.4, 131.6, 131.1, 130.8, 129.9, 129.1, 129.0, 127.4, 126.3, 125.3, 39.9, 32.7, 26.6, 21.7. HRMS: calcd, *m/z* = 410.01120; found, *m/z* = 410.01126.

Cloning of the sEH N-Terminal Domain. The cloning of the construct encoding amino acids 1–222 of sEH with a hexa-His tag at the N-terminus as well as a thrombin cleavage site followed by a second hexa-His tag at the C-terminus was published previously¹⁶ and was used for activity assays.

For the crystallization, DSF, and ITC experiments, a new construct was created. The sEH-P sequence covering the amino acids 2–224 of sEH was amplified by PCR (forward primer, ccccggtaccct-gcgcgcgccgctcttcg; reverse primer, ccccctcgagtt-aggtattgagaagctggattccgg) from the full-length sEH construct published by Hahn et al.²⁴ The PCR product was cloned into a pET29b derivative (in which the expressed ORF was changed to the one from pBH4 with a TEV site) using *Kpn*I and *Xho*I. The target protein was expressed as a fusion protein with an N-terminal hexa-His tag followed by a TEV recognition and cleavage site. The plasmid carried a kanamycin resistance gene.

Protein Expression and Purification. The sEH-P for activity assays and the sEH-H used in the performed activity assays and DSF experiments were expressed and purified as published previously by Klingler et al.¹⁶ and Lukin et al.²⁵ The proteins for the assay were flash-frozen in liquid nitrogen after the addition of 20% v/v glycerol and stored at -80 °C.

The expression of sEH-P for the crystallization, DSF, and ITC experiments was done according to previously published expression of full-length sEH,²⁴ while for the purification a modified protocol was used. In brief, 10 mL of the preculture of the BL21(DE3) cells, cotransformed with the sEH-P plasmid as well as a coplasmid for the expression of rare codon tRNAs, was used to inoculate a 1 L culture of autoinduction medium ZYP5052²⁶ supplemented with chloramphenicol (35 μg/mL) and kanamycin (100 μg/mL). The cultures were incubated at 37 °C and 180 rpm for 3–4 h, and then the temperature was reduced to 16 °C. The cultures were harvested after 36 h by centrifugation (5554g, 4 °C, 20 min). The resulting pellets were stored at -20 °C or directly processed. For ITC measurements, expression pellets were resuspended in buffer A (50 mM Bis-Tris pH 7.2 (HCl), 500 mM NaCl, 5 mM β-ME, 5% v/v glycerol, 20 mM imidazole pH 7 (HCl)) with one tablet of Complete EDTA Free

Protease Inhibitor Mix (Roche, Basel, Switzerland) and a trace amount of DNase I (Applichem, Darmstadt, Germany) and then purified as follows. After passing 20 times through an Invensys APV-1000 homogenizer (APV Systems, Denmark), the resulting solution was subsequently centrifuged at 43992g for 60 min at 4 °C to pellet the debris. The supernatant was filtered through a 0.45 μm syringe filter and loaded onto a 5 mL HisTrap HP column (GE Healthcare, Solingen, Germany) pre-equilibrated with buffer A. The column was washed with 1% v/v buffer B (buffer A with 400 mM instead of 20 mM imidazole pH 7 (HCl)), and then the protein was eluted at 50% v/v buffer B. The protein fraction was concentrated to a final volume of 5 mL using a Centriprep YM-3 filter with a molecular weight cutoff (MWCO) of 3000 Da (Millipore, Germany), filtered through a 0.45 μm syringe filter, and applied to a Superdex 200 HiLoad 16/600 column (GE Healthcare, Germany) equilibrated and run at 1 mL/min in phosphatase assay buffer (50 mM acetate, 10 mM MgCl_2 , pH 5.75 (HCl)) supplemented with an additional 5% v/v glycerol. The concentration of the protein for ITC measurements was determined by absorption measurement with a Nanodrop 2000C micro volume spectrophotometer spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA).

For crystallization expression, pellets were resuspended in buffer C (50 mM Bis-Tris pH 7.2 (HCl), 500 mM NaCl, 1 mM TCEP, 5% v/v glycerol) with recommended volume of Protease Inhibitor Mix. The cells were lysed by sonification before 3 mL of 5% PEI pH 7.5 (HCl) solution was added to 100 mL of cell solution, and the solution was subsequently centrifuged to pellet the debris. The supernatant was loaded onto 5 mL of cobalt beads (GE Healthcare, self-loaded with Co) preequilibrated with buffer C. The beads were subsequently washed with buffer C supplemented with 20, 40, 60, and 250 mM imidazole pH 7 (HCl). The protein mainly eluted with the 60 and 250 mM wash fractions. These fractions were concentrated (Amicon Ultra Centrifugal Filters, MWCO = 3000 Da, Merck Millipore) to a final volume of 5 mL and filtered with a 0.45 μm syringe filter, and the sample was loaded on a Superdex 200 HiLoad 16/600 column (GE Healthcare, Germany) equilibrated and run with crystallization buffer (20 mM Tris, 100 mM NaCl, 0.5 mM TCEP, pH 7.5 (HCl)). The concentration of the protein was determined with a Nanodrop 2000C spectrophotometer. The identity of the protein was verified by intact mass spectrometry (data not shown).

The full-length human, mouse, and rat sEH were expressed in a baculovirus/insect cell system and purified by affinity as described previously.²⁷ The concentrated purified enzymes appeared as single bands upon SDS-PAGE separation and Coomassie Brilliant Blue staining with an estimated purity above 95%. The final preparations had no detectable esterase or glutathione S-transferase activity.²⁸

FDP-Based Phosphatase Assay. The fluorescein diphosphate assay was performed as published previously by Klingler et al.¹⁶ using frozen sEH-P as well as full-length human, mouse, and rat sEH. In brief, the assay was performed in a black 96-well microplate in which 1 μL of compound in DMSO (or DMSO only in the case of the positive control) was mixed with 89 μL of protein solution (final concentration of 0.1 μM for sEH-P, full-length human sEH, and full-length rat sEH and 0.01 μM for full-length mouse sEH) in phosphatase assay buffer (50 mM acetate, 10 mM MgCl_2 , pH 5.75) supplemented with 0.01% w/v Triton X-100. For the blank, assay buffer without protein was used. The plates were incubated at RT for 30 min to allow binding of the inhibitor. To start the reaction, 10 μL of FDP solution (10 μM final concentration) in assay buffer was added, and the fluorescence changes ($\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$) were detected at 30 time points over the duration of 30 min using an Infinite F200 PRO plate reader (Tecan, Crailsheim, Germany). All of the samples were measured in triplicate on the plate as well as in three separate experiments. The percent inhibition was calculated relative to the activities of the blank well (without protein) and positive control well (without inhibitor). To calculate IC_{50} values, data obtained from measurements with at least six different inhibitor concentrations were fitted with a sigmoidal dose–response function using GraphPad Prism software (version 5.03; GraphPad Software, Inc.).

DiFMUP-Based Phosphatase Assay. The 6,8-difluoro-4-methylumbelliferyl phosphate (DiFMUP) (Life Technologies) assay was done to determine the K_M of DiFMUP as well as the K_i value of **22b** for the sEH-P and full-length human sEH. In brief, the assay was performed in a black 96-well microplate in which different substrate concentrations (final concentrations in 100 μL : 600, 400, 300, 200, 100, 30, 10, 3, 1, 0.3, 0.1, and 0 μM) of substrate dissolved in DMSO (or pure DMSO in the case of 0 μM) and acetate buffer (50 mM acetate, 10 mM MgCl_2 , pH 5.75) supplemented with Triton X-100 to a final concentration of 0.01% w/v as well as different inhibitor concentrations (final concentrations of **22b**: 10, 3, 1, 0.3, 0.1, 0.03, 0.01 μM as well as pure DMSO). The protein inhibitor solution was incubated at RT for 30 min to allow binding of the inhibitor, and then the reaction was started by adding the inhibitor solution to the substrate mix in the plate. The total concentration of DMSO in the assay volume was 3.5% v/v. The fluorescence changes ($\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 465 \text{ nm}$) were detected at 45 time points over the duration of 45 min using an Infinite F200 PRO plate reader. All conditions were measured in triplicate on the plate. The fluorescence changes in the linear phase of the reaction were determined by a linear fit, and the mean and standard deviation were calculated in Microsoft Excel. Values of the different measurements were exported to GraphPad Prism (version 7.05) and analyzed by a mixed-model inhibition fit. The K_M value for the DiFMUP was determined from the data of the DMSO measurement using a Michaelis–Menten fit.

PHOME-Based Hydrolase Assay. The fluorescence-based sEH hydrolase activity assay was performed as described previously^{25,29} in a 96-well format with some minor modifications.

In short, sEH (0.1 μM final concentration for all tested proteins) was dissolved in hydrolase assay buffer (Bis-Tris buffer, pH 7) supplemented with 0.1 mg/mL BSA as well as Triton-X 100 to a final concentration of 0.01%. Protein solution (89 μL) was incubated with 1 μL of different concentrations of compounds (final DMSO concentration 1%) for 30 min at room temperature. The reaction was started by addition of 10 μL of a cyano(6-methoxy-2-naphthalenyl)methyl 3-phenyloxiran-2-ylacetate (PHOME) solution (to a final concentration of 50 μM). Hydrolysis of the nonfluorescent substrate by sEH to release fluorescent 6-methoxynaphthaldehyde was measured ($\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 465 \text{ nm}$) using a Tecan Infinite F200 PRO plate reader. The reaction was monitored over a duration of 45 min (one point every minute). A blank control (no protein and no compound) and a positive control (no compound) were carried out as well. All of the measurements were performed in triplicate.

DSF Experiments. Differential scanning fluorimetry³⁰ was performed in a PCR plate at a total volume of 40 μL . sEH-H and sEH-P ($C_{\text{final}} = 5 \mu\text{M}$), Triton X-100 ($C_{\text{final}} = 0.001\% \text{ w/v}$), and SYPRO Orange (Thermo Fisher Scientific GmbH, Braunschweig, Germany) ($C_{\text{final}} = 2.5\times$) were mixed with either phosphatase assay buffer (50 mM acetate, 10 mM MgCl_2 , pH 5.75) or hydrolase assay buffer (Bis-Tris buffer, pH 7) and the corresponding inhibitors. All of the inhibitors were tested at a fixed concentration of 50 μM (or pure DMSO in the case of the control). To determine the background fluorescence, a sample without protein was prepared, as well as a protein control without inhibitor. The plate was measured on an I-cycler IQ single-color real-time PCR system (MyiQiCycler, BioRad) with an excitation wavelength of 490 nm and emission wavelength of 570 nm. The emission was monitored while the temperature was increased at 0.2 °C per 24 s (25–79.80 °C). Data from the sEH-P measurements were analyzed by determining the maximum of the first derivative curve given by MyIQ 1.0 software in Microsoft Excel after calculation of the mean of the first derivative curves of the triplicates and data normalization. The temperature at the local maximum was assumed to be the melting point. For sEH-H samples, the raw data were analyzed directly in GraphPad Prism (version 5.03) using a Boltzmann sigmoidal fit. The V_{50} value of the fit was considered as the melting temperature. All of the samples were measured in triplicate on

the plate as well as in three separate experiments. The statistical significance of the measured melting points with respect to the DMSO control was determined by a two-tailed *t* test using GraphPad Prism (version 7.05).

Isothermal Titration Calorimetry. ITC experiments were performed on a Nano ITC (TA Instruments, Waters GmbH) in inverse mode, with the protein solution in the 250 μ L syringe and the inhibitor sample in the 940 μ L sample cell. Protein and inhibitor samples were prepared in assay buffer (50 mM acetate, 10 mM MgCl₂, 5% v/v glycerol, pH 5.75) supplemented with DMSO to a final concentration of 2%. The fresh protein solution used in the experiments had a fixed concentration of 185 μ M. All of the measurements were performed at 25 °C with a stirring speed of 350 rpm. The number of titration steps (20–25) and the volume (8–10 μ L) were adjusted according to the specific measurement. The delay between the injections was 200 s. All of the tested inhibitors were prepared as 50 mM DMSO stock solutions. The inhibitor samples were prepared with assay buffer, adjusting the final DMSO concentration in the sample to 2% v/v, while the concentration of inhibitor was chosen to optimize the shape of the curve. The gained data were analyzed using NanoAnalyze Data Analysis (version 3.5.0, TA Instruments).

Crystallization. Fresh sEH-P was concentrated to a concentration of 30 mg/mL, and then 22d was added as a 50 mM DMSO stock solution to a final DMSO concentration of 2.08% v/v in the sample. After a 1 h incubation on ice, the solution was centrifuged at maximum speed for 10 min (4 °C). The supernatant was used in 96-well screens (JCSG7) via the sitting-drop vapor diffusion method, mixing protein and reservoir buffer in three different ratios (50 nL + 100 nL, 75 nL + 75 nL, and 100 nL + 50 nL). Crystals appeared in the 20 °C screen after a few days in the well containing 25% w/v PEG3350, 0.1 M Bis-Tris pH 5.5 as the reservoir buffer. The crystals were transferred into precipitant solution supplemented with 25% ethylene glycol for 1 min before flash-freezing in liquid nitrogen. Diffraction of the crystals was checked in house at the SGC.

X-ray diffraction data for good diffracting crystals were collected at beamline station I02 at the Diamond Light Source (Oxfordshire, England). All of the diffraction data were obtained from a single crystal, and the data reduction was done with xia2³¹ (0.4.0.291-ga780859-dials-1.1) while the scaling was done with SCALA.^{32,33} The initial protein structure was determined at a resolution of 1.55 Å by molecular replacement with the PHASER program³⁴ within the PHENIX software package³⁵ using a truncated version of the full-length sEH structure (PDB code 5ALU) in which coordinates of heteroatoms (water and ligands) were excluded from the starting model.

After several iterative rounds of model building with COOT³⁶ into the $2F_o - F_c$ electron density map, the model containing the polypeptide chain and the ligand was refined³⁷ to final R_{work} and R_{free} values of 0.2034 and 0.2305, respectively, using the *phenix.refine* program³⁸ in the PHENIX software package (version: 1.10.1_2155). The graphical representations were made using MOE (Chemical Computing Group, Montreal, Canada). Statistics of data collection and structural refinement were generated using the “Phenix table one” tool and are summarized in Table 7. The coordinates and structure factor amplitudes for 22d have been deposited in the Protein Data Bank as entry 5MWA.

Cyclooxygenase Assay. COX-1 and COX-2 inhibitory activity and selectivity assays were carried out using human platelets and monocytes, respectively.^{39,40} Briefly, washed human platelets, treated with increasing concentrations of the tested compounds, were challenged with calcium ionophore A23187 in order to stimulate COX-1-dependent thromboxane A₂ (TXA₂) production. TXB₂ (a stable TXA₂ metabolite) was evaluated in the supernatant.

COX-2 activity was measured in monocytes resuspended in HBSS in order to avoid compound binding to plasma protein. COX-2 inhibition was evaluated by quantifying prostaglandin E₂ (PGE₂) production in LPS-challenged preparations pretreated with increasing concentrations of the tested compounds. The PGE₂ and TXB₂ concentrations were evaluated by liquid chromatography–tandem

Table 7. Data Collection and Refinement Statistics^a

wavelength	0.979490 Å
resolution range	42.86–1.55 (1.605–1.55)
space group	<i>P</i> ₂ , <i>1</i> , <i>2</i> ₁
unit cell	52.09 54.11 75.44 90 90 90
total reflections	197971 (19739)
unique reflections	31021 (1506)
multiplicity	6.4 (6.6)
completeness (%)	0.89 (0.48)
mean <i>I</i> / σ (<i>I</i>)	15.21 (2.68)
Wilson B-factor	14.31
R_{merge}	0.05117 (0.4581)
R_{meas}	0.05583 (0.4973)
CC1/2	0.999 (0.935)
CC*	1 (0.983)
reflections used in refinement	28201 (1506)
reflections used for R_{free}	1420 (90)
R_{work}	0.2034 (0.2306)
R_{free}	0.2305 (0.2527)
CC _{work}	0.942 (0.853)
CC _{free}	0.927 (0.800)
no. of non-H atoms	1766
no. of macromolecules	1634
no. of ligands	29
no. of protein residues	209
RMS (bonds)	0.014
RMS (angles)	1.23
Ramachandran favored (%)	98.52
Ramachandran allowed (%)	1.48
Ramachandran outliers (%)	0
rotamer outliers (%)	0.56
clash score	2.98
average B-factor	18.49
macromolecules B-factor	18.22
ligands B-factor	9.40
solvent B-factor	25.35

^aStatistics for the highest-resolution shell are shown in parentheses.

mass spectrometry using isotopic dilution of the deuterated internal standards (ISs) PGE₂-*d*₄ and TXB₂-*d*₄ as previously described.³⁹ Briefly, samples were spiked with IS and an aliquot injected into an Agilent 1100 liquid chromatograph. Chromatography was carried out using a reversed phase eluted with a linear gradient from 25 to 100% solvent B (65:35 methanol/acetonitrile) over 10 min (solvent A: 0.05% acetic acid pH 6 with ammonia). The effluent from the HPLC column was directly infused into an API4000 triple-quadrupole mass spectrometer operated in negative ion mode, monitoring the following specific transitions: *m/z* 351 → 271 for PGE₂, *m/z* 355 → 275 for PGE₂-*d*₄, *m/z* 369 → 169 TXB₂, and *m/z* 373 → 173 for TXB₂-*d*₄. Quantitation was carried out using standard curves obtained with synthetic standards.

Hybrid Reporter Gene Assays for PPAR α / γ / δ , LXR α / β , RXR α , and FXR. *Plasmids.* The Gal4 fusion receptor plasmids pFA-CMV-hPPAR α -LBD,⁴¹ pFA-CMV-hPPAR γ -LBD,⁴¹ pFA-CMV-hPPAR δ -LBD,⁴¹ pFA-CMV-hLXR α -LBD,⁴² pFA-CMV-hLXR β -LBD,⁴² pFA-CMV-hRXR α -LBD,⁴³ and pFA-CMV-hFXR-LBD coding for the hinge region and ligand binding domain (LBD) of the canonical isoform of the respective nuclear receptor were reported previously. pFR-Luc (Stratagene) was used as the reporter plasmid, and pRL-SV40 (Promega) was used for normalization of the transfection efficiency and cell growth.

Assay Procedure. HEK293T cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) high glucose supplemented with 10% FCS, sodium pyruvate (1 mM), penicillin (100 units/mL), and streptomycin (100 μ g/mL) at 37 °C and 5% CO₂. The day before

transfection, HEK293T cells were seeded in 96-well plates (2.5×10^4 cells/well). Before transfection, the medium was changed to Opti-MEM without supplements. Transient transfection was carried out using Lipofectamine LTX reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol with pFR-Luc (Stratagene), pRL-SV40 (Promega), and pFA-CMV-hNR-LBD. Five hours after transfection, the medium was changed to Opti-MEM supplemented with penicillin (100 units/mL) and streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and now additionally containing 0.1% DMSO and the respective test compound or 0.1% DMSO alone as an untreated control. Each concentration was tested in triplicate, and each experiment was repeated independently at least three times. Following overnight (12–14 h) incubation with the test compounds, the cells were assayed for luciferase activity using the Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) according to the manufacturer's protocol. Luminescence was measured with an Infinite M200 luminometer (Tecan Deutschland GmbH). Normalization of the transfection efficiency and cell growth was done by dividing the firefly luciferase data by the *Renilla* luciferase data and multiplying the value by 1000, resulting in relative light units (RLUs). Fold activation was obtained by dividing the mean RLU of a test compound at a given concentration by the mean RLU of the untreated control. Relative activation was obtained by dividing the fold activation of a test compound at a given concentration by the fold activation of the respective reference agonist at 1 μM (PPAR α , GW7647; PPAR γ , pioglitazone; PPAR δ , L165,041; LXR α/β , T0901317; RXR α , bexarotene; FXR, GW4064). All of the hybrid assays were validated with the above-mentioned reference agonists, which yielded EC₅₀ values in agreement with the literature.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publication Web site at DOI: The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b00445.

DSF experiments; experimental procedures of the performed animal experiments, including details about animals, surgery, treatment overview, sample collection, quantification of **22b**, and determination of rat plasma levels of sEH substrates and metabolites; and procedures and results of PBMC experiments (PDF)

Molecular SMILES strings and IC₅₀ values (CSV)

Accession Codes

Coordinates and structure factors for **22d** have been deposited in the Protein Data Bank with code 5MWA.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: proschak@pharmchem.uni-frankfurt.de.

ORCID

Apirat Chaikuad: 0000-0003-1120-2209

Bruce D. Hammock: 0000-0003-1408-8317

Daniel Merk: 0000-0002-5359-8128

Stefan Knapp: 0000-0001-5995-6494

Ewgenij Proschak: 0000-0003-1961-1859

Present Address

•G.E.R., C.B., A.S.: Department of Pharmaceutical Sciences, University of Milan, Via Colombo 60, Milano.

Author Contributions

[†]J.S.K. and S.W. contributed equally.

Funding

This work was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (Sachbeihilfe PR1405/2-2; SFB 1039 Teilpro-

jekt A07; Heisenberg-Proessur PR1405/4-1) and by the research funding program Landes-Offensive zur Entwicklung Wissenschaftlich-ökonomischer Exzellenz (LOEWE) of the State of Hessen, Research Center for Translational Medicine and Pharmacology (TMP). This work was supported in part by NIEHS Grant ES02710 and NIEHS Superfund Grant P42 ES04699. A.C. acknowledges funding by the SFB autophagy. A.C. and S.K. are grateful for support by the German Cancer Network DKTK and the SGC, a registered charity (no. 1097737) that receives funds from AbbVie, Bayer Pharma AG, Boehringer Ingelheim, Canada Foundation for Innovation, Eshelman Institute for Innovation, Genome Canada through the Ontario Genomics Institute [OGI-055], Innovative Medicines Initiative (EU/EFPIA) [ULTRA-DD Grant 115766], Janssen, Merck KGaA, MSD, Novartis Pharma AG, the Ontario Ministry of Research, Innovation and Science (MRIS), Pfizer, São Paulo Research Foundation-FAPESP, Takeda, and the Wellcome Trust. This work was cosupported in part for the in vivo study by the French National Research Agency (ANR-16-CE17-0012), European Union, and Normandie Regional Council. Europe gets involved in Normandie with the European Regional Development Fund (ERDF).

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The crystal diffraction experiments were performed on beamline station I02 at the Diamond Light Source (Oxfordshire, England). We thank Dr. F. J. Sorrell and Dr. N. Fox for assistance and support in using the beamline.

■ ABBREVIATIONS USED

BCA assay, bicinchoninic acid assay; CIU, *N*-cyclohexyl-*N'*-(4-iodophenyl)urea; COX-1, cyclooxygenase 1; COX-2, cyclooxygenase 2; CV, coefficient of variance; DMF, *N,N*-dimethylformamide; DMSO, dimethyl sulfoxide; DSF, differential scanning fluorimetry; EET, epoxyeicosatrienoic acid; EpFA, epoxy fatty acid; FCS, fetal calf serum; FDP, fluorescein diphosphate; FXR, farnesoid X receptor; HTS, high-throughput screening; IS, internal standard; ITC, isothermal titration calorimetry; LBD, ligand binding domain; LDA, lithium diisopropylamide; LXR, liver X receptor; NBS, *N*-bromosuccinimide; ORF, open reading frame; PGE2, prostaglandin E2; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; RLU, relative light units; ROS, reactive oxygen species; RXR, retinoid X receptor; SAR, structure–activity relationship; SDS, sodium dodecyl sulfate; sEH, soluble epoxide hydrolase; sEH-H, C-terminal/hydrolase domain of sEH; sEHI, inhibitors of the C-terminal domain of sEH; sEH-P, N-terminal/phosphatase domain of sEH; TBAF, tetrabutylammonium fluoride; TCEP, tris(2-carboxyethyl)phosphine; TEV, tobacco etch virus; THF, tetrahydrofuran; TMSCN, trimethylsilyl cyanide; TXA2, thromboxane A2; TXB2, thromboxane B2

■ REFERENCES

- (1) Arand, M.; Cronin, A.; Oesch, F.; Mowbray, S. L.; Alwyn Jones, T. The Telltale Structures of Epoxide Hydrolases. *Drug Metab. Rev.* **2003**, *35* (4), 365–383.
- (2) Wagner, K. M.; McReynolds, C. B.; Schmidt, W. K.; Hammock, B. D. Soluble Epoxide Hydrolase as a Therapeutic Target for Pain, Inflammatory and Neurodegenerative Diseases. *Pharmacol. Ther.* **2017**, *180*, 62–76.

- (3) Inceoglu, B.; Bettaieb, A.; Haj, F. G.; Gomes, A. V.; Hammock, B. D. Modulation of Mitochondrial Dysfunction and Endoplasmic Reticulum Stress Are Key Mechanisms for the Wide-Ranging Actions of Epoxy Fatty Acids and Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitors. *Prostaglandins Other Lipid Mediators* **2017**, *133*, 68–78.
- (4) Lazaar, A. L.; Yang, L.; Boardley, R. L.; Goyal, N. S.; Robertson, J.; Baldwin, S. J.; Newby, D. E.; Wilkinson, I. B.; Tal-Singer, R.; Mayer, R. J.; Cheriyan, J. Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Adverse Event Profile of GSK2256294, a Novel Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitor. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2016**, *81* (5), 971–979.
- (5) Cronin, A.; Mowbray, S.; Dürk, H.; Homburg, S.; Fleming, I.; Fisslthaler, B.; Oesch, F.; Arand, M. The N-Terminal Domain of Mammalian Soluble Epoxide Hydrolase Is a Phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100* (4), 1552–1557.
- (6) Newman, J. W.; Morisseau, C.; Harris, T. R.; Hammock, B. D. The Soluble Epoxide Hydrolase Encoded by EPXH2 Is a Bifunctional Enzyme with Novel Lipid Phosphate Phosphatase Activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100* (4), 1558–1563.
- (7) Tran, K. L.; Aronov, P. A.; Tanaka, H.; Newman, J. W.; Hammock, B. D.; Morisseau, C. Lipid Sulfates and Sulfonates Are Allosteric Competitive Inhibitors of the N-Terminal Phosphatase Activity of the Mammalian Soluble Epoxide Hydrolase. *Biochemistry* **2005**, *44* (36), 12179–12187.
- (8) Morisseau, C.; Schebb, N. H.; Dong, H.; Ulu, A.; Aronov, P. A.; Hammock, B. D. Role of Soluble Epoxide Hydrolase Phosphatase Activity in the Metabolism of Lysophosphatidic Acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *419* (4), 796–800.
- (9) Oguro, A.; Imaoka, S. Lysophosphatidic Acids Are New Substrates for the Phosphatase Domain of Soluble Epoxide Hydrolase. *J. Lipid Res.* **2012**, *53* (3), 505–512.
- (10) De Vivo, M.; Ensing, B.; Dal Peraro, M.; Gomez, G. A.; Christianson, D. W.; Klein, M. L. Proton Shuttles and Phosphatase Activity in Soluble Epoxide Hydrolase. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (2), 387–394.
- (11) Kramer, J.; Proschak, E. Phosphatase Activity of Soluble Epoxide Hydrolase. *Prostaglandins Other Lipid Mediators* **2017**, *133*, 88–92.
- (12) Hou, H.-H.; Liao, Y.-J.; Hsiao, S.-H.; Shyue, S.-K.; Lee, T.-S. Role of Phosphatase Activity of Soluble Epoxide Hydrolase in Regulating Simvastatin-Activated Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 13524.
- (13) Enayetallah, A. E.; Grant, D. F. Effects of Human Soluble Epoxide Hydrolase Polymorphisms on Isoprenoid Phosphate Hydrolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *341* (1), 254–260.
- (14) Matsumoto, N.; Suzuki, E.; Ishikawa, M.; Shirafuji, T.; Hasumi, K. Soluble Epoxide Hydrolase as an Anti-Inflammatory Target of the Thrombolytic Stroke Drug SMTP-7. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289* (52), 35826–35838.
- (15) Morisseau, C.; Sahdeo, S.; Cortopassi, G.; Hammock, B. D. Development of an HTS Assay for EPHX2 Phosphatase Activity and Screening of Nontargeted Libraries. *Anal. Biochem.* **2013**, *434* (1), 105–111.
- (16) Klingler, F.-M.; Wolf, M.; Wittmann, S.; Gribbon, P.; Proschak, E. Bacterial Expression and HTS Assessment of Soluble Epoxide Hydrolase Phosphatase. *J. Biomol. Screening* **2016**, *21* (7), 689–694.
- (17) Stork, G.; Maldonado, L. Anions of Protected Cyanohydrins as Acyl Carbanion Equivalents and Their Use in a New Synthesis of Ketones. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93* (20), 5286–5287.
- (18) Topliss, J. G. Utilization of Operational Schemes for Analog Synthesis in Drug Design. *J. Med. Chem.* **1972**, *15* (10), 1006–1011.
- (19) Argiriadi, M. A.; Morisseau, C.; Goodrow, M. H.; Dowdy, D. L.; Hammock, B. D.; Christianson, D. W. Binding of Alkylurea Inhibitors to Epoxide Hydrolase Implicates Active Site Tyrosines in Substrate Activation. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (20), 15265–15270.
- (20) Heroven, C.; Georgi, V.; Ganotra, G. K.; Brennan, P.; Wolfreys, F.; Wade, R. C.; Fernández-Montalván, A. E.; Chaikuad, A.; Knapp, S. Halogen–Aromatic π Interactions Modulate Inhibitor Residence Times. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, *57* (24), 7220–7224.
- (21) Falke, H.; Chaikuad, A.; Becker, A.; Loäc, N.; Lozach, O.; Abu Jhaisha, S.; Becker, W.; Jones, P. G.; Preu, L.; Baumann, K.; Knapp, S.; Meijer, L.; Kunick, C. 10-Iodo-11H-Indolo[3,2-c]Quinoline-6-Carboxylic Acids Are Selective Inhibitors of DYRK1A. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (7), 3131–3143.
- (22) Öster, L.; Tapani, S.; Xue, Y.; Käck, H. Successful Generation of Structural Information for Fragment-Based Drug Discovery. *Drug Discovery Today* **2015**, *20* (9), 1104–1111.
- (23) Barbosa-Sicard, E.; Frömel, T.; Keserü, B.; Brandes, R. P.; Morisseau, C.; Hammock, B. D.; Braun, T.; Krüger, M.; Fleming, I. Inhibition of the Soluble Epoxide Hydrolase by Tyrosine Nitration. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (41), 28156–28163.
- (24) Hahn, S.; Achenbach, J.; Buscató, E.; Klingler, F.-M.; Schroeder, M.; Meirer, K.; Hieke, M.; Heering, J.; Barbosa-Sicard, E.; Loehr, F.; Fleming, I.; Doetsch, V.; Schubert-Zsilavecz, M.; Steinhilber, D.; Proschak, E. Complementary Screening Techniques Yielded Fragments That Inhibit the Phosphatase Activity of Soluble Epoxide Hydrolase. *ChemMedChem* **2011**, *6* (12), 2146–2149.
- (25) Lukin, A.; Kramer, J.; Hartmann, M.; Weizel, L.; Hernandez-Olmos, V.; Falahati, K.; Burghardt, I.; Kalinchenkova, N.; Bagnyukova, D.; Zhurilo, N.; Rautio, J.; Forsberg, M.; Ihalainen, J.; Auriola, S.; Leppänen, J.; Konstantinov, I.; Pogoryelov, D.; Proschak, E.; Dar'in, D.; Krasavin, M. Discovery of Polar Spirocyclic Orally Bioavailable Urea Inhibitors of Soluble Epoxide Hydrolase. *Bioorg. Chem.* **2018**, *80*, 655–667.
- (26) Studier, F. W. Protein Production by Auto-Induction in High Density Shaking Cultures. *Protein Expression Purif.* **2005**, *41* (1), 207–234.
- (27) Morisseau, C.; Beetham, J. K.; Pinot, F.; Debernard, S.; Newman, J. W.; Hammock, B. D. Cress and Potato Soluble Epoxide Hydrolases: Purification, Biochemical Characterization, and Comparison to Mammalian Enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *378* (2), 321–332.
- (28) Morisseau, C.; Merzlikin, O.; Lin, A.; He, G.; Feng, W.; Padilla, I.; Denison, M. S.; Pessah, I. N.; Hammock, B. D. Toxicology in the Fast Lane: Application of High-Throughput Bioassays to Detect Modulation of Key Enzymes and Receptors. *Environ. Health Perspect.* **2009**, *117* (12), 1867–1872.
- (29) Wolf, N. M.; Morisseau, C.; Jones, P. D.; Hock, B.; Hammock, B. D. Development of a High-Throughput Screen for Soluble Epoxide Hydrolase Inhibition. *Anal. Biochem.* **2006**, *355* (1), 71–80.
- (30) Niesen, F. H.; Berglund, H.; Vedadi, M. The Use of Differential Scanning Fluorimetry to Detect Ligand Interactions That Promote Protein Stability. *Nat. Protoc.* **2007**, *2* (9), 2212–2221.
- (31) Winter, G.; Lobley, C. M. C.; Prince, S. M. Decision Making in Xia2. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2013**, *69* (7), 1260–1273.
- (32) Winn, M. D.; Ballard, C. C.; Cowtan, K. D.; Dodson, E. J.; Emsley, P.; Evans, P. R.; Keegan, R. M.; Krissinel, E. B.; Leslie, A. G. W.; McCoy, A.; McNicholas, S. J.; Murshudov, G. N.; Pannu, N. S.; Potterton, E. A.; Powell, H. R.; Read, R. J.; Vagin, A.; Wilson, K. S. Overview of the CCP4 Suite and Current Developments. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2011**, *67* (4), 235–242.
- (33) Evans, P. R. An Introduction to Data Reduction: Space-Group Determination, Scaling and Intensity Statistics. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2011**, *67* (4), 282–292.
- (34) McCoy, A. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Adams, P. D.; Winn, M. D.; Storoni, L. C.; Read, R. J. Phaser Crystallographic Software. *J. Appl. Crystallogr.* **2007**, *40* (4), 658–674.
- (35) Adams, P. D.; Afonine, P. V.; Bunkóczi, G.; Chen, V. B.; Davis, I. W.; Echols, N.; Headd, J. J.; Hung, L.-W.; Kapral, G. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; McCoy, A. J.; Moriarty, N. W.; Oeffner, R.; Read, R. J.; Richardson, D. C.; Richardson, J. S.; Terwilliger, T. C.; Zwart, P. H. PHENIX: A Comprehensive Python-Based System for Macromolecular Structure Solution. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2010**, *66* (2), 213–221.
- (36) Emsley, P.; Lohkamp, B.; Scott, W. G.; Cowtan, K. Features and Development of Coot. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2010**, *66* (4), 486–501.

(37) Moriarty, N. W.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Adams, P. D. Electronic Ligand Builder and Optimization Workbench (ELBOW): A Tool for Ligand Coordinate and Restraint Generation. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2009**, *65* (10), 1074–1080.

(38) Afonine, P. V.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Echols, N.; Headd, J. J.; Moriarty, N. W.; Mustyakimov, M.; Terwilliger, T. C.; Urzhumtsev, A.; Zwart, P. H.; Adams, P. D. Towards Automated Crystallographic Structure Refinement with *phenix.refine*. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2012**, *68* (4), 352–367.

(39) Hoxha, M.; Buccellati, C.; Capra, V.; Garella, D.; Cena, C.; Rolando, B.; Fruttero, R.; Carnevali, S.; Sala, A.; Rovati, G. E.; Bertinaria, M. In Vitro Pharmacological Evaluation of Multitarget Agents for Thromboxane Prostanoid Receptor Antagonism and COX-2 Inhibition. *Pharmacol. Res.* **2016**, *103*, 132–143.

(40) Bertinaria, M.; Shaikh, M. A. A. G.; Buccellati, C.; Cena, C.; Rolando, B.; Lazzarato, L.; Fruttero, R.; Gasco, A.; Hoxha, M.; Capra, V.; Sala, A.; Rovati, G. E. Designing Multitarget Anti-Inflammatory Agents: Chemical Modulation of the Lumiracoxib Structure toward Dual Thromboxane Antagonists-COX-2 Inhibitors. *ChemMedChem* **2012**, *7* (9), 1647–1660.

(41) Rau, O.; Wurglics, M.; Paulke, A.; Zitzkowski, J.; Meindl, N.; Bock, A.; Dingermann, T.; Abdel-Tawab, M.; Schubert-Zsilavecz, M. Carnosic Acid and Carnosol, Phenolic Diterpene Compounds of the Labiate Herbs Rosemary and Sage, Are Activators of the Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma. *Planta Med.* **2006**, *72* (10), 881–887.

(42) Heitel, P.; Achenbach, J.; Moser, D.; Proschak, E.; Merk, D. DrugBank Screening Revealed Alitretinoin and Bexarotene as Liver X Receptor Modulators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27* (5), 1193–1198.

(43) Flesch, D.; Cheung, S.-Y.; Schmidt, J.; Gabler, M.; Heitel, P.; Kramer, J.; Kaiser, A.; Hartmann, M.; Lindner, M.; Lüddens-Dämgen, K.; Heering, J.; Lamers, C.; Lüddens, H.; Wurglics, M.; Proschak, E.; Schubert-Zsilavecz, M.; Merk, D. Nonacidic Farnesoid X Receptor Modulators. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (16), 7199–7205.

Discussion et perspectives

Mes travaux de thèse établissent un lien entre l'inhibition de l'activité HMT de EZH2 dans les monocytes humains et la surexpression de gènes bivalents impliqués dans les processus d'angiogenèse et de lymphangiogenèse (article de thèse figure 3b). Ces données prédictives ont été confirmées par séquençage d'ARNs suite au traitement des monocytes humains avec le GSK-343 démontrant une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans le processus biologique GO d'angiogenèse (article de thèse figure 4e) incluant le *VEGFA* (article de thèse figure 4a, c et d). Ces résultats, bien que prometteurs, obtenus *in vitro*, donc de façon décontextualisée, n'ont malheureusement, pas pu être confirmés dans notre modèle *in vivo* (article de thèse supplementary table 5). En effet il semble que les monocytes ne soient pas la principale source de facteurs pro-angiogéniques tel que le *Vegfa* (Figure 70 et article de thèse supplementary table 6) lors de la réparation cardiaque post-IDM. Par ailleurs, la durée du traitement avant mise à mort des animaux étant seulement de 8 jours ne permet peut-être pas d'observer des effets sur ces processus, tel que la lymphangiogenèse qui a eu lieu plus tardivement lors de la réparation cardiaque post-IDM [141, 142]. Le nombre d'acteurs cellulaires et moléculaires présent *in vivo* étant nettement plus élevé et incontrôlé pourrait suggérer de reconsidérer le temps de mise à mort des animaux, voire la dose de composé injecté. Notre traitement ne semble pas avoir un impact direct sur ces deux processus mais pourrait les impacter plus tardivement et de façon indirecte en accélérant la cinétique inflammatoire et favorisant la résolution de l'inflammation grâce à l'apparition plus précoce des populations de macrophages immunomodulateurs (M2).

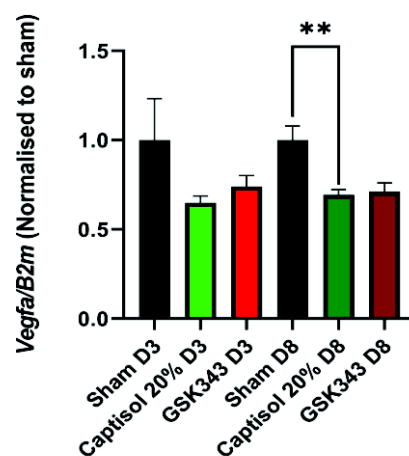


Figure 70 : Expression cardiaque du *Vegfa* post-IDM

Mes travaux de thèse mettent en évidence pour la première fois l'implication de la délocalisation cytoplasmique de EZH2 comme le retrait d'un point de contrôle épigénétique lors de l'engagement des cellules myéloïdes dans une voie de différenciation. La suppression de ce point de contrôle épigénétique facilite la polarisation en macrophages de type M2 par la dérégulation des gènes bivalents. Une telle translocation de EZH2, n'a pour l'heure pas encore été décrite dans les macrophages, mais déjà été documentée dans divers types cellulaires où elle est associée aussi bien à des fonctions physiologiques que pathologiques. En effet, la localisation cytosolique de EZH2 a été mise en évidence dans les lymphocytes T et les fibroblastes. Cette localisation non nucléaire indique une fonction potentielle de EZH2 dans le cytosol, où elle est retrouvée au sein d'un complexe protéique. La présence de ce complexe contenant EZH2 a été associée à la régulation de la polymérisation de l'actine. Les données génétiques soutiennent ce rôle cytosolique de EZH2 dans les cellules T où EZH2 interagit avec Vav1 pour réguler la signalisation médiée par les TCR. L'absence de EZH2 est par ailleurs associée à un défaut d'activation des cellules T et à la prolifération des fibroblastes. Cette fonction cytoplasmique d'EZH2 met en avant le rôle de la méthylation des lysines dans la régulation des processus de signalisation nucléaire et extra-nucléaire [450]. Par ailleurs, EZH2 lorsqu'il se trouve dans le cytoplasme est également impliqué dans la mégacaryopoïèse. Au cours de ce processus, Notch1 induit la translocation cytoplasmique de EZH2. L'interaction de EZH2 avec LIM domain kinase-1 (LIMK1) va ensuite entraîner la réduction de la phosphorylation de la cofiline, protéine déstabilisatrice des filaments d'actine. Cette diminution de l'activité de la cofiline permet de préparer la cellule aux modifications de taille et de forme, nécessaires à la formation des mégacaryocytes [451]. Plus récemment, cette fois-ci dans un contexte pathologique, un autre rôle de EZH2 a été mis en évidence. EZH2 semble impliqué dans le développement des métastases du cancer du sein. De fait, la phosphorylation du résidu Tyr₃₆₇ de EZH2, induite par p38, favorise sa rétention dans le cytoplasme des cellules du cancer du sein. Cela entraîne la liaison de EZH2 à la vinculine ou à d'autres régulateurs du cytosquelette, favorisant ainsi l'adhésion, la migration, l'invasion cellulaire et par conséquent le développement de métastases [452].

La description de ces nouveaux rôles cytoplasmiques de EZH2, est à mettre en relation avec les résultats de séquençage d'ARN, obtenus au cours de ce projet de thèse, liés à

l'amélioration du « *homing* », de la chimiotaxie, de la migration des macrophages M2 et des monocytes traités avec le GSK-343.

Outre, LIMK1 et Vav1, d'autres partenaires cellulaires de EZH2 ont été identifiés et pourraient être impliqués dans sa localisation cytoplasmique au cours de la polarisation en macrophages M2. Parmi les partenaires potentiels on retrouve les longs ARN non codants (*longs non-coding RNA* ou lnc RNA).

Les expériences de RIPseq (RNA Immune-Precipitation-sequencing) permettant d'identifier les lnc RNA tissus spécifiques partenaires de EZH2, confirment son interaction avec les lnc RNAs Cardiac Hypertrophy Associated Epigenetics Regulator (CHAER) [418, 419] et HOX Transcript Antisense RNA (HOTAIR) lnc RNA, dans le sang et le cœur [419]. CHAER interagit directement avec le complexe PRC2 et entraîne l'expression (par inhibition de la répression) des gènes impliqués dans l'hypertrophie cardiaque [418, 419]. HOTAIR interagit avec le complexe PRC2 et favorise l'activité de EZH2 permettant d'augmenter la différenciation des myofibroblastes ainsi que l'expression du collagène et de l' α SMA.

Néanmoins, aucune preuve expérimentale ne permet d'affirmer que ces partenaires pourraient être impliqués dans la localisation cytoplasmique de EZH2 pendant la polarisation en macrophages M2.

Ces interrogations ont abouti à l'initiation d'un projet de recherche au sein du laboratoire visant à identifier dans un premier temps le partenaire de EZH2 responsable localisation cytoplasmique puis, dans un deuxième temps, le domaine de liaison de EZH2 avec ce partenaire. D'une part, il s'agissait d'identifier un potentiel partenaire protéique responsable de la localisation cytoplasmique de EZH2, tel que le suggèrent les études de mutation de la séquence NLS de EZH2 [450]. En effet, la protéine EZH2 pourrait être exportée soit seule soit avec le complexe PRC2, soit avec d'autres protéines ou encore avec des ARN non codants de type lnc RNA. D'autre part, il s'agissait d'élucider si EZH2 est séquestré dans le cytoplasme après sa traduction ou il fait l'objet d'un transport nucléocytoplasmique.

Pour ce faire, il est possible d'envisager des expériences de mutagenèse dirigée pour obtenir des mutants auprès de l'équipe de Celina G.Kleer [453], ou d'avoir recours à l'utilisation de la technologie HaloTag® Technology Promega, pour réaliser de la vidéo

microscopie en temps réel grâce à la surexpression d'une forme de EZH2 fusionnée à une protéine fluorescente HaloTag®.

Dans cette étude nous proposons que le contrôle épigénétique de l'expression des gènes bivalents est médié par la déméthylation de H3K27me3 présente sur le promoteur des gènes bivalents induite par les enzymes épigénétiques JMJD3 et UTX afin de favoriser leur expression. En effet, des études antérieures ont montré que l'IL-4 régule positivement l'expression et l'activité de la JMJD3 dans les monocytes humains. La diminution des niveaux de H3K27me3 au niveau du promoteur *IRF4*, augmente le recrutement de l'ARN polymérase II et favorise l'expression ultérieure de l'ARNm *IRF4* [445]. L'implication de JMJD3 dans la ré-expression de gènes bivalents a été confirmée par l'inhibition de l'expression de *IRF4* après traitement avec un inhibiteur pharmacologique de JMJD3 au GSK-J4 [447].

D'autres études argumentent sur l'implication de UTX dans l'activation des macrophages. Cribbs et collaborateurs, en 2018, démontrent que l'inhibition de UTX, impacte le phénotype de certaines cellules immunitaires.

La stratégie utilisée dans ce projet de thèse qui est celle d'inhiber l'inhibiteur (EZH2) pourrait être combinée à une stratégie visant à promouvoir ou accentuer l'activité de l'enzyme antagoniste de EZH2. Ceci favoriserait la déméthylation de H3K27me3 et permettrait une ré-expression des gènes bivalents, plus rapide ou plus intense, et donc une meilleure expression des gènes de polarisation en M2 pour une meilleure réparation cardiaque post-IDM. Néanmoins, aucune étude ne permet de statuer sur l'identité de l'enzyme antagoniste impliquée dans ce processus. UTX et JMJD3 étant toutes deux candidates, une stratégie d'inhibition de ces enzymes par siRNA est envisageable. Bien que les monocytes macrophages soient réputés pour être difficiles à transfecter, il existe des protocoles par électroporation utilisant la machine Amaxa (Lonza) disponible au sein d'une équipe de notre université.

Mon travail de recherche s'est focalisé sur l'impact bénéfique potentiel de l'inhibition de l'activité méthyltransférase de EZH2 dans le contexte inflammatoire post-IDM. Bien qu'initialement décrit comme un répresseur transcriptionnel par l'ajout de la modification H3K27me3, de plus en plus de preuves s'accumulent sur les fonctions de EZH2

indépendantes de son activité catalytique sur les histones. En effet, EZH2 est capable d'activer la transcription indépendamment des autres protéines du complexe PRC2, notamment en ne modifiant pas que les histones. EZH2, indépendamment de PRC2, est effectivement capable de modifier d'autres protéines. Dans le contexte des glioblastomes multiples, EZH2 interagit avec STAT3 facilitant son activation par phosphorylation [454]. Dans un autre contexte, EZH2 mono méthyle ROR α (*Retinoic acid related orphan nuclear receptor α*). La méthylation de ce récepteur nucléaire suppresseur de tumeur favorise sa reconnaissance et sa dégradation par un complexe contenant une ubiquitine ligase [455]. EZH2 méthyle également Jarid2 permettant la mise en place d'une boucle de régulation de l'activité catalytique du complexe PRC2 [456].

Ce rôle d'activateur transcriptionnel, indépendant de H3K27me₃, est important dans certains types de cancers, participant à leur progression ou à leur malignité. Par exemple dans les cancers du sein, EZH2 interagit avec le récepteur aux œstrogènes (E α) et la β -caténine. Cette interaction aboutit à la formation d'un complexe modulant l'expression de C-Myc et de la cycline D1, formant une plateforme de recrutement pour le complexe médiateur, impliqué dans la régulation de la transcription par l'ARNpolIII [457]. L'implication de EZH2 dans le développement des cancers du sein a été investigué par l'utilisation d'un modèle murin de souris transgéniques surexprimant EZH2 dans les cellules de la glande mammaire. Dans ce modèle l'interaction EZH2/ β -caténine est associée à l'hyperplasie des cellules épithéliales mammaires.

Dans le cas des cancers décrits précédemment, on comprend parfaitement la pertinence d'une stratégie thérapeutique d'inhibition de EZH2. En revanche, dans le cœur et surtout en vue d'une cardioprotection en phase aiguë post-IDM, l'inhibition des activités autres que celle de triméthylation de H3K27 de EZH2, pourrait ne pas être pertinente voire même s'avérer délétère. En effet, STAT3 [458] et ROR α [459] sont tous deux associés à des effets cardioprotecteurs en phase inflammatoire aiguë après des lésions ischémiques cardiaques. L'activation de STAT-3 a été démontrée pour la première fois en 2001, dans un modèle de cœur de rat isolé perfusé [458]. L'inhibition de l'activation de STAT3 par un inhibiteur spécifique de sa phosphorylation dans ce modèle, se traduit par l'augmentation des taux de cellules apoptotiques, révélant le rôle cardioprotecteur de STAT3 dans ce contexte [458]. Considérant ROR α , une diminution de son expression a été mise en évidence

après dans les modèles murins d'IR. L'utilisation de modèles murins déficients pour ROR α a permis de mettre en évidence son effet cardioprotecteur dans ce contexte particulier, avec les animaux déficients présentant une taille d'infarctus supérieure, un taux plus élevé d'apoptose des cellules myocardiques, une exacerbation de la dysfonction contractile [459]. D'un point de vue mécanistique, cette déficience en ROR α est notamment associée au stress du réticulum endoplasmique et à un dysfonctionnement des mitochondries. Inversement, par surexpression de ROR α spécifiquement dans les cardiomyocytes He et collaborateurs, confirment son rôle cardioprotecteur, les animaux surexprimant ROR α étant moins vulnérables aux lésions induites par une ischémie reperfusion [459]. De cette façon il semble essentiel de conserver les activités différentes de la méthylation des histones de EZH2.

Par ailleurs, il est important de souligner que les effets de EZH2, non HMT, sont complètement dépendants du contexte cellulaire. Il est donc absolument important dans notre cas de s'assurer de la bonne spécificité de notre traitement avec le GSK-343 et également de la sélectivité cellulaire. En effet, il est nécessaire de réussir à cibler uniquement l'activité méthyl transférase de EZH2 pour conserver ses autres rôles, d'où l'utilisation d'un inhibiteur de l'activité catalytique de EZH2 et non d'un inhibiteur de PRC2. De même, l'utilisation du GSK-343 n'entraîne pas la déstabilisation du complexe PRC2.

L'autre élément primordial, dans ce projet de thèse, est de réussir à cibler spécifiquement les monocytes circulants notamment grâce à la mise en place d'une stratégie liposomale. Les résultats prometteurs obtenus *in vitro*, sur les monocytes humains et murins traités au GSK-343 montrent notre capacité à produire des cellules M2-like après 3 jours de traitement *in vitro*. Ils apportent la preuve de concept que cette stratégie thérapeutique pharmaco épigénétique est capable de moduler la différenciation des monocytes humains et murins en macrophages et d'orienter leur polarisation vers le phénotype M2. Ce contexte *in vitro* est complètement décontextualisé et ne donne la preuve *in vivo* ni de l'efficacité, ni de la spécificité du GSK-343 vis-à-vis des cellules monocytaires circulantes. De surcroit, il est également nécessaire de vérifier que le traitement *in vivo* des monocytes circulants permet bien leur différenciation en M2-like puis leur recrutement au niveau de la zone lésée post-IDM. Malheureusement notre étude *in vivo*, bien qu'apportant des résultats prometteurs sur l'amélioration de la réparation cardiaque lors de l'utilisation de cet inhibiteur de l'activité de

EZH2, ne permet pas de répondre à ces questions. En effet, l'injection IP ne permet pas de cibler spécifiquement les monocytes sanguins. Dans le but d'augmenter la spécificité du GSK-343 pour les monocytes circulants, plusieurs solutions sont envisageables. La première solution assez simple consisterait à réaliser des injections Intra-Veineuses (IV) plutôt que IP, augmentant la proximité du composé avec les monocytes. Mais cette stratégie en cas d'injections répétées, journalière, rend fastidieux le protocole expérimental et est inconfortable pour les animaux. La seconde solution consisterait à utiliser des liposomes comme vecteurs du GSK-343. Il est possible de tirer avantage de la capacité de phagocytose des monocytes-macrophages et d'encapsuler le GSK-343 dans des liposomes. En effet l'enzyme EZH2 est exprimée de façon ubiquitaire, notamment par les cardiomyocytes (comme décrit dans le Chapitre 3 partie 3.2.5.4), jouant un rôle potentiel sur l'hypertrophie cardiaque et donc le remodelage pathologique du cœur menant à l'installation d'une IC. Il n'est donc pas à exclure que certains des effets observés ne soient pas directement dus à une modulation de l'inflammation [418, 433]. La composition des liposomes peut être optimisée de façon à ressembler le plus possible à des cellules en apoptose en faisant varier les pourcentages de phosphatidyl-choline et phosphatidyl-sérine augmentant ainsi l'affinité des monocytes/macrophages pour les liposomes chargés. Cette stratégie de ciblage prometteuse a déjà été utilisée avec succès dans d'autres études [460, 461]. Ce projet de ciblage spécifique des cellules myéloïdes par phagocytose de liposome, a été initié et a fait l'objet d'un stage de master pour lequel j'ai participé à l'encadrement. Ce projet a permis de formuler et produire, en collaboration avec le laboratoire de pharmacie Galénique de l'UFR de Médecine - Pharmacie de Rouen (UMR INSERM U1239), différents lots de liposomes et de réaliser la preuve de concept biologique de leur efficacité et spécificité *in vitro*. Les différents lots de liposomes générés rendent compte de leur affinité élevée pour les monocytes. Malheureusement aucune quantité de GSK-343 encapsulé ne s'est avérée suffisamment efficace pour reproduire la mise en place du phénotype M2-like *in vitro*. Ce projet doit être poursuivi dans le but de sélectionner le lot de liposomes le plus efficace *in vitro*, puis de procéder à l'étude de l'efficacité du composé « libre » et ciblé *in vivo*.

De nombreuses études, insistent sur l'implication de EZH2 dans l'initiation et la progression des pathologies inflammatoires. Quel que soit l'organe atteint, le maintien et l'exacerbation de cet état inflammatoire est corrélé avec un mauvais pronostic vital. Le rôle central de l'inflammation dans de nombreuses pathologies, à la fois comme activateur, initiateur ou élément de progression de la pathologie, se traduit par un nombre croissant d'études dans les modèles inflammatoires. Plusieurs plans d'actions sont alors envisageables pour résoudre l'inflammation et/ou favoriser le recrutement de cellules immunomodulatrices. Beaucoup d'études tentent de résoudre l'inflammation par le biais de traitements géniques ou protéiques anti-inflammatoires. Dans le contexte particulier de l'IDM, de telles stratégies ne tiennent pas compte de la nécessité de conserver une phase pro-inflammatoire précoce (Chapitre 2 partie 2.2.1.1). Il faut cependant, dans ce contexte, être capable de promouvoir le recrutement des cellules immunomodulatrices. Ainsi, mes travaux de thèse montrent pour la première fois que l'inhibition pharmacologique de EZH2 par le GSK-343 favorise la capacité des monocytes humains à accélérer la résolution de l'inflammation cardiaque. La mise en place de cette stratégie et ses résultats sont en accord avec les études menées dans d'autres situations inflammatoires, touchant d'autres organes. Toutes ces études utilisent une stratégie d'inhibition de EZH2 pour favoriser une transition vers un phénotype anti-inflammatoire (Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin [MICI, Rectocolite hémorragique, colites] [462], le foie [463], ou encore la neuro inflammation [464]).

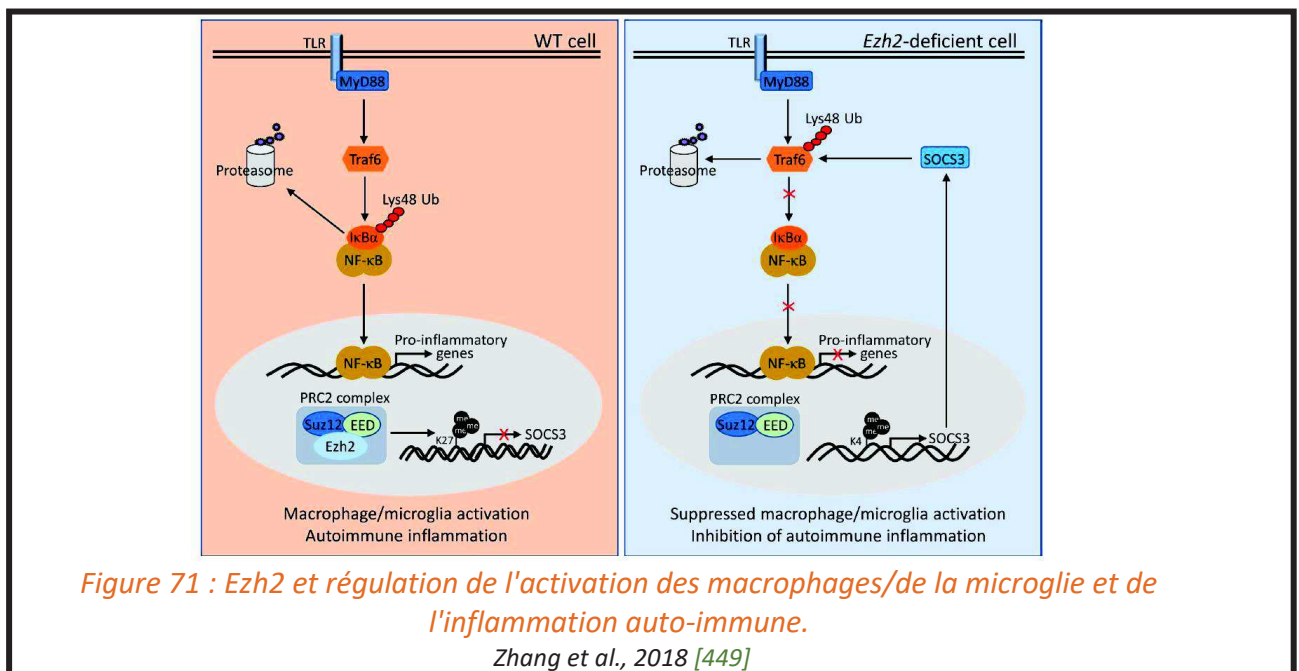
De plus, l'utilisation de cette stratégie épigénétique permet d'obtenir un effet transitoire, ne bloquant pas de façon définitive le recrutement de cellules pro-inflammatoires, nécessaire en cas de seconde lésion. L'importance de la mise en place d'un effet transitoire de EZH2, est soulevée dans les situations d'inflammations chroniques telles que celles observées dans les modèles murins de *Trans Aortic Constriction* (TAC), ou l'inhibition de EZH2 par le lnc RNA CHAER ne semble pas être favorable [418]. Le modèle murin, de ligature permanente de l'artère coronaire gauche, utilisé au cours de mes travaux de thèse ne permet malheureusement pas de vérifier l'action transitoire du traitement *in vivo*. L'utilisation d'un modèle d'Ischémie Reperfusion (IR) pourrait être envisagée pour élucider ce point. Une première phase d'IR accompagnée du traitement au GSK-343 permettant de bénéficier de son effet sur l'activation et le recrutement des macrophages

M2 et une seconde IR permettant d'étudier le bon recrutement des acteurs cellulaires et moléculaires pro-inflammatoires. Par ailleurs, ce modèle d'IR est plus représentatif du tableau clinique observé chez l'Homme. Néanmoins, certaines lésions sont propres à la reperfusion et non à l'ischémie compliquant de façon considérable l'interprétation des résultats dans ce modèle.

La stratégie visant à favoriser la polarisation en macrophages immunomodulateurs M2 est bénéfique dans le contexte des pathologies inflammatoires. Cependant, il faut rester vigilant quant au fait que favoriser la polarisation en ce type de macrophages peut s'avérer délétère pour la croissance tumorale. En effet, les macrophages de type M2, connus pour favoriser l'angiogenèse, peuvent contribuer à la croissance tumorale. Bien que les résultats, obtenus lors de ce projet soient prometteurs, il convient de mettre en place une stratégie ciblée d'administration du GSK-343 de façon à éviter le recrutement des « M2-like générés » au niveau des sites de croissance tumorale pour favoriser l'angiogenèse locale. Pour contrecarrer cet effet, il est envisageable de cibler le partenaire cytoplasmique de EZH2, inhibant la polarisation en macrophages M2, et favorisant la polarisation en macrophages M1. Ce processus permettrait à EZH2 de transloquer dans le noyau afin d'induire une transition du phénotype M2 (pro-angiogénique) vers un phénotype M1 (anti-tumoral) capable de phagocyter les cellules tumorales. EZH2 est également impliqué dans la progression maligne par son interaction avec E2F1 et SF1. En effet, l'analyse bio-informatique du transcriptome de patients porteurs de Carcinomes CorticoSurrénaux (CCS), a révélé l'implication de EZH2 dans l'expression des gènes clés de la progression maligne, dans ces tumeurs où il agit principalement comme un activateur de la transcription génique via E2F1 et SF1 [465]. Ces deux exemples montrent qu'en fonction du type de cancers, EZH2 exerce un rôle oncogénique ou un rôle de suppresseur de tumeur. L'activité oncogénique suite à des mutations activatrices, à une surexpression, à l'amplification de la protéine ou liée à son rôle d'activateur de la transcription, entraîne une augmentation de son activité répressive. Lorsque EZH2 agit comme un activateur de la transcription, il est indépendant des autres protéines PcGs et est alors une plateforme de recrutement pour les activateurs de la transcription ou des FTs activateurs. EZH2 peut également exercer un rôle de suppresseur de tumeur, lorsqu'il est la cible de mutations inactivatrices.

L'enzyme épigénétique EZH2 est impliquée dans la pathogenèse de l'inflammation auto-immune par son interaction avec Socs3, un médiateur anti-inflammatoire bien caractérisé. En effet, Socs3 est impliqué dans l'induction de l'expression des gènes anti-inflammatoires. Socs3 inhibe de ce fait l'activation des macrophages médiée par les TLR et l'inflammation auto-immune [466-468]. Le rôle de EZH2 dans l'activation des macrophages et de la microglie a été étudié par Zhang et collaborateurs [449]. Dans cette étude, EZH2 exerce sa fonction de répresseur de l'activation transcriptionnelle sur Socs3, et sert de médiateur dans l'expression des gènes pro-inflammatoires. La diminution de l'expression de EZH2 et donc l'ajout de la modification épigénétique répressive H3K27me3 entraînent une moindre activation des macrophages et de la microglie, atténuant ainsi l'inflammation dans les colites induites par le Sulfate Dextran Sodique (SDS) et les encéphalomyélites auto-immunes expérimentales. Au niveau mécanistique, l'absence de EZH2 semble stimuler directement l'expression de Socs3, induisant ainsi l'ubiquitination de TRAF6, ce qui induit sa dégradation par le protéasome, supprimant ainsi l'activation des gènes pro-inflammatoires dépendante de NFκB (Figure 71).

Ceci est en accord avec nos données qui montrent que EZH2 est un régulateur épigénétique important pour le blocage de la différenciation/polarisation en M2, prolongeant ainsi la durée et/ou la gravité de l'inflammation cardiaque après un IDM.



L'équilibre inflammatoire est impliqué dans de nombreuses pathologies. Dans le contexte du Rétrécissement Aortique (RA) calcifié EZH2 pourrait également constituer une cible thérapeutique prometteuse. Le (RA) est une valvulopathie fréquente et grave pour laquelle aucun traitement pharmacologique n'existe à ce jour. Cet axe de recherche développé au sein de mon laboratoire pourrait mettre à profit les résultats obtenus lors de ce projet de thèse pour moduler l'inflammation observée dans le contexte pathologique du RA. Les valves aortiques calcifiées des patients atteints de RA contiennent un infiltrat inflammatoire dense, riche en macrophages issus de la différenciation des monocytes circulants. Dans ce microenvironnement, les macrophages peuvent acquérir le phénotype pro-inflammatoire, M1, ou le phénotype immunomodulateur, M2. L'inflammation étant l'un des plus puissant activateurs de la calcification [469], la plupart des études s'accordent sur le fait qu'un déséquilibre de la polarisation en faveur des M1 amplifierait la calcification valvulaire [470, 471]. Le traitement avec le GSK-343, permettant d'accélérer la différenciation en M2, pourrait permettre de rééquilibrer la balance inflammatoire et prévenir ainsi le développement du RA. Ces observations ont permis la création d'un projet au laboratoire avec deux objectifs principaux. Le premier objectif est d'étudier si l'expression, l'activité et la localisation d'EZH2 dans les monocytes circulants de sujets sains ou de patients sont associées au développement du RA. Le deuxième est d'évaluer si le traitement avec le GSK-343 permet de réduire le potentiel inflammatoire et donc pro-calcifiant des M1 (Figure 72).

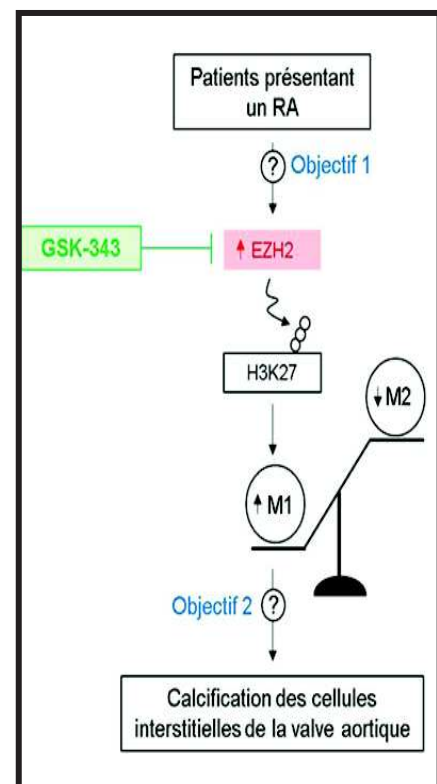


Figure 72 : EZH2 et RA objectifs de travail

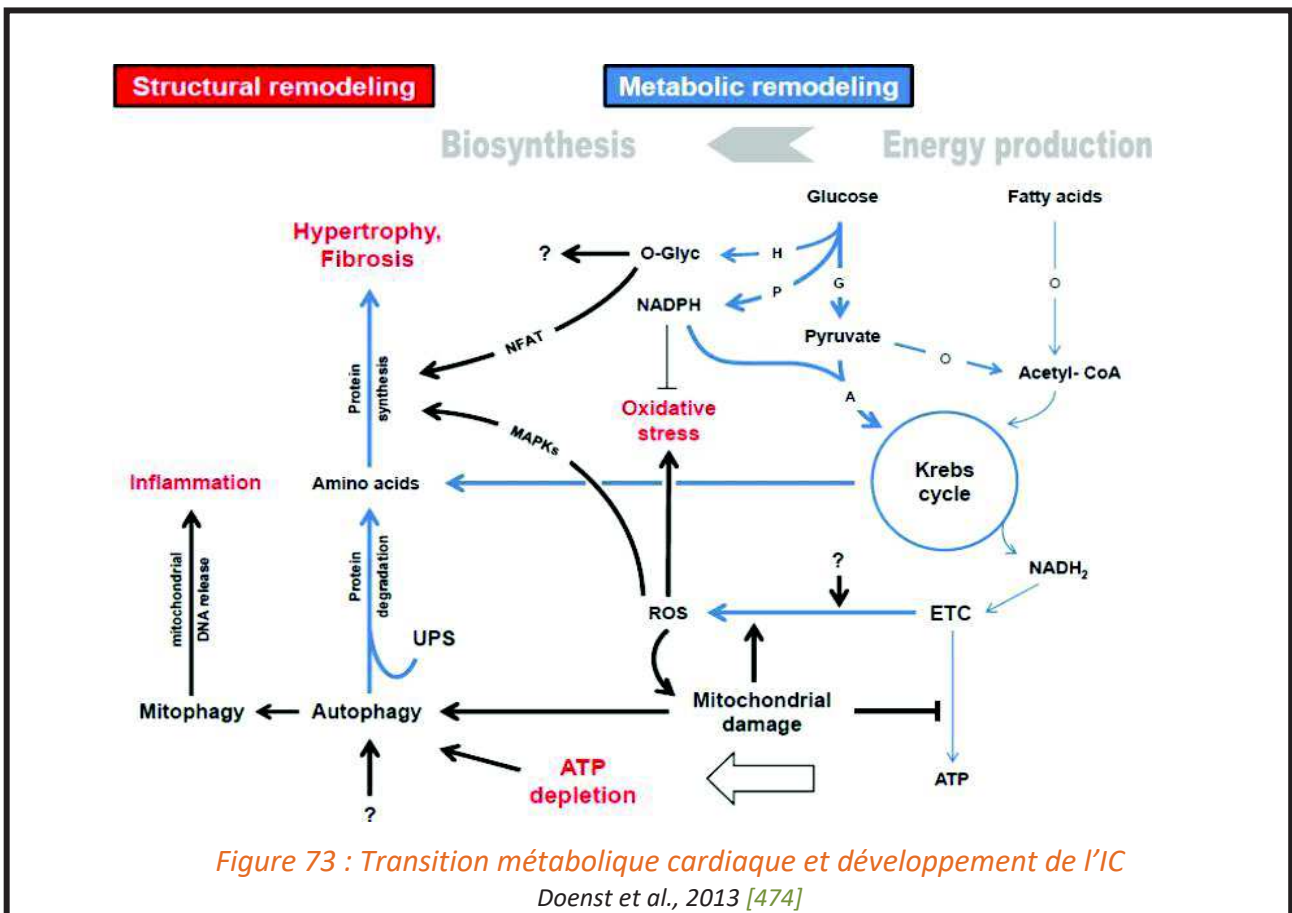
Notre étude démontre que l'inhibition de EZH2 permet d'accélérer la cinétique inflammatoire et de prévenir la dysfonction cardiaque post-IDM. Cependant, nos observations se limitent à l'amélioration des paramètres cardiaques lors de la phase aiguë pro-inflammatoire (jusqu'à 3 jours post-IDM) et de la phase proliférative de résolution de l'inflammation (8 jours post-IDM). De fait, nous n'avons pas évalué l'effet du traitement avec la GSK-343 sur les paramètres cardiaques après la phase de maturation (21 jours post-IDM) au cours de laquelle se développe l'IC (Chapitre 2 partie 2.2). Il serait ainsi intéressant, d'étudier les effets de l'inhibition de EZH2 par le GSK-343 lors du développement de l'IC (21 jours post-IDM) dans plusieurs contextes : 1) Lors d'un traitement précoce post-IDM comme réalisé lors de notre étude ; 2) lors d'un traitement tardif post-IDM (débutant après la phase aiguë pro-inflammatoire). Cette stratégie thérapeutique permettrait de discriminer l'effet du traitement avec le GSK-343 sur les monocytes cibles recrutés pendant la phase pro-inflammatoire et sur les acteurs cellulaires des phases plus tardives de résolution de l'inflammation et de maturation.

Une étude récente vient soutenir notre hypothèse, selon laquelle l'inhibition de EZH2 préviendrait le développement de l'IC. En effet, Pepin *et al.*, ont démontré par séquençage d'ARNm, que EZH2 est surexprimé de deux fois dans les tissus ventriculaires gauches humains obtenus à partir de patients atteints de cardiomyopathies ischémiques ou non ischémiques [472]. Cette observation a été validée par les auteurs, suite à une analyse des données de puce à ARN (GDS488) précédemment publiée par Tarnavski *et al.*, [473] ; mettant en évidence une surexpression graduelle (de 1h à 48h post-IDM) et persistante (jusqu'à 1 semaine post-IDM) de l'ARNm de Ezh2 chez la souris dans les cœurs ischémiques par rapport aux cœurs témoins non ischémiques. De plus, Pepin *et al.*, ont observé, dans cette même étude de séquençage d'ARNm, un enrichissement significatif des gènes cibles de EZH2 chez les patients atteints de cardiomyopathies ischémiques. Le recoupement de ces données avec l'analyse de méthylation de l'ADN sur génome entier a révélé un modèle d'expression génique robuste consistant en la surexpression de gènes impliqués dans l'organisation de la MEC, le métabolisme glycolytique anaérobie et l'inhibition de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme oxydatif, ainsi que la fonction mitochondriale [473]. Ainsi, EZH2 semble favoriser la transition du métabolisme des acides gras, caractéristique du fonctionnement cardiaque physiologique, vers le métabolisme

glycolytique anaérobie, caractéristique du développement de l'hypertrophie et de l'IC [474] (Figure 73).

Enfin, *KLF15*, dont l'expression est diminuée chez les patients atteints de cardiomyopathies ischémiques, a été identifié comme un gène cible réprimé par EZH2 potentiellement impliqué dans cette transition métabolique. La répression exercée par EZH2 sur l'expression *KLF15* serait dépendante de son domaine SET précédemment décrit (Chapitre 3 partie 3.2.5.4).

L'ensemble de ces données suggère que EZH2 occupe un rôle primordial dans le développement de l'IC et que son inhibition à l'aide du GSK-343 constituerait une stratégie thérapeutique crédible. Dans ce contexte, il serait intéressant d'observer l'expression de *Ezh2* et de *Klf15* dans les cœurs des souris contrôles, traitées avec le captisol (surexpression de *Ezh2* et répression de *Klf15* par rapport aux souris contrôles) ou avec le GSK-343 (répression de *Ezh2* et surexpression de *Klf15* par rapport aux souris traitées avec le captisol) post-IDM lors de notre étude.



Bibliographie

Ouvrages

Mak TW, Saunders ME, Jett BD. *The Immune Response Basic and Clinical Principles*, 2006, Pages 463-516. Chapitre 17 - Cytokines and Cytokine.

Allis D, Caparros ML, Jenuwein T, Reinberg D, *Epigenetics*, Second Edition.

Milliat F et François A*. *Les mastocytes, stakhanovistes de l'immunité*

Un rôle énigmatique dans les lésions radiques... Med Sci (Paris) 2018; 34 : 145–154.

Sites internet

www.biocompare.com

www.macrophages.com

www.immgen.org

Articles et revues

1. Ridker, P.M., et al., *Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease*. N Engl J Med, 2017. **377**(12): p. 1119-1131.
2. VALLEE, B.L., W.L. HUGHES, and J.G. GIBSON, *A method for the separation of leukocytes from whole blood by flotation on serum albumin*. Blood, 1947(1): p. 82-7.
3. MINOR, A.H. and L. BURNETT, *A method for obtaining living leukocytes from human peripheral blood by acceleration of erythrocyte sedimentation*. Blood, 1948. **3**(7): p. 799-802.
4. BOYUM, A., *SEPARATION OF WHITE BLOOD CELLS*. Nature, 1964. **204**: p. 793-4.
5. Boyum, A., *Separation of blood leucocytes, granulocytes and lymphocytes*. Tissue Antigens, 1974. **4**(4): p. 269-74.
6. WACHSTEIN, M. and G. WOLF, *The histochemical demonstration of esterase activity in human blood and bone marrow smears*. J Histochem Cytochem, 1958. **6**(6): p. 457.
7. van Furth, R. and Z.A. Cohn, *The origin and kinetics of mononuclear phagocytes*. J Exp Med, 1968. **128**(3): p. 415-35.
8. van Furth, R., et al., *[Mononuclear phagocytic system: new classification of macrophages, monocytes and of their cell line]*. Bull World Health Organ, 1972. **47**(5): p. 651-8.
9. Todd, D., et al., *Enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies to Aujeszky's disease virus in pigs*. Vet Rec, 1981. **109**(24): p. 534-7.
10. Figdor, C.G., et al., *Isolation of functionally different human monocytes by counterflow centrifugation elutriation*. Blood, 1982. **60**(1): p. 46-53.
11. Passlick, B., D. Flieger, and H.W. Ziegler-Heitbrock, *Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood*. Blood, 1989. **74**(7): p. 2527-34.
12. Ziegler-Heitbrock, H.W., et al., *The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages*. Eur J Immunol, 1993. **23**(9): p. 2053-8.
13. Ziegler-Heitbrock, L., *The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(3): p. 584-92.

14. Ziegler-Heitbrock, L., et al., *Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood*. Blood, 2010. **116**(16): p. e74-80.
15. Wong, K.L., et al., *Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets*. Blood, 2011. **118**(5): p. e16-31.
16. Serbina, N.V., et al., *Monocyte-mediated defense against microbial pathogens*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 421-52.
17. Seki, E., et al., *Critical roles of myeloid differentiation factor 88-dependent proinflammatory cytokine release in early phase clearance of *Listeria monocytogenes* in mice*. J Immunol, 2002. **169**(7): p. 3863-8.
18. Peng, Y., Y. Latchman, and K.B. Elkon, *Ly6C(low) monocytes differentiate into dendritic cells and cross-tolerize T cells through PDL-1*. J Immunol, 2009. **182**(5): p. 2777-85.
19. Cros, J., et al., *Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors*. Immunity, 2010. **33**(3): p. 375-86.
20. Schmidl, C., et al., *Transcription and enhancer profiling in human monocyte subsets*. Blood, 2014. **123**(17): p. e90-9.
21. Mobley, J.L., et al., *Genetic evidence of a functional monocyte dichotomy*. Inflammation, 2007. **30**(6): p. 189-97.
22. Zhao, C., et al., *Identification of novel functional differences in monocyte subsets using proteomic and transcriptomic methods*. J Proteome Res, 2009. **8**(8): p. 4028-38.
23. Zawada, A.M., et al., *SuperSAGE evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes as a third monocyte subset*. Blood, 2011. **118**(12): p. e50-61.
24. Liaskou, E., et al., *Monocyte subsets in human liver disease show distinct phenotypic and functional characteristics*. Hepatology, 2013. **57**(1): p. 385-98.
25. Hadadi, E., et al., *Differential IL-1 β secretion by monocyte subsets is regulated by Hsp27 through modulating mRNA stability*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 39035.
26. Tacke, F., et al., *Immature monocytes acquire antigens from other cells in the bone marrow and present them to T cells after maturing in the periphery*. J Exp Med, 2006. **203**(3): p. 583-97.

27. Hijdra, D., et al., *Phenotypic characterization of human intermediate monocytes*. *Front Immunol*, 2013. **4**: p. 339.
28. Ziegler-Heitbrock, L. and T.P. Hofer, *Toward a refined definition of monocyte subsets*. *Front Immunol*, 2013. **4**: p. 23.
29. Thomas, G.D., et al., *Human Blood Monocyte Subsets: A New Gating Strategy Defined Using Cell Surface Markers Identified by Mass Cytometry*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017. **37**(8): p. 1548-1558.
30. Goff, W.L., et al., *Assessment of bovine mononuclear phagocytes and neutrophils for induced L-arginine-dependent nitric oxide production*. *Vet Immunol Immunopathol*, 1996. **55**(1-3): p. 45-62.
31. Chamorro, S., et al., *Phenotypic and functional heterogeneity of porcine blood monocytes and its relation with maturation*. *Immunology*, 2005. **114**(1): p. 63-71.
32. Ahuja, V., S.E. Miller, and D.N. Howell, *Identification of two subpopulations of rat monocytes expressing disparate molecular forms and quantities of CD43*. *Cell Immunol*, 1995. **163**(1): p. 59-69.
33. Grage-Griebenow, E., et al., *Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64(+)/CD16(+) blood monocytes*. *Eur J Immunol*, 2001. **31**(1): p. 48-56.
34. Geissmann, F., S. Jung, and D.R. Littman, *Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties*. *Immunity*, 2003. **19**(1): p. 71-82.
35. Nikolic, T., et al., *Developmental stages of myeloid dendritic cells in mouse bone marrow*. *Int Immunol*, 2003. **15**(4): p. 515-24.
36. Kurihara, T., et al., *Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor*. *J Exp Med*, 1997. **186**(10): p. 1757-62.
37. Kuziel, W.A., et al., *Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(22): p. 12053-8.
38. Auffray, C., et al., *Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior*. *Science*, 2007. **317**(5838): p. 666-70.
39. Auffray, C., M.H. Sieweke, and F. Geissmann, *Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells*. *Annu Rev Immunol*, 2009. **27**: p. 669-92.

40. Sunderkötter, C., et al., *Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response*. J Immunol, 2004. **172**(7): p. 4410-7.
41. Guillems, M., et al., *Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(8): p. 571-8.
42. Italiani, P. and D. Boraschi, *From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 514.
43. Ginhoux, F., M. Guillems, and S.H. Naik, *Editorial: Dendritic Cell and Macrophage Nomenclature and Classification*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 168.
44. Mildner, A. and S. Jung, *Development and function of dendritic cell subsets*. Immunity, 2014. **40**(5): p. 642-56.
45. Vestweber, D., *How leukocytes cross the vascular endothelium*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(11): p. 692-704.
46. Serbina, N.V. and E.G. Pamer, *Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2*. Nat Immunol, 2006. **7**(3): p. 311-7.
47. Kratochvil, R.M., P. Kuberski, and J.F. Deniset, *Monocyte Conversion During Inflammation and Injury*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2017. **37**(1): p. 35-42.
48. Imai, T., et al., *Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion*. Cell, 1997. **91**(4): p. 521-30.
49. Combadiere, C., et al., *Identification of CX3CR1. A chemotactic receptor for the human CX3C chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV-1*. J Biol Chem, 1998. **273**(37): p. 23799-804.
50. Nishiyori, A., et al., *Localization of fractalkine and CX3CR1 mRNAs in rat brain: does fractalkine play a role in signaling from neuron to microglia?* FEBS Lett, 1998. **429**(2): p. 167-72.
51. Jung, S., et al., *Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(11): p. 4106-14.
52. Landsman, L., C. Varol, and S. Jung, *Distinct differentiation potential of blood monocyte subsets in the lung*. J Immunol, 2007. **178**(4): p. 2000-7.

53. Garton, K.J., et al., *Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1)*. J Biol Chem, 2001. **276**(41): p. 37993-8001.
54. Niess, J.H., et al., *CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance*. Science, 2005. **307**(5707): p. 254-8.
55. Hundhausen, C., et al., *The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion*. Blood, 2003. **102**(4): p. 1186-95.
56. Fong, A.M., et al., *Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow*. J Exp Med, 1998. **188**(8): p. 1413-9.
57. Shi, C. and E.G. Pamer, *Monocyte recruitment during infection and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(11): p. 762-74.
58. Nahrendorf, M., et al., *The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions*. J Exp Med, 2007. **204**(12): p. 3037-47.
59. Epelman, S., et al., *Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation*. Immunity, 2014. **40**(1): p. 91-104.
60. Gautier, E.L., et al., *Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages*. Nat Immunol, 2012. **13**(11): p. 1118-28.
61. Biswas, S.K. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm*. Nat Immunol, 2010. **11**(10): p. 889-96.
62. Williams, J.W., et al., *Macrophage Biology, Classification, and Phenotype in Cardiovascular Disease: JACC Macrophage in CVD Series (Part 1)*. J Am Coll Cardiol, 2018. **72**(18): p. 2166-2180.
63. Machnik, A., et al., *Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C-dependent buffering mechanism*. Nat Med, 2009. **15**(5): p. 545-52.

64. Nguyen, K.D., et al., *Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis*. Nature, 2011. **480**(7375): p. 104-8.
65. Li, P., et al., *NCoR repression of LXRs restricts macrophage biosynthesis of insulin-sensitizing omega 3 fatty acids*. Cell, 2013. **155**(1): p. 200-214.
66. Okabe, Y. and R. Medzhitov, *Tissue-specific signals control reversible program of localization and functional polarization of macrophages*. Cell, 2014. **157**(4): p. 832-44.
67. Paolicelli, R.C., et al., *Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development*. Science, 2011. **333**(6048): p. 1456-8.
68. Dutta, P., et al., *Macrophages retain hematopoietic stem cells in the spleen via VCAM-1*. J Exp Med, 2015. **212**(4): p. 497-512.
69. Theurl, I., et al., *On-demand erythrocyte disposal and iron recycling requires transient macrophages in the liver*. Nat Med, 2016. **22**(8): p. 945-51.
70. Lin, H.H., et al., *The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance*. J Exp Med, 2005. **201**(10): p. 1615-25.
71. Robert, C., et al., *Macrophages.com: an on-line community resource for innate immunity research*. Immunobiology, 2011. **216**(11): p. 1203-11.
72. Sica, A. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas*. J Clin Invest, 2012. **122**(3): p. 787-95.
73. Bohlsón, S.S., et al., *Complement, c1q, and c1q-related molecules regulate macrophage polarization*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 402.
74. Ben-Mordechai, T., et al., *Targeting macrophage subsets for infarct repair*. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2015. **20**(1): p. 36-51.
75. Mosser, D.M., *The many faces of macrophage activation*. J Leukoc Biol, 2003. **73**(2): p. 209-12.
76. Covarrubias, A.J., H.I. Aksoylar, and T. Horng, *Control of macrophage metabolism and activation by mTOR and Akt signaling*. Semin Immunol, 2015. **27**(4): p. 286-96.
77. Stein, M., et al., *Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation*. J Exp Med, 1992. **176**(1): p. 287-92.

78. Salmi, M., et al., *CD44 binds to macrophage mannose receptor on lymphatic endothelium and supports lymphocyte migration via afferent lymphatics*. *Circ Res*, 2013. **112**(12): p. 1577-82.
79. Mantovani, A., et al., *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. *Trends Immunol*, 2004. **25**(12): p. 677-86.
80. Gordon, S. and P.R. Taylor, *Monocyte and macrophage heterogeneity*. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(12): p. 953-64.
81. Martinez, F.O., et al., *Macrophage activation and polarization*. *Front Biosci*, 2008. **13**: p. 453-61.
82. Gombozhapova, A., et al., *Macrophage activation and polarization in post-infarction cardiac remodeling*. *J Biomed Sci*, 2017. **24**(1): p. 13.
83. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(12): p. 958-69.
84. Wang, Y., et al., *Macrophage-derived extracellular vesicles: diverse mediators of pathology and therapeutics in multiple diseases*. *Cell Death Dis*, 2020. **11**(10): p. 924.
85. Lindsey, M.L., J.J. Saucerman, and K.Y. DeLeon-Pennell, *Knowledge gaps to understanding cardiac macrophage polarization following myocardial infarction*. *Biochim Biophys Acta*, 2016. **1862**(12): p. 2288-2292.
86. Zizzo, G., et al., *Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires M2c polarization and MerTK induction*. *J Immunol*, 2012. **189**(7): p. 3508-20.
87. Gratchev, A., et al., *Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein beta1G-H3*. *Scand J Immunol*, 2001. **53**(4): p. 386-92.
88. Jetten, N., et al., *Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo*. *Angiogenesis*, 2014. **17**(1): p. 109-18.
89. Waldo, S.W., et al., *Heterogeneity of human macrophages in culture and in atherosclerotic plaques*. *Am J Pathol*, 2008. **172**(4): p. 1112-26.
90. Gleissner, C.A., et al., *CXC chemokine ligand 4 induces a unique transcriptome in monocyte-derived macrophages*. *J Immunol*, 2010. **184**(9): p. 4810-8.

91. Pelegrin, P. and A. Surprenant, *Dynamics of macrophage polarization reveal new mechanism to inhibit IL-1beta release through pyrophosphates*. EMBO J, 2009. **28**(14): p. 2114-27.
92. Khallou-Laschet, J., et al., *Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis*. PLoS One, 2010. **5**(1): p. e8852.
93. Ma, Y., A.J. Mouton, and M.L. Lindsey, *Cardiac macrophage biology in the steady-state heart, the aging heart, and following myocardial infarction*. Transl Res, 2018. **191**: p. 15-28.
94. Tamoutounour, S., et al., *Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin*. Immunity, 2013. **39**(5): p. 925-38.
95. Epelman, S., K.J. Lavine, and G.J. Randolph, *Origin and functions of tissue macrophages*. Immunity, 2014. **41**(1): p. 21-35.
96. Ginhoux, F. and S. Jung, *Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(6): p. 392-404.
97. Nahrendorf, M. and F.K. Swirski, *Innate immune cells in ischaemic heart disease: does myocardial infarction beget myocardial infarction?* Eur Heart J, 2016. **37**(11): p. 868-72.
98. Heidt, T., et al., *Differential contribution of monocytes to heart macrophages in steady-state and after myocardial infarction*. Circ Res, 2014. **115**(2): p. 284-95.
99. Pinto, A.R., et al., *Revisiting Cardiac Cellular Composition*. Circ Res, 2016. **118**(3): p. 400-9.
100. Cohen, H.B. and D.M. Mosser, *Cardiac macrophages: how to mend a broken heart*. Immunity, 2014. **40**(1): p. 3-5.
101. Pinto, A.R., et al., *An abundant tissue macrophage population in the adult murine heart with a distinct alternatively-activated macrophage profile*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e36814.
102. Swirski, F.K., C.S. Robbins, and M. Nahrendorf, *Development and Function of Arterial and Cardiac Macrophages*. Trends Immunol, 2016. **37**(1): p. 32-40.
103. Hulsmans, M., et al., *Macrophages Facilitate Electrical Conduction in the Heart*. Cell, 2017. **169**(3): p. 510-522.e20.

104. Molawi, K., et al., *Progressive replacement of embryo-derived cardiac macrophages with age*. J Exp Med, 2014. **211**(11): p. 2151-8.
105. Ma, Y., et al., *Deriving a cardiac ageing signature to reveal MMP-9-dependent inflammatory signalling in senescence*. Cardiovasc Res, 2015. **106**(3): p. 421-31.
106. Orkin, S.H. and L.I. Zon, *Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology*. Cell, 2008. **132**(4): p. 631-44.
107. Flachskampf, F.A., et al., *Cardiac imaging after myocardial infarction*. Eur Heart J, 2011. **32**(3): p. 272-83.
108. Prabhu, S.D. and N.G. Frangogiannis, *The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis*. Circ Res, 2016. **119**(1): p. 91-112.
109. Timmers, L., et al., *The innate immune response in reperfused myocardium*. Cardiovasc Res, 2012. **94**(2): p. 276-83.
110. Andrassy, M., et al., *High-mobility group box-1 in ischemia-reperfusion injury of the heart*. Circulation, 2008. **117**(25): p. 3216-26.
111. Epelman, S., P.P. Liu, and D.L. Mann, *Role of innate and adaptive immune mechanisms in cardiac injury and repair*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(2): p. 117-29.
112. Arslan, F., D.P. de Kleijn, and G. Pasterkamp, *Innate immune signaling in cardiac ischemia*. Nat Rev Cardiol, 2011. **8**(5): p. 292-300.
113. de Haan, J.J., et al., *Danger signals in the initiation of the inflammatory response after myocardial infarction*. Mediators Inflamm, 2013. **2013**: p. 206039.
114. Ghigo, A., et al., *Myocyte signalling in leucocyte recruitment to the heart*. Cardiovasc Res, 2014. **102**(2): p. 270-80.
115. Newton, K. and V.M. Dixit, *Signaling in innate immunity and inflammation*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(3).
116. Scaffidi, P., T. Misteli, and M.E. Bianchi, *Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation*. Nature, 2002. **418**(6894): p. 191-5.
117. Wang, H., et al., *HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice*. Science, 1999. **285**(5425): p. 248-51.

118. Loukili, N., et al., *Peroxynitrite induces HMGB1 release by cardiac cells in vitro and HMGB1 upregulation in the infarcted myocardium in vivo*. Cardiovasc Res, 2011. **89**(3): p. 586-94.
119. Mann, D.L., *Innate immunity and the failing heart: the cytokine hypothesis revisited*. Circ Res, 2015. **116**(7): p. 1254-68.
120. Foell, D., et al., *S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(1): p. 28-37.
121. Rohde, D., et al., *S100A1 is released from ischemic cardiomyocytes and signals myocardial damage via Toll-like receptor 4*. EMBO Mol Med, 2014. **6**(6): p. 778-94.
122. Gondokaryono, S.P., et al., *The extra domain A of fibronectin stimulates murine mast cells via toll-like receptor 4*. J Leukoc Biol, 2007. **82**(3): p. 657-65.
123. Schoneveld, A.H., et al., *Atherosclerotic lesion development and Toll like receptor 2 and 4 responsiveness*. Atherosclerosis, 2008. **197**(1): p. 95-104.
124. Arslan, F., et al., *Lack of fibronectin-EDA promotes survival and prevents adverse remodeling and heart function deterioration after myocardial infarction*. Circ Res, 2011. **108**(5): p. 582-92.
125. Lugin, J., et al., *Cutting edge: IL-1 α is a crucial danger signal triggering acute myocardial inflammation during myocardial infarction*. J Immunol, 2015. **194**(2): p. 499-503.
126. Schroder, K. and J. Tschopp, *The inflammasomes*. Cell, 2010. **140**(6): p. 821-32.
127. Mezzaroma, E., et al., *The inflammasome promotes adverse cardiac remodeling following acute myocardial infarction in the mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(49): p. 19725-30.
128. Sandanger, Ø., et al., *The NLRP3 inflammasome is up-regulated in cardiac fibroblasts and mediates myocardial ischaemia-reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 2013. **99**(1): p. 164-74.
129. Liu, L., et al., *Up-regulated TLR4 in cardiomyocytes exacerbates heart failure after long-term myocardial infarction*. J Cell Mol Med, 2015. **19**(12): p. 2728-40.
130. Toldo, S. and A. Abbate, *The NLRP3 inflammasome in acute myocardial infarction*. Nat Rev Cardiol, 2018. **15**(4): p. 203-214.

131. Jordan, J.E., M.C. Montalto, and G.L. Stahl, *Inhibition of mannose-binding lectin reduces postischemic myocardial reperfusion injury*. *Circulation*, 2001. **104**(12): p. 1413-8.
132. Weisman, H.F., et al., *Soluble human complement receptor type 1: in vivo inhibitor of complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis*. *Science*, 1990. **249**(4965): p. 146-51.
133. Kawano, S., et al., *Blockade of NF-kappaB improves cardiac function and survival after myocardial infarction*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. **291**(3): p. H1337-44.
134. Singh, M.V., et al., *MyD88 mediated inflammatory signaling leads to CaMKII oxidation, cardiac hypertrophy and death after myocardial infarction*. *J Mol Cell Cardiol*, 2012. **52**(5): p. 1135-44.
135. Prabhu, S.D., *Cytokine-induced modulation of cardiac function*. *Circ Res*, 2004. **95**(12): p. 1140-53.
136. Hofmann, U. and S. Frantz, *Role of lymphocytes in myocardial injury, healing, and remodeling after myocardial infarction*. *Circ Res*, 2015. **116**(2): p. 354-67.
137. Ong, S.B., et al., *Inflammation following acute myocardial infarction: Multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities*. *Pharmacol Ther*, 2018. **186**: p. 73-87.
138. Thackeray, J.T., et al., *Myocardial Inflammation Predicts Remodeling and Neuroinflammation After Myocardial Infarction*. *J Am Coll Cardiol*, 2018. **71**(3): p. 263-275.
139. Puhl, S.L. and S. Steffens, *Neutrophils in Post-myocardial Infarction Inflammation: Damage vs. Resolution?* *Front Cardiovasc Med*, 2019. **6**: p. 25.
140. Toor, I.S., et al., *Eosinophil Deficiency Promotes Aberrant Repair and Adverse Remodeling Following Acute Myocardial Infarction*. *JACC Basic Transl Sci*, 2020. **5**(7): p. 665-681.
141. Henri, O., et al., *Selective Stimulation of Cardiac Lymphangiogenesis Reduces Myocardial Edema and Fibrosis Leading to Improved Cardiac Function Following Myocardial Infarction*. *Circulation*, 2016. **133**(15): p. 1484-97; discussion 1497.

142. Houssari, M., et al., *Lymphatic and Immune Cell Cross-Talk Regulates Cardiac Recovery After Experimental Myocardial Infarction*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2020. **40**(7): p. 1722-1737.
143. Swirski, F.K., et al., *Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites*. *Science*, 2009. **325**(5940): p. 612-6.
144. Nahrendorf, M., M.J. Pittet, and F.K. Swirski, *Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction*. *Circulation*, 2010. **121**(22): p. 2437-45.
145. Frangogiannis, N.G., *Regulation of the inflammatory response in cardiac repair*. *Circ Res*, 2012. **110**(1): p. 159-73.
146. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial reperfusion injury*. *N Engl J Med*, 2007. **357**(11): p. 1121-35.
147. Hofmann, U., et al., *Activation of CD4+ T lymphocytes improves wound healing and survival after experimental myocardial infarction in mice*. *Circulation*, 2012. **125**(13): p. 1652-63.
148. Lieschke, G.J., et al., *Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization*. *Blood*, 1994. **84**(6): p. 1737-46.
149. Frangogiannis, N.G., *The immune system and the remodeling infarcted heart: cell biological insights and therapeutic opportunities*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2014. **63**(3): p. 185-95.
150. Murray, P.J., et al., *Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines*. *Immunity*, 2014. **41**(1): p. 14-20.
151. Koepfen, A.H., et al., *The pathogenesis of cardiomyopathy in Friedreich ataxia*. *PLoS One*, 2015. **10**(3): p. e0116396.
152. Zlatanova, I., C. Pinto, and J.S. Silvestre, *Immune Modulation of Cardiac Repair and Regeneration: The Art of Mending Broken Hearts*. *Front Cardiovasc Med*, 2016. **3**: p. 40.
153. Barreiro, O., et al., *Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes*. *J Cell Biol*, 2002. **157**(7): p. 1233-45.

154. Jung, K., et al., *Endoscopic time-lapse imaging of immune cells in infarcted mouse hearts*. *Circ Res*, 2013. **112**(6): p. 891-9.
155. Li, W., et al., *Heart-resident CCR2*. *JCI Insight*, 2016. **1**(12).
156. Sørensen, O.E., et al., *Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3*. *Blood*, 2001. **97**(12): p. 3951-9.
157. Saiwai, H., et al., *Ly6C⁺ Ly6G⁻ Myeloid-derived suppressor cells play a critical role in the resolution of acute inflammation and the subsequent tissue repair process after spinal cord injury*. *J Neurochem*, 2013. **125**(1): p. 74-88.
158. Yan, X., et al., *Lung natural killer cells play a major counter-regulatory role in pulmonary vascular hyperpermeability after myocardial infarction*. *Circ Res*, 2014. **114**(4): p. 637-49.
159. Paust, S. and U.H. von Andrian, *Natural killer cell memory*. *Nat Immunol*, 2011. **12**(6): p. 500-8.
160. Vivier, E., et al., *Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells*. *Science*, 2011. **331**(6013): p. 44-9.
161. Marcus, A. and D.H. Raulet, *Evidence for natural killer cell memory*. *Curr Biol*, 2013. **23**(17): p. R817-20.
162. Jarahian, M., et al., *Activation of natural killer cells by newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase*. *J Virol*, 2009. **83**(16): p. 8108-21.
163. Min-Oo, G., et al., *Natural killer cells: walking three paths down memory lane*. *Trends Immunol*, 2013. **34**(6): p. 251-8.
164. Arnon, T.I., et al., *Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30*. *Eur J Immunol*, 2001. **31**(9): p. 2680-9.
165. Vivier, E., et al., *Functions of natural killer cells*. *Nat Immunol*, 2008. **9**(5): p. 503-10.
166. Fauriat, C., et al., *Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition*. *Blood*, 2010. **115**(11): p. 2167-76.
167. Ferlazzo, G. and B. Morandi, *Cross-Talks between Natural Killer Cells and Distinct Subsets of Dendritic Cells*. *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 159.
168. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, *The biology of human natural killer-cell subsets*. *Trends Immunol*, 2001. **22**(11): p. 633-40.

169. Deniz, G., et al., *Regulatory NK cells suppress antigen-specific T cell responses*. J Immunol, 2008. **180**(2): p. 850-7.
170. Luger, D., et al., *Intravenously Delivered Mesenchymal Stem Cells: Systemic Anti-Inflammatory Effects Improve Left Ventricular Dysfunction in Acute Myocardial Infarction and Ischemic Cardiomyopathy*. Circ Res, 2017. **120**(10): p. 1598-1613.
171. Hart, D.N., *Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response*. Blood, 1997. **90**(9): p. 3245-87.
172. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
173. Bell, D., J.W. Young, and J. Banchereau, *Dendritic cells*. Adv Immunol, 1999. **72**: p. 255-324.
174. Zhang, J., et al., *Interstitial dendritic cells of the rat heart. Quantitative and ultrastructural changes in experimental myocardial infarction*. Circulation, 1993. **87**(3): p. 909-20.
175. Naito, K., et al., *Differential effects of GM-CSF and G-CSF on infiltration of dendritic cells during early left ventricular remodeling after myocardial infarction*. J Immunol, 2008. **181**(8): p. 5691-701.
176. Maekawa, Y., et al., *Survival and cardiac remodeling after myocardial infarction are critically dependent on the host innate immune interleukin-1 receptor-associated kinase-4 signaling: a regulator of bone marrow-derived dendritic cells*. Circulation, 2009. **120**(14): p. 1401-14.
177. Anzai, A., et al., *Regulatory role of dendritic cells in postinfarction healing and left ventricular remodeling*. Circulation, 2012. **125**(10): p. 1234-45.
178. Choo, E.H., et al., *Infarcted Myocardium-Primed Dendritic Cells Improve Remodeling and Cardiac Function After Myocardial Infarction by Modulating the Regulatory T Cell and Macrophage Polarization*. Circulation, 2017. **135**(15): p. 1444-1457.
179. Krystel-Whittemore, M., K.N. Dileepan, and J.G. Wood, *Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 620.
180. Galli, S.J., M. Grimbaldeston, and M. Tsai, *Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(6): p. 478-86.

181. Dahlin, J.S., Z. Ding, and J. Hallgren, *Distinguishing Mast Cell Progenitors from Mature Mast Cells in Mice*. *Stem Cells Dev*, 2015. **24**(14): p. 1703-11.
182. Welle, M., *Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase*. *J Leukoc Biol*, 1997. **61**(3): p. 233-45.
183. Kritikou, E., et al., *The impact of mast cells on cardiovascular diseases*. *Eur J Pharmacol*, 2016. **778**: p. 103-15.
184. Frangogiannis, N.G., et al., *Stem cell factor induction is associated with mast cell accumulation after canine myocardial ischemia and reperfusion*. *Circulation*, 1998. **98**(7): p. 687-98.
185. Bot, I., T.J. van Berkel, and E.A. Biessen, *Mast cells: pivotal players in cardiovascular diseases*. *Curr Cardiol Rev*, 2008. **4**(3): p. 170-8.
186. Gailit, J., et al., *The differentiation and function of myofibroblasts is regulated by mast cell mediators*. *J Invest Dermatol*, 2001. **117**(5): p. 1113-9.
187. Janicki, J.S., G.L. Brower, and S.P. Levick, *The emerging prominence of the cardiac mast cell as a potent mediator of adverse myocardial remodeling*. *Methods Mol Biol*, 2015. **1220**: p. 121-39.
188. Istrătoaie, O., et al., *Myocardial interstitial fibrosis - histological and immunohistochemical aspects*. *Rom J Morphol Embryol*, 2015. **56**(4): p. 1473-80.
189. Bhattacharya, K., et al., *Mast cell deficient W/W^v mice have lower serum IL-6 and less cardiac tissue necrosis than their normal littermates following myocardial ischemia-reperfusion*. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2007. **20**(1): p. 69-74.
190. Mentkowski, K.I., et al., *Monocyte recruitment and fate specification after myocardial infarction*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2020. **319**(5): p. C797-C806.
191. Janeway, C.A. and J.M. Jason, *How T lymphocytes recognize antigen*. *Crit Rev Immunol*, 1980. **1**(2): p. 133-64.
192. Janeway, C.A., et al., *Modes of cell:cell communication in the immune system*. *J Immunol*, 1985. **135**(2 Suppl): p. 739s-742s.
193. Chen, L. and D.B. Flies, *Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition*. *Nat Rev Immunol*, 2013. **13**(4): p. 227-42.

194. Alegre, M.L., K.A. Frauwirth, and C.B. Thompson, *T-cell regulation by CD28 and CTLA-4*. *Nat Rev Immunol*, 2001. **1**(3): p. 220-8.
195. Yan, X., et al., *Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction*. *J Mol Cell Cardiol*, 2013. **62**: p. 24-35.
196. Sobirin, M.A., et al., *Activation of natural killer T cells ameliorates postinfarct cardiac remodeling and failure in mice*. *Circ Res*, 2012. **111**(8): p. 1037-47.
197. Weirather, J., et al., *Foxp3+ CD4+ T cells improve healing after myocardial infarction by modulating monocyte/macrophage differentiation*. *Circ Res*, 2014. **115**(1): p. 55-67.
198. Saxena, A., et al., *Regulatory T cells are recruited in the infarcted mouse myocardium and may modulate fibroblast phenotype and function*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014. **307**(8): p. H1233-42.
199. Curato, C., et al., *Identification of noncytotoxic and IL-10-producing CD8+AT2R+ T cell population in response to ischemic heart injury*. *J Immunol*, 2010. **185**(10): p. 6286-93.
200. Ilatovskaya, D.V., et al., *CD8*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2019. **317**(3): p. H581-H596.
201. Zougari, Y., et al., *B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after acute myocardial infarction*. *Nat Med*, 2013. **19**(10): p. 1273-80.
202. Garlanda, C., C.A. Dinarello, and A. Mantovani, *The interleukin-1 family: back to the future*. *Immunity*, 2013. **39**(6): p. 1003-18.
203. Dewald, O., et al., *Of mice and dogs: species-specific differences in the inflammatory response following myocardial infarction*. *Am J Pathol*, 2004. **164**(2): p. 665-77.
204. Saxena, A., et al., *IL-1 induces proinflammatory leukocyte infiltration and regulates fibroblast phenotype in the infarcted myocardium*. *J Immunol*, 2013. **191**(9): p. 4838-48.
205. Orn, S. and P. Aukrust, *The prediction of adverse cardiac remodelling following myocardial infarction: defining the need for a dynamic multimarker approach*. *Heart*, 2012. **98**(15): p. 1112-3.
206. Agostini, L., et al., *NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder*. *Immunity*, 2004. **20**(3): p. 319-25.

207. Kawaguchi, M., et al., *Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury*. *Circulation*, 2011. **123**(6): p. 594-604.
208. Woldbaek, P.R., et al., *Increased cardiac IL-18 mRNA, pro-IL-18 and plasma IL-18 after myocardial infarction in the mouse; a potential role in cardiac dysfunction*. *Cardiovasc Res*, 2003. **59**(1): p. 122-31.
209. Toldo, S., et al., *Interleukin-18 mediates interleukin-1-induced cardiac dysfunction*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014. **306**(7): p. H1025-31.
210. Mallat, Z., et al., *Increased plasma concentrations of interleukin-18 in acute coronary syndromes*. *Heart*, 2002. **88**(5): p. 467-9.
211. Sanada, S., et al., *IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(6): p. 1538-49.
212. Bujak, M. and N.G. Frangogiannis, *The role of IL-1 in the pathogenesis of heart disease*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2009. **57**(3): p. 165-76.
213. O'Brien, L.C., et al., *Interleukin-18 as a therapeutic target in acute myocardial infarction and heart failure*. *Mol Med*, 2014. **20**: p. 221-9.
214. Ing, D.J., et al., *Modulation of cytokine-induced cardiac myocyte apoptosis by nitric oxide, Bak, and Bcl-x*. *Circ Res*, 1999. **84**(1): p. 21-33.
215. Abbate, A., et al., *Anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, inhibits apoptosis in experimental acute myocardial infarction*. *Circulation*, 2008. **117**(20): p. 2670-83.
216. Harouki, N., et al., *The IL-18 Antibody Gevokizumab Limits Cardiac Remodeling and Coronary Dysfunction in Rats With Heart Failure*. *JACC Basic Transl Sci*, 2017. **2**(4): p. 418-430.
217. Colotta, F., et al., *Expression of a monocyte chemotactic cytokine by human mononuclear phagocytes*. *J Immunol*, 1992. **148**(3): p. 760-5.
218. Colotta, F., et al., *Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products*. *Blood*, 1992. **80**(8): p. 2012-20.
219. Suzuki, K., et al., *Overexpression of interleukin-1 receptor antagonist provides cardioprotection against ischemia-reperfusion injury associated with reduction in apoptosis*. *Circulation*, 2001. **104**(12 Suppl 1): p. I308-I3.

220. Bujak, M., et al., *Interleukin-1 receptor type I signaling critically regulates infarct healing and cardiac remodeling*. Am J Pathol, 2008. **173**(1): p. 57-67.
221. Shinde, A.V. and N.G. Frangogiannis, *Fibroblasts in myocardial infarction: a role in inflammation and repair*. J Mol Cell Cardiol, 2014. **70**: p. 74-82.
222. Turner, N.A., et al., *Interleukin-1alpha stimulates proinflammatory cytokine expression in human cardiac myofibroblasts*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **297**(3): p. H1117-27.
223. Siwik, D.A., D.L. Chang, and W.S. Colucci, *Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro*. Circ Res, 2000. **86**(12): p. 1259-65.
224. Turner, N.A., et al., *Modulatory effect of interleukin-1 α on expression of structural matrix proteins, MMPs and TIMPs in human cardiac myofibroblasts: role of p38 MAP kinase*. Matrix Biol, 2010. **29**(7): p. 613-20.
225. Murtuza, B., et al., *Transplantation of skeletal myoblasts secreting an IL-1 inhibitor modulates adverse remodeling in infarcted murine myocardium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(12): p. 4216-21.
226. Berk, B.C., K. Fujiwara, and S. Lehoux, *ECM remodeling in hypertensive heart disease*. J Clin Invest, 2007. **117**(3): p. 568-75.
227. Kong, P., P. Christia, and N.G. Frangogiannis, *The pathogenesis of cardiac fibrosis*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(4): p. 549-74.
228. Frangogiannis, N.G., et al., *IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury*. J Immunol, 2000. **165**(5): p. 2798-808.
229. Dobaczewski, M., W. Chen, and N.G. Frangogiannis, *Transforming growth factor (TGF)- β signaling in cardiac remodeling*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **51**(4): p. 600-6.
230. Zymek, P., et al., *Interleukin-10 is not a critical regulator of infarct healing and left ventricular remodeling*. Cardiovasc Res, 2007. **74**(2): p. 313-22.
231. Deroide, N., et al., *MFG8 inhibits inflammasome-induced IL-1 β production and limits postischemic cerebral injury*. J Clin Invest, 2013. **123**(3): p. 1176-81.
232. Chen, W., et al., *Endogenous IRAK-M attenuates postinfarction remodeling through effects on macrophages and fibroblasts*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(11): p. 2598-608.

233. Carswell, E.A., et al., *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(9): p. 3666-70.
234. Meldrum, D.R., *Tumor necrosis factor in the heart*. Am J Physiol, 1998. **274**(3): p. R577-95.
235. Jarrah, A.A., et al., *SDF-1 induces TNF-mediated apoptosis in cardiac myocytes*. Apoptosis, 2018. **23**(1): p. 79-91.
236. Finkel, M.S., et al., *Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide*. Science, 1992. **257**(5068): p. 387-9.
237. Kubota, T., et al., *Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha*. Circ Res, 1997. **81**(4): p. 627-35.
238. Aikawa, R., et al., *Reactive oxygen species induce cardiomyocyte apoptosis partly through TNF-alpha*. Cytokine, 2002. **18**(4): p. 179-83.
239. Bradham, W.S., et al., *Tumor necrosis factor-alpha and myocardial remodeling in progression of heart failure: a current perspective*. Cardiovasc Res, 2002. **53**(4): p. 822-30.
240. Janczewski, A.M., et al., *Morphological and functional changes in cardiac myocytes isolated from mice overexpressing TNF-alpha*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(3): p. H960-9.
241. Dibbs, Z.I., et al., *Targeted overexpression of transmembrane tumor necrosis factor provokes a concentric cardiac hypertrophic phenotype*. Circulation, 2003. **108**(8): p. 1002-8.
242. Haudek, S.B., et al., *TNF provokes cardiomyocyte apoptosis and cardiac remodeling through activation of multiple cell death pathways*. J Clin Invest, 2007. **117**(9): p. 2692-701.
243. Sivasubramanian, N., et al., *Left ventricular remodeling in transgenic mice with cardiac restricted overexpression of tumor necrosis factor*. Circulation, 2001. **104**(7): p. 826-31.
244. Monden, Y., et al., *Tumor necrosis factor-alpha is toxic via receptor 1 and protective via receptor 2 in a murine model of myocardial infarction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(1): p. H743-53.

245. Fang, L., et al., *Systemic inflammation is associated with myocardial fibrosis, diastolic dysfunction, and cardiac hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy*. Am J Transl Res, 2017. **9**(11): p. 5063-5073.
246. Eskandari, V., et al., *Gene expression and levels of IL-6 and TNF α in PBMCs correlate with severity and functional class in patients with chronic heart failure*. Ir J Med Sci, 2018. **187**(2): p. 359-368.
247. Valgimigli, M., et al., *Tumor necrosis factor-alpha receptor 1 is a major predictor of mortality and new-onset heart failure in patients with acute myocardial infarction: the Cytokine-Activation and Long-Term Prognosis in Myocardial Infarction (C-ALPHA) study*. Circulation, 2005. **111**(7): p. 863-70.
248. Chung, E.S., et al., *Randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot trial of infliximab, a chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor-alpha, in patients with moderate-to-severe heart failure: results of the anti-TNF Therapy Against Congestive Heart Failure (ATTACH) trial*. Circulation, 2003. **107**(25): p. 3133-40.
249. Mann, D.L., et al., *Targeted anticytokine therapy in patients with chronic heart failure: results of the Randomized Etanercept Worldwide Evaluation (RENEWAL)*. Circulation, 2004. **109**(13): p. 1594-602.
250. Fischer, P. and D. Hilfiker-Kleiner, *Role of gp130-mediated signalling pathways in the heart and its impact on potential therapeutic aspects*. Br J Pharmacol, 2008. **153 Suppl 1**: p. S414-27.
251. Hilfiker-Kleiner, D., et al., *Continuous glycoprotein-130-mediated signal transducer and activator of transcription-3 activation promotes inflammation, left ventricular rupture, and adverse outcome in subacute myocardial infarction*. Circulation, 2010. **122**(2): p. 145-55.
252. Mosser, D.M. and X. Zhang, *Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine*. Immunol Rev, 2008. **226**: p. 205-18.
253. Kaur, K., et al., *Biology of TNF α and IL-10, and their imbalance in heart failure*. Heart Fail Rev, 2009. **14**(2): p. 113-23.
254. Kaur, K., A.K. Sharma, and P.K. Singal, *Significance of changes in TNF-alpha and IL-10 levels in the progression of heart failure subsequent to myocardial infarction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(1): p. H106-13.

255. Silvestre, J.S., et al., *Regulation of matrix metalloproteinase activity in ischemic tissue by interleukin-10: role in ischemia-induced angiogenesis*. *Circ Res*, 2001. **89**(3): p. 259-64.
256. Stumpf, C., et al., *Decrease of serum levels of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 in patients with advanced chronic heart failure*. *Clin Sci (Lond)*, 2003. **105**(1): p. 45-50.
257. El Azab, S.R., et al., *Dexamethasone decreases the pro- to anti-inflammatory cytokine ratio during cardiac surgery*. *Br J Anaesth*, 2002. **88**(4): p. 496-501.
258. Chang, C., et al., *Chemerin15-Ameliorated Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury Is Associated with the Induction of Alternatively Activated Macrophages*. *Mediators Inflamm*, 2015. **2015**: p. 563951.
259. Cambier, L., et al., *Y RNA fragment in extracellular vesicles confers cardioprotection via modulation of IL-10 expression and secretion*. *EMBO Mol Med*, 2017. **9**(3): p. 337-352.
260. Chen, H., et al., *Stat5-dependent cardioprotection in late remote ischaemia preconditioning*. *Cardiovasc Res*, 2018. **114**(5): p. 679-689.
261. Ma, L.P., et al., *Interleukin-6-deficient mice resist development of experimental autoimmune cardiomyopathy induced by immunization of β 1-adrenergic receptor*. *Int J Cardiol*, 2012. **155**(1): p. 20-5.
262. Dhingra, S., et al., *p38 and ERK1/2 MAPKs mediate the interplay of TNF-alpha and IL-10 in regulating oxidative stress and cardiac myocyte apoptosis*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007. **293**(6): p. H3524-31.
263. Dhingra, S., et al., *IL-10 attenuates TNF-alpha-induced NF kappaB pathway activation and cardiomyocyte apoptosis*. *Cardiovasc Res*, 2009. **82**(1): p. 59-66.
264. Bagchi, A.K., et al., *Interleukin-10 activates Toll-like receptor 4 and requires MyD88 for cardiomyocyte survival*. *Cytokine*, 2013. **61**(1): p. 304-14.
265. Bagchi, A.K., et al., *Toll-like receptor 2 dominance over Toll-like receptor 4 in stressful conditions for its detrimental role in the heart*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2017. **312**(6): p. H1238-H1247.
266. Opal, S.M. and V.A. DePalo, *Anti-inflammatory cytokines*. *Chest*, 2000. **117**(4): p. 1162-72.

267. Hart, P.H., et al., *Potential antiinflammatory effects of interleukin 4: suppression of human monocyte tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and prostaglandin E2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(10): p. 3803-7.
268. Major, J., J.E. Fletcher, and T.A. Hamilton, *IL-4 pretreatment selectively enhances cytokine and chemokine production in lipopolysaccharide-stimulated mouse peritoneal macrophages*. J Immunol, 2002. **168**(5): p. 2456-63.
269. Luzina, I.G., et al., *Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of "alternatives"*. J Leukoc Biol, 2012. **92**(4): p. 753-64.
270. Martins, T.B., et al., *Risk factor analysis of plasma cytokines in patients with coronary artery disease by a multiplexed fluorescent immunoassay*. Am J Clin Pathol, 2006. **125**(6): p. 906-13.
271. Yan, W., et al., *Immune Cell Repertoire and Their Mediators in Patients with Acute Myocardial Infarction or Stable Angina Pectoris*. Int J Med Sci, 2017. **14**(2): p. 181-190.
272. Diny, N.L., et al., *Eosinophil-derived IL-4 drives progression of myocarditis to inflammatory dilated cardiomyopathy*. J Exp Med, 2017. **214**(4): p. 943-957.
273. Roselló-Lletí, E., et al., *[Interleukin-4 and cardiac fibrosis in patients with heart failure]*. Rev Esp Cardiol, 2007. **60**(7): p. 777-80.
274. Peng, H., et al., *Profibrotic Role for Interleukin-4 in Cardiac Remodeling and Dysfunction*. Hypertension, 2015. **66**(3): p. 582-9.
275. Shiraishi, M., et al., *Alternatively activated macrophages determine repair of the infarcted adult murine heart*. J Clin Invest, 2016. **126**(6): p. 2151-66.
276. Shintani, Y., et al., *IL-4 as a Repurposed Biological Drug for Myocardial Infarction through Augmentation of Reparative Cardiac Macrophages: Proof-of-Concept Data in Mice*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 6877.
277. Hanna, A. and N.G. Frangogiannis, *The Role of the TGF- β Superfamily in Myocardial Infarction*. Front Cardiovasc Med, 2019. **6**: p. 140.
278. Shi, Y. and J. Massagué, *Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus*. Cell, 2003. **113**(6): p. 685-700.
279. Macias, M.J., P. Martin-Malpartida, and J. Massagué, *Structural determinants of Smad function in TGF- β signaling*. Trends Biochem Sci, 2015. **40**(6): p. 296-308.

280. Frangogiannis, N.G., *The role of transforming growth factor (TGF)- β in the infarcted myocardium*. J Thorac Dis, 2017. **9**(Suppl 1): p. S52-S63.
281. Thompson, N.L., et al., *Expression of transforming growth factor-beta 1 in specific cells and tissues of adult and neonatal mice*. J Cell Biol, 1989. **108**(2): p. 661-9.
282. Heine, U., et al., *Role of transforming growth factor-beta in the development of the mouse embryo*. J Cell Biol, 1987. **105**(6 Pt 2): p. 2861-76.
283. Bartram, U., et al., *Double-outlet right ventricle and overriding tricuspid valve reflect disturbances of looping, myocardialization, endocardial cushion differentiation, and apoptosis in TGF-beta(2)-knockout mice*. Circulation, 2001. **103**(22): p. 2745-52.
284. Umbarkar, P., et al., *Cardiomyocyte SMAD4-Dependent TGF- β Signaling is Essential to Maintain Adult Heart Homeostasis*. JACC Basic Transl Sci, 2019. **4**(1): p. 41-53.
285. Wünsch, M., et al., *In situ localization of transforming growth factor beta 1 in porcine heart: enhanced expression after chronic coronary artery constriction*. J Mol Cell Cardiol, 1991. **23**(9): p. 1051-62.
286. Vilahur, G., et al., *Molecular and cellular mechanisms involved in cardiac remodeling after acute myocardial infarction*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **50**(3): p. 522-33.
287. Hao, J., et al., *Elevation of expression of Smads 2, 3, and 4, decorin and TGF-beta in the chronic phase of myocardial infarct scar healing*. J Mol Cell Cardiol, 1999. **31**(3): p. 667-78.
288. Deten, A., et al., *Changes in extracellular matrix and in transforming growth factor beta isoforms after coronary artery ligation in rats*. J Mol Cell Cardiol, 2001. **33**(6): p. 1191-207.
289. Bujak, M. and N.G. Frangogiannis, *The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling*. Cardiovasc Res, 2007. **74**(2): p. 184-95.
290. van Amerongen, M.J., et al., *Macrophage depletion impairs wound healing and increases left ventricular remodeling after myocardial injury in mice*. Am J Pathol, 2007. **170**(3): p. 818-29.
291. Dewald, O., et al., *CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts*. Circ Res, 2005. **96**(8): p. 881-9.
292. Annes, J.P., J.S. Munger, and D.B. Rifkin, *Making sense of latent TGFbeta activation*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 2): p. 217-24.

293. Gentry, L.E. and B.W. Nash, *The pro domain of pre-pro-transforming growth factor beta 1 when independently expressed is a functional binding protein for the mature growth factor*. *Biochemistry*, 1990. **29**(29): p. 6851-7.
294. Robertson, I.B. and D.B. Rifkin, *Regulation of the Bioavailability of TGF- β and TGF- β -Related Proteins*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2016. **8**(6).
295. Birdsall, H.H., et al., *Complement C5a, TGF-beta 1, and MCP-1, in sequence, induce migration of monocytes into ischemic canine myocardium within the first one to five hours after reperfusion*. *Circulation*, 1997. **95**(3): p. 684-92.
296. Nishimura, S.L., *Integrin-mediated transforming growth factor-beta activation, a potential therapeutic target in fibrogenic disorders*. *Am J Pathol*, 2009. **175**(4): p. 1362-70.
297. Spinale, F.G., *Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function*. *Physiol Rev*, 2007. **87**(4): p. 1285-342.
298. Villarreal, F., et al., *Early degradation and serum appearance of type I collagen fragments after myocardial infarction*. *J Mol Cell Cardiol*, 2004. **36**(4): p. 597-601.
299. Liu, C.L., et al., *Cysteine protease cathepsins in cardiovascular disease: from basic research to clinical trials*. *Nat Rev Cardiol*, 2018. **15**(6): p. 351-370.
300. Frangogiannis, N.G., et al., *Critical role of endogenous thrombospondin-1 in preventing expansion of healing myocardial infarcts*. *Circulation*, 2005. **111**(22): p. 2935-42.
301. Frangogiannis, N.G., *Matricellular proteins in cardiac adaptation and disease*. *Physiol Rev*, 2012. **92**(2): p. 635-88.
302. Schellings, M.W., Y.M. Pinto, and S. Heymans, *Matricellular proteins in the heart: possible role during stress and remodeling*. *Cardiovasc Res*, 2004. **64**(1): p. 24-31.
303. Frangogiannis, N.G., *The immune system and cardiac repair*. *Pharmacol Res*, 2008. **58**(2): p. 88-111.
304. Döring, Y., et al., *The CXCL12/CXCR4 chemokine ligand/receptor axis in cardiovascular disease*. *Front Physiol*, 2014. **5**: p. 212.
305. Penn, M.S., et al., *SDF-1 in myocardial repair*. *Gene Ther*, 2012. **19**(6): p. 583-7.
306. Porrello, E.R., et al., *Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart*. *Science*, 2011. **331**(6020): p. 1078-80.

307. Willems, I.E., et al., *The alpha-smooth muscle actin-positive cells in healing human myocardial scars*. Am J Pathol, 1994. **145**(4): p. 868-75.
308. Talman, V. and H. Ruskoaho, *Cardiac fibrosis in myocardial infarction-from repair and remodeling to regeneration*. Cell Tissue Res, 2016. **365**(3): p. 563-81.
309. Vanhoutte, D., et al., *Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: a temporal and spatial window*. Cardiovasc Res, 2006. **69**(3): p. 604-13.
310. Matsui, Y., J. Morimoto, and T. Uede, *Role of matricellular proteins in cardiac tissue remodeling after myocardial infarction*. World J Biol Chem, 2010. **1**(5): p. 69-80.
311. González-Santamaría, J., et al., *Matrix cross-linking lysyl oxidases are induced in response to myocardial infarction and promote cardiac dysfunction*. Cardiovasc Res, 2016. **109**(1): p. 67-78.
312. Rodríguez, C. and J. Martínez-González, *The Role of Lysyl Oxidase Enzymes in Cardiac Function and Remodeling*. Cells, 2019. **8**(12).
313. Forte, E., M.B. Furtado, and N. Rosenthal, *The interstitium in cardiac repair: role of the immune-stromal cell interplay*. Nat Rev Cardiol, 2018. **15**(10): p. 601-616.
314. van den Borne, S.W., et al., *Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts*. Nat Rev Cardiol, 2010. **7**(1): p. 30-7.
315. Burchfield, J.S., M. Xie, and J.A. Hill, *Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2*. Circulation, 2013. **128**(4): p. 388-400.
316. Zhang, P., et al., *Multiscale Characterization of Impact of Infarct Size on Myocardial Remodeling in an Ovine Infarct Model*. Cells Tissues Organs, 2015. **200**(5): p. 349-62.
317. Konstam, M.A., et al., *Left ventricular remodeling in heart failure: current concepts in clinical significance and assessment*. JACC Cardiovasc Imaging, 2011. **4**(1): p. 98-108.
318. Nehra, S., R.J. Gumina, and S.S. Bansal, *Immune cell Dilemma in Ischemic Cardiomyopathy: To Heal or Not to Heal*. Curr Opin Physiol, 2021. **19**: p. 39-46.
319. Yan, A.T., et al., *Characterization of the peri-infarct zone by contrast-enhanced cardiac magnetic resonance imaging is a powerful predictor of post-myocardial infarction mortality*. Circulation, 2006. **114**(1): p. 32-9.
320. López, B., et al., *Diffuse myocardial fibrosis: mechanisms, diagnosis and therapeutic approaches*. Nat Rev Cardiol, 2021.

321. Meier, P., et al., *The impact of the coronary collateral circulation on mortality: a meta-analysis*. Eur Heart J, 2012. **33**(5): p. 614-21.
322. Habib, G.B., et al., *Influence of coronary collateral vessels on myocardial infarct size in humans. Results of phase I thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) trial. The TIMI Investigators*. Circulation, 1991. **83**(3): p. 739-46.
323. Billinger, M., et al., *Physiologically assessed coronary collateral flow and adverse cardiac ischemic events: a follow-up study in 403 patients with coronary artery disease*. J Am Coll Cardiol, 2002. **40**(9): p. 1545-50.
324. Hansen, J.F., *Coronary collateral circulation: clinical significance and influence on survival in patients with coronary artery occlusion*. Am Heart J, 1989. **117**(2): p. 290-5.
325. van der Laan, A.M., J.J. Piek, and N. van Royen, *Targeting angiogenesis to restore the microcirculation after reperfused MI*. Nat Rev Cardiol, 2009. **6**(8): p. 515-23.
326. Shiojima, I., et al., *Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure*. J Clin Invest, 2005. **115**(8): p. 2108-18.
327. Waddington, C.H., *Towards a theoretical biology*. Nature, 1968. **218**(5141): p. 525-7.
328. Yan, M.S., C.C. Matouk, and P.A. Marsden, *Epigenetics of the vascular endothelium*. J Appl Physiol (1985), 2010. **109**(3): p. 916-26.
329. Widom, J., *Structure, dynamics, and function of chromatin in vitro*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1998. **27**: p. 285-327.
330. Kornberg, R.D., *Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA*. Science, 1974. **184**(4139): p. 868-71.
331. Richmond, T.J., et al., *Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution*. Nature, 1984. **311**(5986): p. 532-7.
332. Finch, J.T., et al., *Structure of nucleosome core particles of chromatin*. Nature, 1977. **269**(5623): p. 29-36.
333. Luger, K., *Dynamic nucleosomes*. Chromosome Res, 2006. **14**(1): p. 5-16.
334. Kouzarides, T., *Chromatin modifications and their function*. Cell, 2007. **128**(4): p. 693-705.
335. Harshman, S.W., et al., *H1 histones: current perspectives and challenges*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(21): p. 9593-609.

336. Harshman, S.W., et al., *Isolation and analysis of linker histones across cellular compartments*. J Proteomics, 2013. **91**: p. 595-604.
337. Luger, K., et al., *Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution*. Nature, 1997. **389**(6648): p. 251-60.
338. Olins, A.L. and D.E. Olins, *Spheroid chromatin units (v bodies)*. Science, 1974. **183**(4122): p. 330-2.
339. Sawan, C. and Z. Herceg, *Histone modifications and cancer*. Adv Genet, 2010. **70**: p. 57-85.
340. Turgeon, P.J., A.N. Sukumar, and P.A. Marsden, *Epigenetics of Cardiovascular Disease - A New "Beat" in Coronary Artery Disease*. Med Epigenet, 2014. **2**(1): p. 37-52.
341. Herman, J.G. and S.B. Baylin, *Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation*. N Engl J Med, 2003. **349**(21): p. 2042-54.
342. Auclair, G. and M. Weber, *Mechanisms of DNA methylation and demethylation in mammals*. Biochimie, 2012. **94**(11): p. 2202-11.
343. Bird, A., *DNA methylation patterns and epigenetic memory*. Genes Dev, 2002. **16**(1): p. 6-21.
344. Deaton, A.M. and A. Bird, *CpG islands and the regulation of transcription*. Genes Dev, 2011. **25**(10): p. 1010-22.
345. Rottach, A., H. Leonhardt, and F. Spada, *DNA methylation-mediated epigenetic control*. J Cell Biochem, 2009. **108**(1): p. 43-51.
346. Fernandez, A.F., C. Huidobro, and M.F. Fraga, *De novo DNA methyltransferases: oncogenes, tumor suppressors, or both?* Trends Genet, 2012. **28**(10): p. 474-9.
347. Okano, M., S. Xie, and E. Li, *Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases*. Nat Genet, 1998. **19**(3): p. 219-20.
348. Collas, P., A. Noer, and A.L. Sørensen, *Epigenetic Basis for the Differentiation Potential of Mesenchymal and Embryonic Stem Cells*. Transfus Med Hemother, 2008. **35**(3): p. 205-215.
349. Okano, M., et al., *DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development*. Cell, 1999. **99**(3): p. 247-57.
350. Bestor, T.H., *The DNA methyltransferases of mammals*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(16): p. 2395-402.

351. Chuang, L.S., et al., *Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1*. *Science*, 1997. **277**(5334): p. 1996-2000.
352. Easwaran, H.P., et al., *Replication-independent chromatin loading of Dnmt1 during G2 and M phases*. *EMBO Rep*, 2004. **5**(12): p. 1181-6.
353. Jurkowska, R.Z., et al., *Approaches to enzyme and substrate design of the murine Dnmt3a DNA methyltransferase*. *Chembiochem*, 2011. **12**(10): p. 1589-94.
354. Goll, M.G., et al., *Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2*. *Science*, 2006. **311**(5759): p. 395-8.
355. Hermann, A., H. Gowher, and A. Jeltsch, *Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases*. *Cell Mol Life Sci*, 2004. **61**(19-20): p. 2571-87.
356. Portela, A. and M. Esteller, *Epigenetic modifications and human disease*. *Nat Biotechnol*, 2010. **28**(10): p. 1057-68.
357. Zampieri, M., et al., *Reconfiguration of DNA methylation in aging*. *Mech Ageing Dev*, 2015. **151**: p. 60-70.
358. Bhutani, N., D.M. Burns, and H.M. Blau, *DNA demethylation dynamics*. *Cell*, 2011. **146**(6): p. 866-72.
359. Branco, M.R., G. Ficz, and W. Reik, *Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome*. *Nat Rev Genet*, 2011. **13**(1): p. 7-13.
360. Wu, H. and Y. Zhang, *Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation*. *Genes Dev*, 2011. **25**(23): p. 2436-52.
361. Narlikar, G.J., H.Y. Fan, and R.E. Kingston, *Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription*. *Cell*, 2002. **108**(4): p. 475-87.
362. Gräff, J. and I.M. Mansuy, *Epigenetic codes in cognition and behaviour*. *Behav Brain Res*, 2008. **192**(1): p. 70-87.
363. Rando, O.J. and H.Y. Chang, *Genome-wide views of chromatin structure*. *Annu Rev Biochem*, 2009. **78**: p. 245-71.
364. Sharma, S.V., et al., *A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations*. *Cell*, 2010. **141**(1): p. 69-80.
365. Bannister, A.J. and T. Kouzarides, *Regulation of chromatin by histone modifications*. *Cell Res*, 2011. **21**(3): p. 381-95.

366. Tollervey, J.R. and V.V. Lunyak, *Epigenetics: judge, jury and executioner of stem cell fate*. *Epigenetics*, 2012. **7**(8): p. 823-40.
367. Vakoc, C.R., et al., *Profile of histone lysine methylation across transcribed mammalian chromatin*. *Mol Cell Biol*, 2006. **26**(24): p. 9185-95.
368. Li, B., M. Carey, and J.L. Workman, *The role of chromatin during transcription*. *Cell*, 2007. **128**(4): p. 707-19.
369. Arrowsmith, C.H., et al., *Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery*. *Nat Rev Drug Discov*, 2012. **11**(5): p. 384-400.
370. Liang, G., et al., *Distinct localization of histone H3 acetylation and H3-K4 methylation to the transcription start sites in the human genome*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(19): p. 7357-62.
371. Bedford, M.T. and S.G. Clarke, *Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why*. *Mol Cell*, 2009. **33**(1): p. 1-13.
372. Ng, S.S., et al., *Dynamic protein methylation in chromatin biology*. *Cell Mol Life Sci*, 2009. **66**(3): p. 407-22.
373. Han, D., et al., *Lysine methylation of transcription factors in cancer*. *Cell Death Dis*, 2019. **10**(4): p. 290.
374. Zhang, Y. and D. Reinberg, *Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails*. *Genes Dev*, 2001. **15**(18): p. 2343-60.
375. Xiao, T., et al., *Phosphorylation of RNA polymerase II CTD regulates H3 methylation in yeast*. *Genes Dev*, 2003. **17**(5): p. 654-63.
376. Rea, S., et al., *Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases*. *Nature*, 2000. **406**(6796): p. 593-9.
377. Khan, A.U. and M. Hampsey, *Connecting the DOTs: covalent histone modifications and the formation of silent chromatin*. *Trends Genet*, 2002. **18**(8): p. 387-9.
378. Lacoste, N. and J. Côté, *[The epigenetic code of histones]*. *Med Sci (Paris)*, 2003. **19**(10): p. 955-9.
379. Barski, A., et al., *High-resolution profiling of histone methylations in the human genome*. *Cell*, 2007. **129**(4): p. 823-37.

380. Guenther, M.G., et al., *A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells*. Cell, 2007. **130**(1): p. 77-88.
381. Mikkelsen, T.S., et al., *Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells*. Nature, 2007. **448**(7153): p. 553-60.
382. Zhao, X.D., et al., *Whole-genome mapping of histone H3 Lys4 and 27 trimethylations reveals distinct genomic compartments in human embryonic stem cells*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(3): p. 286-98.
383. Pan, G., et al., *Whole-genome analysis of histone H3 lysine 4 and lysine 27 methylation in human embryonic stem cells*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(3): p. 299-312.
384. Bernstein, B.E., et al., *A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells*. Cell, 2006. **125**(2): p. 315-26.
385. Zhou, V.W., A. Goren, and B.E. Bernstein, *Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes*. Nat Rev Genet, 2011. **12**(1): p. 7-18.
386. Spannhoff, A., et al., *The emerging therapeutic potential of histone methyltransferase and demethylase inhibitors*. ChemMedChem, 2009. **4**(10): p. 1568-82.
387. Zhang, X., H. Wen, and X. Shi, *Lysine methylation: beyond histones*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2012. **44**(1): p. 14-27.
388. Margueron, R. and D. Reinberg, *The Polycomb complex PRC2 and its mark in life*. Nature, 2011. **469**(7330): p. 343-9.
389. Ohtani, K. and S. Dimmeler, *Epigenetic regulation of cardiovascular differentiation*. Cardiovasc Res, 2011. **90**(3): p. 404-12.
390. Duncan, I.M., *Polycomblike: a gene that appears to be required for the normal expression of the bithorax and antenapedia gene complexes of Drosophila melanogaster*. Genetics, 1982. **102**(1): p. 49-70.
391. Lewis, E.B., *A gene complex controlling segmentation in Drosophila*. Nature, 1978. **276**(5688): p. 565-70.
392. Simon, J., *Locking in stable states of gene expression: transcriptional control during Drosophila development*. Curr Opin Cell Biol, 1995. **7**(3): p. 376-85.
393. Gaytán de Ayala Alonso, A., et al., *A genetic screen identifies novel polycomb group genes in Drosophila*. Genetics, 2007. **176**(4): p. 2099-108.

394. Entrevan, M., B. Schuettengruber, and G. Cavalli, *Regulation of Genome Architecture and Function by Polycomb Proteins*. Trends Cell Biol, 2016. **26**(7): p. 511-525.
395. Piunti, A. and A. Shilatifard, *Epigenetic balance of gene expression by Polycomb and COMPASS families*. Science, 2016. **352**(6290): p. aad9780.
396. Aranda, S., G. Mas, and L. Di Croce, *Regulation of gene transcription by Polycomb proteins*. Sci Adv, 2015. **1**(11): p. e1500737.
397. Scheuermann, J.C., et al., *Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB*. Nature, 2010. **465**(7295): p. 243-7.
398. Chittock, E.C., et al., *Molecular architecture of polycomb repressive complexes*. Biochem Soc Trans, 2017. **45**(1): p. 193-205.
399. Stock, J.K., et al., *Ring1-mediated ubiquitination of H2A restrains poised RNA polymerase II at bivalent genes in mouse ES cells*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(12): p. 1428-35.
400. Endoh, M., et al., *Histone H2A mono-ubiquitination is a crucial step to mediate PRC1-dependent repression of developmental genes to maintain ES cell identity*. PLoS Genet, 2012. **8**(7): p. e1002774.
401. Shao, Z., et al., *Stabilization of chromatin structure by PRC1, a Polycomb complex*. Cell, 1999. **98**(1): p. 37-46.
402. Wang, H., et al., *Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing*. Nature, 2004. **431**(7010): p. 873-8.
403. Francis, N.J., R.E. Kingston, and C.L. Woodcock, *Chromatin compaction by a polycomb group protein complex*. Science, 2004. **306**(5701): p. 1574-7.
404. Min, I.M., et al., *Regulating RNA polymerase pausing and transcription elongation in embryonic stem cells*. Genes Dev, 2011. **25**(7): p. 742-54.
405. Aloia, L., B. Di Stefano, and L. Di Croce, *Polycomb complexes in stem cells and embryonic development*. Development, 2013. **140**(12): p. 2525-34.
406. Sanchez-Pulido, L., et al., *RAWUL: a new ubiquitin-like domain in PRC1 ring finger proteins that unveils putative plant and worm PRC1 orthologs*. BMC Genomics, 2008. **9**: p. 308.
407. Bezsonova, I., et al., *Ring1B contains a ubiquitin-like docking module for interaction with Cbx proteins*. Biochemistry, 2009. **48**(44): p. 10542-8.

408. Gao, Z., et al., *PCGF homologs, CBX proteins, and RYBP define functionally distinct PRC1 family complexes*. Mol Cell, 2012. **45**(3): p. 344-56.
409. Kloet, S.L., et al., *The dynamic interactome and genomic targets of Polycomb complexes during stem-cell differentiation*. Nat Struct Mol Biol, 2016. **23**(7): p. 682-690.
410. Czermin, B., et al., *Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites*. Cell, 2002. **111**(2): p. 185-96.
411. Müller, J., et al., *Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex*. Cell, 2002. **111**(2): p. 197-208.
412. Cao, R., et al., *Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing*. Science, 2002. **298**(5595): p. 1039-43.
413. Kuzmichev, A., et al., *Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein*. Genes Dev, 2002. **16**(22): p. 2893-905.
414. Krumlauf, R., *Hox genes in vertebrate development*. Cell, 1994. **78**(2): p. 191-201.
415. Tie, F., et al., *A 1-megadalton ESC/E(Z) complex from Drosophila that contains polycomblike and RPD3*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(9): p. 3352-62.
416. Sparmann, A. and M. van Lohuizen, *Polycomb silencers control cell fate, development and cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(11): p. 846-56.
417. Heard, E., *Delving into the diversity of facultative heterochromatin: the epigenetics of the inactive X chromosome*. Curr Opin Genet Dev, 2005. **15**(5): p. 482-9.
418. Wang, Z., et al., *The long noncoding RNA Chaer defines an epigenetic checkpoint in cardiac hypertrophy*. Nat Med, 2016. **22**(10): p. 1131-1139.
419. Wang, Y., et al., *EZH2 RIP-seq Identifies Tissue-specific Long Non-coding RNAs*. Curr Gene Ther, 2018. **18**(5): p. 275-285.
420. Jiao, L. and X. Liu, *Structural basis of histone H3K27 trimethylation by an active polycomb repressive complex 2*. Science, 2015. **350**(6258): p. aac4383.
421. Wu, H., et al., *Structure of the catalytic domain of EZH2 reveals conformational plasticity in cofactor and substrate binding sites and explains oncogenic mutations*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e83737.

422. Wang, R., et al., *Polycomb group targeting through different binding partners of RING1B C-terminal domain*. Structure, 2010. **18**(8): p. 966-75.
423. Xu, J., et al., *Developmental control of polycomb subunit composition by GATA factors mediates a switch to non-canonical functions*. Mol Cell, 2015. **57**(2): p. 304-316.
424. Bracken, A.P., et al., *Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions*. Genes Dev, 2006. **20**(9): p. 1123-36.
425. O'Carroll, D., et al., *The polycomb-group gene Ezh2 is required for early mouse development*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(13): p. 4330-6.
426. Caretti, G., et al., *The Polycomb Ezh2 methyltransferase regulates muscle gene expression and skeletal muscle differentiation*. Genes Dev, 2004. **18**(21): p. 2627-38.
427. Richter, G.H., et al., *EZH2 is a mediator of EWS/FLI1 driven tumor growth and metastasis blocking endothelial and neuro-ectodermal differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(13): p. 5324-9.
428. Lu, C., et al., *Regulation of tumor angiogenesis by EZH2*. Cancer Cell, 2010. **18**(2): p. 185-97.
429. He, A., et al., *Polycomb repressive complex 2 regulates normal development of the mouse heart*. Circ Res, 2012. **110**(3): p. 406-15.
430. Moses, K.A., et al., *Embryonic expression of an Nkx2-5/Cre gene using ROSA26 reporter mice*. Genesis, 2001. **31**(4): p. 176-80.
431. Chen, L., et al., *Conditional ablation of Ezh2 in murine hearts reveals its essential roles in endocardial cushion formation, cardiomyocyte proliferation and survival*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e31005.
432. Quaife-Ryan, G.A., et al., *Resetting the epigenome for heart regeneration*. Semin Cell Dev Biol, 2016. **58**: p. 2-13.
433. Felician, G., et al., *Epigenetic modification at Notch responsive promoters blunts efficacy of inducing notch pathway reactivation after myocardial infarction*. Circ Res, 2014. **115**(7): p. 636-49.
434. Fraineau, S., et al., *Epigenetic Activation of Pro-angiogenic Signaling Pathways in Human Endothelial Progenitors Increases Vasculogenesis*. Stem Cell Reports, 2017. **9**(5): p. 1573-1587.

435. Shi, Y., et al., *Structure of the PRC2 complex and application to drug discovery*. Acta Pharmacol Sin, 2017. **38**(7): p. 963-976.
436. Bugide, S., M.R. Green, and N. Wajapeyee, *Inhibition of Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) induces natural killer cell-mediated eradication of hepatocellular carcinoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(15): p. E3509-E3518.
437. Kim, W., et al., *Targeted disruption of the EZH2-EED complex inhibits EZH2-dependent cancer*. Nat Chem Biol, 2013. **9**(10): p. 643-50.
438. Gunawan, M., et al., *The methyltransferase Ezh2 controls cell adhesion and migration through direct methylation of the extranuclear regulatory protein talin*. Nat Immunol, 2015. **16**(5): p. 505-16.
439. Bantug, G.R. and C. Hess, *Glycolysis and EZH2 boost T cell weaponry against tumors*. Nat Immunol, 2016. **17**(1): p. 41-2.
440. Zhao, E., et al., *Cancer mediates effector T cell dysfunction by targeting microRNAs and EZH2 via glycolysis restriction*. Nat Immunol, 2016. **17**(1): p. 95-103.
441. Lehtonen, A., et al., *Gene expression profiling during differentiation of human monocytes to macrophages or dendritic cells*. J Leukoc Biol, 2007. **82**(3): p. 710-20.
442. Davis, F.M. and K.A. Gallagher, *Epigenetic Mechanisms in Monocytes/Macrophages Regulate Inflammation in Cardiometabolic and Vascular Disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2019. **39**(4): p. 623-634.
443. Van den Bossche, J., et al., *Macrophage polarization: the epigenetic point of view*. Curr Opin Lipidol, 2014. **25**(5): p. 367-73.
444. Bowdridge, S. and W.C. Gause, *Regulation of alternative macrophage activation by chromatin remodeling*. Nat Immunol, 2010. **11**(10): p. 879-81.
445. Satoh, T., et al., *The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection*. Nat Immunol, 2010. **11**(10): p. 936-44.
446. Ishii, M., et al., *Epigenetic regulation of the alternatively activated macrophage phenotype*. Blood, 2009. **114**(15): p. 3244-54.
447. Hsu, A.T., et al., *Epigenetic and transcriptional regulation of IL4-induced CCL17 production in human monocytes and murine macrophages*. J Biol Chem, 2018. **293**(29): p. 11415-11423.

448. Neele, A.E. and M.P.J. de Winther, *Repressing the repressor: Ezh2 mediates macrophage activation*. J Exp Med, 2018. **215**(5): p. 1269-1271.
449. Zhang, X., et al., *Macrophage/microglial Ezh2 facilitates autoimmune inflammation through inhibition of Socs3*. J Exp Med, 2018. **215**(5): p. 1365-1382.
450. Su, I.H., et al., *Polycomb group protein ezh2 controls actin polymerization and cell signaling*. Cell, 2005. **121**(3): p. 425-36.
451. Roy, A., N.P. Basak, and S. Banerjee, *Notch1 intracellular domain increases cytoplasmic EZH2 levels during early megakaryopoiesis*. Cell Death Dis, 2012. **3**: p. e380.
452. Anwar, T., et al., *p38-mediated phosphorylation at T367 induces EZH2 cytoplasmic localization to promote breast cancer metastasis*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 2801.
453. Gonzalez, M.E., et al., *EZH2 expands breast stem cells through activation of NOTCH1 signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(8): p. 3098-103.
454. Kim, E., et al., *Phosphorylation of EZH2 activates STAT3 signaling via STAT3 methylation and promotes tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells*. Cancer Cell, 2013. **23**(6): p. 839-52.
455. Lee, J.M., et al., *EZH2 generates a methyl degron that is recognized by the DCAF1/DDB1/CUL4 E3 ubiquitin ligase complex*. Mol Cell, 2012. **48**(4): p. 572-86.
456. Sanulli, S., et al., *Jarid2 Methylation via the PRC2 Complex Regulates H3K27me3 Deposition during Cell Differentiation*. Mol Cell, 2015. **57**(5): p. 769-783.
457. Shi, B., et al., *Integration of estrogen and Wnt signaling circuits by the polycomb group protein EZH2 in breast cancer cells*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(14): p. 5105-19.
458. Negoro, S., et al., *Activation of signal transducer and activator of transcription 3 protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress through the upregulation of manganese superoxide dismutase*. Circulation, 2001. **104**(9): p. 979-81.
459. He, B., et al., *The nuclear melatonin receptor ROR α is a novel endogenous defender against myocardial ischemia/reperfusion injury*. J Pineal Res, 2016. **60**(3): p. 313-26.
460. Kelly, C., C. Jefferies, and S.A. Cryan, *Targeted liposomal drug delivery to monocytes and macrophages*. J Drug Deliv, 2011. **2011**: p. 727241.

461. Harel-Adar, T., et al., *Modulation of cardiac macrophages by phosphatidylserine-presenting liposomes improves infarct repair*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(5): p. 1827-32.
462. Zhou, Q., et al., *Risk of Colorectal Cancer in Ulcerative Colitis Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis*. Gastroenterol Res Pract, 2019. **2019**: p. 5363261.
463. Lee, S., et al., *The Role of the Histone Methyltransferase EZH2 in Liver Inflammation and Fibrosis in STAM NASH Mice*. Biology (Basel), 2020. **9**(5).
464. Luo, Y., et al., *Inhibition of EZH2 (Enhancer of Zeste Homolog 2) Attenuates Neuroinflammation via H3k27me3/SOCS3/TRAF6/NF- κ B (Trimethylation of Histone 3 Lysine 27/Suppressor of Cytokine Signaling 3/Tumor Necrosis Factor Receptor Family 6/Nuclear Factor- κ B) in a Rat Model of Subarachnoid Hemorrhage*. Stroke, 2020. **51**(11): p. 3320-3331.
465. Tabbal, H., et al., *EZH2 cooperates with E2F1 to stimulate expression of genes involved in adrenocortical carcinoma aggressiveness*. Br J Cancer, 2019. **121**(5): p. 384-394.
466. Marshall, D., et al., *Blockade of colony stimulating factor-1 (CSF-I) leads to inhibition of DSS-induced colitis*. Inflamm Bowel Dis, 2007. **13**(2): p. 219-24.
467. Qin, H., et al., *SOCS3 deficiency promotes M1 macrophage polarization and inflammation*. J Immunol, 2012. **189**(7): p. 3439-48.
468. Qin, H., et al., *Correction: SOCS3 Deficiency Promotes M1 Macrophage Polarization and Inflammation*. J Immunol, 2016. **197**(1): p. 387-9.
469. Hénaut, L. and Z.A. Massy, *New insights into the key role of interleukin 6 in vascular calcification of chronic kidney disease*. Nephrol Dial Transplant, 2018. **33**(4): p. 543-548.
470. Garcia-Rodriguez, C., et al., *Toll-Like Receptors, Inflammation, and Calcific Aortic Valve Disease*. Front Physiol, 2018. **9**: p. 201.
471. Lerman, D.A., S. Prasad, and N. Alotti, *Calcific Aortic Valve Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches*. Eur Cardiol, 2015. **10**(2): p. 108-112.
472. Pepin, M.E., et al., *Genome-wide DNA methylation encodes cardiac transcriptional reprogramming in human ischemic heart failure*. Lab Invest, 2019. **99**(3): p. 371-386.

473. Tarnavski, O., et al., *Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies*. *Physiol Genomics*, 2004. **16**(3): p. 349-60.
474. Doenst, T., T.D. Nguyen, and E.D. Abel, *Cardiac metabolism in heart failure: implications beyond ATP production*. *Circ Res*, 2013. **113**(6): p. 709-24.

Annexes

Annexe 1 : Curriculum vitae

Julie Rondeaux

PhD Student in Biomedical Sciences

29 years old

1162 rue Clemenceau, 76580 Le Trait, FRANCE

+33 6.89.47.04.67

julie.rdx@gmail.com

EDUCATION

2017-20 PhD student in Biomedical Sciences

Epigenetic control of cardiac angiogenesis and lymphangiogenesis induced by myeloid cells. INSERM U1096 "EnVI" Endothelium, Valvulopathy & Heart Failure. Rouen University, FRANCE.

2014-16 Master's Degree in biomedical sciences

Second year: Option Cell signaling and differentiation with High honors, ranked 2nd/7. Normandy University.

6-month Internship: «Histone post-translational modifications evaluation (H3K4me3, H3K9ac and H4K8ac) in mouse germ cells after in vitro maturation of fresh or Frozen/thawed prepubertal testicular tissue.»

EA 4308 'Gametogenesis and Gamete Quality', Rouen University Hospital, FRANCE. Direction: Dr. Rondanino.

First year: Option Physiology, Immunity, Cell Differentiation, Genetic with high honors, ranked 1st/11. University of Rouen.

2-month Internship: « Functional identification and bioinformatics predictions of splice mutations: the model of exon 3 of the *BRCA2* gene. ». INSERM U1079, Rouen, FRANCE. Direction: Dr. Gaildrat.

2011-14 Degree in Biology, Biochemistry, Earth and Environment

High honors, ranked 7th/164. University of Maine, Le Mans, FRANCE.

PROFESSIONAL EXPERIENCE

2019-20 Teaching assistant in physiology. 32h, Rouen university, FRANCE.

2018-19 Teaching assistant in physiology. 60h, Rouen university, FRANCE.

2018-19 Teaching assistant in physiology. 28h, Rouen university, FRANCE.

2017 Research Laboratory Technician. INSERM U1073 "Nutrition, Inflammation and dysfunction of the intestine-brain axis" Rouen, FRANCE.

COMPETENCE AREA

Cell and tissue biology: cell cultures (cell line and primary cell), organotypic cultures, histology, Immunohistochemistry, controlled slow freezing and vitrification of tissues,

Immunomagnetic negative selection from whole blood kit (EasySep™ Direct Human Monocyte Isolation Kit).

Animal experimentation: Mouse and rat manipulations, dissection (Level 1) and surgery.

Imaging: Microscopy (transmission, epifluorescence confocal) image analysis, flow cytometry.

Molecular Biology: RNA extraction, DNA extraction, cloning, sequencing, transfection, gene expression analysis by RT-PCR and RTqPCR, NChIP.

Software skills: Office software, GraphPadprism, FlowJo, Zen.

Languages: French (mother tongue), written and spoken English (intermediate).

PUBLICATIONS

Rondeaux J, Groussard D, Renet S, Tardif V, Dumesnil A, Chu A, Henry JP, Badji Z, Vézier C, Béziau D, Guerrot D, Brand M, Richard V, Durand E, Brakenhielm E, Fraineau S. Ezh2 as an epigenetic checkpoint regulator during monocyte differentiation: a potential target to improve cardiac repair after myocardial infarction. Under review at Nature Communications and bioRxiv. **2021** February. DOI: 10.1101/2021.02.17.428828.

Tubeuf H, Caputo S, Sullivan T, **Rondeaux J**, Krieger S, Caux-Moncoutier V, Fiévet A, Hauchard J, Castelain G, Meulemans L, Révillion F, Léone M, Boutry-Kryza N, Delnatte C, Guillaud-Bataille M, Cleveland L, Reid S, Southon E, Soukarieh O, Drouet A, Di Giacomo D, Vezain M, Bonnet-Dorion F, Bourdon V, Larbre H, Muller D, Pujol P, Vaz F, Audebert-Bellanger S, Colas C, Venat-Bouvet L, Solano A, Stoppa-Lyonnet D, Houdayer C, Frebourg T, Gaildrat P, Sharan S, Martins A. Calibration of pathogenicity due to variant-induced leaky splicing defects: the model of BRCA2 exon 3. *Cancer Research*. **2020** July. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-20-0895.

Houssari M, Dumesnil A, Tardif V, Kivela R, Pizzinat N, Boukhalfa I, Godefroy D, Schapman D, Hemanthakumar KA, Bizou M, Henry JP, Renet S, Riou G, **Rondeaux J**, Anouar Y, Adriouch S, Fraineau S, Alitalo K, Richard V, Mulder P, Brakenhielm E. Lymphatic and immune cell cross-talk regulates cardiac recovery after experimental myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **2020** May. DOI: 10.1161/atvbaha.120.314370.

Galmiche M*, Lucas N, Déchelotte P, Deroissart C, Le Sollic MA, **Rondeaux J**, Azhar S, Grigioni S, Colange G, Delay J, Achamrah N, Folope V, Belmonte L, Lamarre A, Rimbart A, Saillard T, Petit A, Quillard M, Coeffier M, Gillibert A, Lambert G, Legrand R, Tavolacci MP. Plasma peptides concentrations and peptide-reactive immunoglobulins in patients with eating disorders at inclusion in the French EDILS cohort (Eating disorders Inventory and Longitudinal Survey). *Nutrients* **2020**. DOI: 10.1371/journal.pone.0122040.

Kramer JS, Woltersdorf S, Duflot T, Hiesinger K, Lillich FF, Knöll F, Wittmann SK, Klingler FM, Brunst S, Chaikuad A, Morisseau C, Hammock BD, Buccellati C, Sala A, Rovati GE, Leuillier M, Fraineau S, **Rondeaux J**, Hernandez-Olmos V, Heering J, Merk D, Pogoryelov D, Steinhilber D, Knapp S, Bellien J, Proschak E. Discovery of the First in Vivo Active Inhibitors of the Soluble Epoxide Hydrolase Phosphatase Domain. *J Med Chem*. **2019** Sep 26;62(18):8443-8460. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b00445.

Oblette A*, **Rondeaux J***, Dumont L, Delessard M, Saulnier J, Rives A, Rives N, Rondanino C. DNA methylation and histone post-translational modifications in the mouse germline following in-vitro maturation of fresh or cryopreserved prepubertal testicular tissue. *Reprod Biomed Online*. **2019** Sep. DOI: 10.1016/j.rbmo.2019.05.007 (* equal contribution).

ORAL AND POSTER COMMUNICATIONS

Rondeaux J, Renet S, Dumesnil A, Henry JP, Durand E, Richard V, Brakenhielm E, Fraineau S. Ezh2 as an epigenetic checkpoint during monocyte differentiation: a potential target for cardiac recovery after myocardial infarction.

The 21st International Vascular Biology Meeting, Hybrid meeting, 2020, (Poster)

Printemps de la cardiologie 15th edition, e-congress 2020. (Oral and Poster)

4th FHU REMOD-VHF Scientific Day, Rouen 2020. (Poster)

4th Normandy Biomedical Research Day, Caen 2019. (Oral)

European Society of Cardiology congress, Paris 2019.

Epigenetic Regulation of Cardiovascular Disease Gordon Research Conference, Hong Kong 2019. (Poster)

French Society of Pharmacology and Therapeutics congress, Lyon 2019. (Poster)

Printemps de la cardiologie 14th edition, Lille 2019. (Oral and Poster)

3rd FHU REMOD-VHF Scientific Day, Rouen 2019. (Oral and Poster)

3rd Normandy Biomedical Research Day, Rouen 2018. (Oral)

Rondeaux J, Oblette A, Sétif V, Bironneau A, Troche S, Rondanino C, Rives N. Étude des modifications post-traductionnelles des histones dans les cellules de la lignée germinale murine après maturation in vitro de tissu testiculaire pré- pubère frais ou décongelé.

1st Normandy Biomedical Research Day, Rouen 2016. (Poster)

AWARDS AND ACHIEVEMENTS

Normandy university travel grant: For International Vascular Biology Meeting (Seoul, September 2020).

Printemps de la cardiologie 14th edition, Lille 2019: Poster presentation award (free inscription for European Society of Cardiology Congress in Paris).

3rd FHU REMOD-VHF Scientific Day, Rouen 2019: Oral presentation award.

FHU travel grant: 2000 euros For Epigenetic Regulation of Cardiovascular Disease Gordon Research Conference, (Hong Kong 2019).

INVOLVEMENT IN THE SCIENTIFIC COMMUNITY

Scientific mediation for schoolchildren, high school students and adults.

Member of the organizing committee of the PhD student of EDnBISE (PhD student school) congress.

Elected representative of doctoral students within Normandy University.

Annexe 2 : Articles de collaboration

Cette annexe présente des articles correspondant à des expérimentations réalisées au cours de mon cursus avant mon projet de thèse.

Tubeuf H, Caputo S, Sullivan T, **Rondeaux J**, Krieger S, Caux-Moncoutier V, Fiévet A, Hauchard J, Castelain G, Meulemans L, Révillion F, Léone M, Boutry-Kryza N, Delnatte C, Guillaud-Bataille M, Cleveland L, Reid S, Southon E, Soukarieh O, Drouet A, Di Giacomo D, Vezain M, Bonnet-Dorion F, Bourdon V, Larbre H, Muller D, Pujol P, Vaz F, Audebert-Bellanger S, Colas C, Venat-Bouvet L, Solano A, Stoppa-Lyonnet D, Houdayer C, Frebourg T, Gaildrat P, Sharan S, Martins A. Calibration of pathogenicity due to variant-induced leaky splicing defects: the model of BRCA2 exon 3. *Cancer Research*. **2020** July. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-20-0895.

Galmiche M*, Lucas N, Déchelotte P, Deroissart C, Le Sollic MA, **Rondeaux J**, Azhar S, Grigioni S, Colange G, Delay J, Achamrah N, Folope V, Belmonte L, Lamarre A, Rimbert A, Saillard T, Petit A, Quillard M, Coeffier M, Gillibert A, Lambert G, Legrand R, Tavolacci MP. Plasma peptides concentrations and peptide-reactive immunoglobulins in patients with eating disorders at inclusion in the French EDILS cohort (Eating disorders Inventory and Longitudinal Survey). *Nutrients* **2020**. DOI: 10.1371/journal.pone.0122040.

Legrand R, Lucas N, Dominique M, Azhar S, Deroissart C, Le Sollic MA, **Rondeaux J**, Nobis S, Guérin C, Léon F, do Rego JC, Pons N, Le Chatelier E, Ehrlich SD, Lambert G, Déchelotte P, Fetissov SO. Commensal *Hafnia alvei* strain reduces food intake and fat mass in obese mice—a new potential probiotic for appetite and body weight management. *Int J Obes (Lond)*. **2020** May;44(5):1041-1051. doi: 10.1038/s41366-019-0515-9.

Oblette A*, **Rondeaux J***, Dumont L, Delessard M, Saulnier J, Rives A, Rives N, Rondanino C. DNA methylation and histone post-translational modifications in the mouse germline following in-vitro maturation of fresh or cryopreserved prepubertal testicular tissue. *Reprod Biomed Online*. **2019** Sep. DOI: 10.1016/j.rbmo.2019.05.007 (* equal contribution).

Cet article démontre l'implication de deux types de modifications épigénétiques, la méthylation de l'ADN et les modifications des histones, lors de différentes techniques de différenciation *in vitro* des cellules de la lignée germinales murine après culture de tissus testiculaires. J'ai réalisé et analysé tous les résultats en liens avec les modifications des histones. Ce travail correspond à mes travaux de recherche effectués dans le cadre de mon stage de Master 2.

Calibration of Pathogenicity Due to Variant-Induced Leaky Splicing Defects by Using *BRCA2* Exon 3 as a Model System



Hélène Tubeuf^{1,2}, Sandrine M. Caputo^{3,4}, Teresa Sullivan⁵, Julie Rondeaux¹, Sophie Krieger^{1,6}, Virginie Caux-Moncoutier^{3,4}, Julie Hauchard¹, Gaia Castelain¹, Alice Fiévet^{3,7,8}, Laëticia Meulemans¹, Françoise Révillion⁹, Mélanie Léoné¹⁰, Nadia Boutry-Kryza¹⁰, Capucine Delnatte¹¹, Marine Guillaud-Bataille⁸, Linda Cleveland⁵, Susan Reid⁵, Eileen Southon⁵, Omar Soukarieh¹, Aurélie Drouet¹, Daniela Di Giacomo¹, Myriam Vezain¹, Françoise Bonnet-Dorion¹², Violaine Bourdon¹³, Hélène Larbre¹⁴, Danièle Muller¹⁵, Pascal Pujol¹⁶, Fátima Vaz¹⁷, Séverine Audebert-Bellanger¹⁸, Chrystelle Colas^{3,4}, Laurence Venat-Bouvet¹⁹, Angela R. Solano²⁰, Dominique Stoppa-Lyonnet^{3,7}, Claude Houdayer^{1,21}, Thierry Frebourg^{1,21}, Pascaline Gaildrat¹, Shyam K. Sharan⁵, and Alexandra Martins¹

ABSTRACT

BRCA2 is a clinically actionable gene implicated in breast and ovarian cancer predisposition that has become a high priority target for improving the classification of variants of unknown significance (VUS). Among all *BRCA2* VUS, those causing partial/leaky splicing defects are the most challenging to classify because the minimal level of full-length (FL) transcripts required for normal function remains to be established. Here, we explored *BRCA2* exon 3 (*BRCA2e3*) as a model for calibrating variant-induced spliceogenicity and estimating thresholds for *BRCA2* haploinsufficiency. *In silico* predictions, minigene splicing assays, patients' RNA analyses, a mouse embryonic stem cell (mESC) complementation assay and retrieval of patient-related information were combined to determine the minimal requirement of FL *BRCA2* transcripts. Of 100 *BRCA2e3* variants tested in the minigene assay, 64 were found to be spliceogenic, causing mild to severe RNA defects. Splicing defects were also confirmed in patients' RNA when available. Analysis of a neutral

leaky variant (c.231T>G) showed that a reduction of approximately 60% of FL *BRCA2* transcripts from a mutant allele does not cause any increase in cancer risk. Moreover, data obtained from mESCs suggest that variants causing a decline in FL *BRCA2* with approximately 30% of wild-type are not pathogenic, given that mESCs are fully viable and resistant to DNA-damaging agents in those conditions. In contrast, mESCs producing lower relative amounts of FL *BRCA2* exhibited either null or hypomorphic phenotypes. Overall, our findings are likely to have broader implications on the interpretation of *BRCA2* variants affecting the splicing pattern of other essential exons.

Significance: These findings demonstrate that *BRCA2* tumor suppressor function tolerates substantial reduction in full-length transcripts, helping to determine the pathogenicity of *BRCA2* leaky splicing variants, some of which may not increase cancer risk.

Introduction

Since the identification of *BRCA1* (MIM #113705) and *BRCA2* (MIM #600185) as major hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) genes, mutation screening has led to the discovery of 20,000 unique germline *BRCA1* and *BRCA2* variants (1). In female carriers of pathogenic *BRCA1* and *BRCA2* variants, the cumulative risk

by 80 years of age of developing breast cancer was estimated at 72% and 69% and that of developing ovarian cancer at 44% and 17%, respectively (2). Heterozygous *BRCA2* mutations also confer moderate risk to pancreatic and prostate cancers (3). Moreover, biallelic *BRCA2* mutations are causative of Fanconi anemia (FA) where one allele is often hypomorphic (4). Today, one of the most important bottlenecks in HBOC diagnosis is the high fraction of variants of unknown

¹Inserm U1245, UNIROUEN, Normandie University, Normandy Centre for Genomic and Personalized Medicine, Rouen, France. ²Interactive Biosoftware, Rouen, France. ³Department of Genetics, Institut Curie, Paris, France. ⁴PSL Research University, Paris, France. ⁵Mouse Cancer Genetics Program, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, Frederick, Maryland. ⁶Laboratory of Cancer Biology and Genetics, Centre François Baclesse, Caen, France - Normandie University, UNICAEN, Caen, France. ⁷INSERM U830, University Paris Descartes, Paris, France. ⁸Service Génétique des Tumeurs, Gustave Roussy, Villejuif, France. ⁹Unit of Human Molecular Oncology, Centre Oscar Lambret, Lille, France. ¹⁰Hospices Civils de Lyon, Bron, France. ¹¹Department of Genetics, Nantes University Hospital, Nantes, France. ¹²Inserm U1218, Department of Genetics, Institut Bergonié, Bordeaux, France. ¹³Department of Genetics, Institut Paoli-Calmettes, Marseille, France. ¹⁴Laboratoire d'Oncogénétique Moléculaire, Institut Godinot, Reims, France. ¹⁵Unité d'Oncogénétique, Centre Paul Strauss, Strasbourg, France. ¹⁶Unité d'Oncogénétique, CHU Arnaud de Villeneuve, Montpellier, France. ¹⁷Breast Cancer Risk Evaluation Clinic, Portuguese Institute of Oncology of Lisbon, Lisbon, Portugal. ¹⁸Département de Génétique et Biologie

de la Reproduction, CHU Morvan, Brest, France. ¹⁹Service Oncologie, CHU Dupuytren, Limoges, France. ²⁰Genotipificación y Cáncer Hereditario, Departamento de Análisis Clínicos, Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas (CEMIC), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. ²¹Department of Genetics, University Hospital, Normandy Centre for Genomic and Personalized Medicine, Rouen, France.

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

Corresponding Author: Alexandra Martins, Inserm U1245, UFR de Médecine et Pharmacie, 22 Bvd Gambetta, CS 76183, 76183 Rouen Cedex 1, France. Phone: 33-2-35-14-83-14; E-mail: alexandra.martins@univ-rouen.fr

Cancer Res 2020;80:3593-605

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-0895

©2020 American Association for Cancer Research.

Tubeuf et al.

significance (VUS) detected in the *BRCA* genes, estimated at approximately 50% of the detected variants (5–9). Carriers of VUS and their relatives cannot benefit from cancer-risk-reducing strategies, such as increased surveillance and prophylactic surgery, or from targeted therapies. VUS are generally typified by missense changes, but also include synonymous substitutions, small in-frame insertions and deletions as well as intronic variants, all of which can potentially affect pre-mRNA splicing (10). A significant number of *BRCA* VUS has been shown to induce RNA splicing defects (11). Splicing defects that lead to the exclusive production of aberrant transcripts carrying a premature termination codon (PTC) or of in-frame deletions disrupting known functional domain(s) (12) are regarded as pathogenic. In contrast, the biological consequences of variants that lead to partial/leaky splicing defects [i.e., that still produce a certain level of full-length (FL) reference transcripts] remain unknown. In this respect, variants affecting the in-frame alternatively spliced *BRCA2* exon 3 (*BRCA2e3*) are particularly challenging to interpret.

BRCA2e3 encodes an essential bipartite region comprised of (i) a transactivation core that interacts with EMSY, and (ii) a PALB2-interaction domain that allows the recruitment of *BRCA2* to the site of double strand breaks (DSB) to mediate homologous recombination (HR; Supplementary Fig. S1A; refs. 13, 14). Recently, it was demonstrated that variants that trigger total skipping of *BRCA2e3* (leading to a 249-nucleotide in-frame deletion, $\Delta 3$; Supplementary Fig. S1B), such as c.316+5G>C, confer high-risk of developing *BRCA2*-associated cancers (12). In contrast, the biological impact of variants causing partial *BRCA2e3* skipping remains unknown and their contribution to *BRCA2* haploinsufficiency and pathogenicity is not yet established. Indeed, the minimal level of full-length transcripts that can provide sufficient *BRCA2* function is still unknown. A low proportion of naturally occurring alternatively spliced transcripts lacking *BRCA2e3* ($\Delta 3 \sim 1\%–3\%$) has been detected in normal tissues, including blood, mammary glands, and prostate tissues (15–18). Furthermore, despite causing increased levels of $\Delta 3$ transcripts (estimated at $\sim 20\%$ in blood-derived samples), c.68-7T>A was recently found to be a nonpathogenic variant as it was not associated with increased risk of breast cancer (posterior probability of 7.44×10^{-115} ; ref. 19). Here, we hypothesized that *BRCA2e3* variants with partial effects on splicing, though stronger than c.68-7T>A, would confer minimal to severe reduction in *BRCA2* function, depending on the severity of exon 3 skipping. These variants could thus be associated with varying degrees of cancer susceptibility.

We therefore investigated the impact of 100 variants on *BRCA2e3* splicing by utilizing both *in silico* tools and functional assays. The biological consequences of seven noncoding variants (intronic or synonymous) that cause gradual increase of *BRCA2e3* skipping were then assessed in a mouse embryonic stem cell (mESC)-based complementation assay. In addition, we collected patient-related data for these variants. We conclude that *BRCA2* tumor suppressor activity may tolerate substantial reduction in the level of full-length transcripts, a finding that could contribute to improve *BRCA* variant classification guidelines.

Materials and Methods

Variant selection

To calibrate the potential spliceogenicity of *BRCA2e3* variants, we started by focusing on 74 translationally silent/noncoding variants (intronic or synonymous), most of which were bioinformatically predicted to induce *BRCA2e3* splicing defects (Supplementary Fig. S2; Supplementary Table S1). These included 61 noncoding variants that were expected to affect *BRCA2e3* splicing by either

weakening the strength of 3' and 5' splice sites (3'ss and 5'ss; $n = 21$, Supplementary Fig. S3A and S3B) or by disrupting putative splicing regulatory elements (SRE; $n = 40$, Supplementary Fig. S4). Bioinformatics predictions of variant-induced alterations of 3'ss and 5'ss strength were performed with MaxEntScan (MES) and SpliceSiteFinder-like (SSFL), interrogated by using either Alamut Batch v1.9 or Alamut Visual v2.11 integrated software tools (Interactive Biosoftware, <http://www.interactive-biosoftware.com>), as well as SPiCE (RRID: SCR_016603, <https://sourceforge.net/projects/spicev2-1/>) (20). Predictions of variant-induced SRE alterations were obtained with four SRE-predictors, namely: QUEPASA (21, 22) and HEXplorer (23), for which the Δ ESRseq and Δ HZEI scores, respectively, were calculated with the Alamut Batch prototype tool version 1.5.2 (ESRseq; <http://www.interactive-biosoftware.com>) as well as SPANR (24) and HAL (25), for which Δ Ψ scores were retrieved from the corresponding online interfaces (<http://tools.genes.toronto.edu> and <http://splicing.cs.washington.edu/SE>, respectively). Variants were selected based on the “at least three” rule, that is, we considered that the most probable spliceogenic variants were those predicted as such by at least three SRE predictors according to thresholds described in ref. 26 and shown in Supplementary Fig. S4. In addition and without prior knowledge of splicing predictions, we also integrated 13 noncoding *BRCA2* variants classified as VUS (or with discordant classifications in different databases), which had been detected in probands undergoing genetic testing in diagnostic laboratories from the French GGC-Uncancer network (Supplementary Fig. S2; Supplementary Table S1; Supplementary Note).

After the initial calibration experiments with the 74 noncoding variants, we also performed functional analyses with a set of missense variants ($n = 24$) identified in probands undergoing genetic counseling. Two pathogenic variants, c.92G>A (p.Trp31*) and c.145G>T (p.Glu49*), which were previously described as spliceogenic in minigene splicing assays (27, 28), were also retained as controls. Therefore, altogether, our collection included a total of 100 *BRCA2e3* variants.

Minigene splicing assays

To evaluate the impact on splicing of the 100 *BRCA2e3* variants, we performed functional assays based on the comparative analysis of the splicing pattern of wild-type (WT) and mutant reporter minigenes. Minigenes were prepared by using the pCAS2 vector backbone as described previously (26, 29) and explained in Supplementary Materials and Methods.

Analysis of the *BRCA2* exon 3 splicing pattern in RNA samples from patients and control individuals

RNA samples from EBV-immortalized lymphoblastoid cell lines (LCL) or PAXgene-stabilized blood of healthy donors and patients were collected in collaboration with the GGC-Uncancer consortium (Supplementary Note). The splicing patterns of *BRCA2* transcripts expressed in LCL or PAXgene samples were analyzed by semiquantitative fluorescent RT-PCR (26 and 40 cycles, respectively), as further described in Supplementary Materials and Methods, with primers mapping to *BRCA2* exons 2 and 5 (Supplementary Table S2).

Allele-specific expression analysis

Allele-specific expression (ASE) of *BRCA2e3*-containing transcripts (FL) was measured by performing a quantitative primer extension assay (SNaPshot MultiplexKit, Applied Biosystems), as described previously (29), using specific primers targeting the variants of interest (Supplementary Table S2) and semiquantitative RT-PCR conditions further detailed in Supplementary Materials and Methods.

mESC-based complementation assay

To assess the functional impact of *BRCA2e3* variants, we took advantage of a mESC-based assay (30, 31). Mouse ESC-expressing the human *BRCA2* gene (*hBRCA2*) carrying specific variants were generated as described previously (30, 31) with a few modifications as detailed in Supplementary Materials and Methods. After Cre-mediated deletion of the conditional mouse *Brca2* allele (*mBrca2*), we assessed cell survival and sensitivity to DNA-damaging agents, as described previously (30, 31). The splicing patterns of *BRCA2e3* were analysed by semiquantitative fluorescent RT-PCR (24 cycles), as described for patient RNA.

Patient and family data

Genetic, clinical, familial, and tumoral data for patients carrying *BRCA2e3* variants were collected in collaboration with the French GGC network and within the framework of the COsegregation of VARIants in the *BRCA1/2* and *PALB2* genes clinical trial (COVAR, Supplementary Note). The criteria for diagnostic variant screening of the *BRCA2* gene were applied according to the current French GGC recommendations and the French National Cancer Institute (INCa) guidelines. Informed written consent was obtained from all patients.

Consortia

Members of the French GGC network and of the COVAR (COsegregation of VARIants in the *BRCA1/2* and *PALB2* genes) group are listed in the Supplementary Note.

Results

Identification of variants affecting *BRCA2e3* splicing by using a minigene splicing assay

To get a glimpse of *BRCA2e3* vulnerability to predicted splicing mutations and to calibrate the spliceogenicity of this exon, we started by evaluating the impact on splicing of 74 noncoding variants by performing a minigene assay (Fig. 1A). These variants, which map either to exon 3 or its flanking intronic regions, included 61 noncoding variants bioinformatically predicted to induce exon skipping (19 intronic, 2 synonymous but overlapping exon–intron junctions and 40 exonic synonymous variants; 26/61 being naturally occurring variants described in Human variation databases). We included 13 additional noncoding variants that were selected because they were either classified as VUS in BRCA-Share or had conflicting interpretations in other databases (4 intronic and 9 exonic synonymous; Supplementary Figs. S2–S4; Supplementary Table S1).

The minigene splicing assay, which was based on pCAS2-*BRCA2e3*-derived constructs (Supplementary Fig. S5), revealed that 52 out of the 74 variants (70%) altered the splicing pattern of *BRCA2e3*, whereas 22 of 74 remaining variants (30%) showed no major effect on splicing (Fig. 1B; Supplementary Table S1). More precisely, 51 variants induced *BRCA2e3* skipping to different extents (6%–100% $\Delta 3$, i.e., 94%–0% FL) and 1 variant (c.68-1G>A) resulted in complete deletion of six nucleotides at the beginning of the exon, due to the creation of a new 3' splice site (Supplementary Fig. S6). Because it causes a small in-frame deletion, the latter should now be considered a VUS instead of a likely pathogenic variant as currently indicated in ClinVar. We found that *in silico* analyses were generally useful for predicting variant-induced splicing alterations, but that not all predictions were correct (Supplementary Tables S1, S3–S5; Supplementary Figs. S7A, S7B, S8A–S8E and S9A–S9E). For instance, the naturally occurring c.231T>G

synonymous VUS caused 31% $\Delta 3$ (69% FL), which is concordant with a previous experimental study (32), but disagrees with the SRE predictions (Supplementary Table S1). In sum, these data suggest that the regulation of *BRCA2e3* splicing is very plastic and allowed us to initiate a calibration of the variant-induced spliceogenicity of this exon. Indeed, we observed a spectrum of splicing alterations varying from mild (corresponding to a level of exon inclusion lower than WT, i.e., <99%, but $\geq 92\%$, a threshold defined by the effect of the neutral c.68-7T>A variant) to drastic (exon inclusion $\leq 5\%$, defined by the impact of the pathogenic c.316+5G>C variant; Fig. 1B). On the basis of this comparative analysis, we infer that the noncoding variants in our dataset that show levels of exon inclusion in the minigene assay equal or superior to c.68-7T>A are neutral, whereas those that lead to exon inclusion levels equal or inferior to c.316+5G>C are pathogenic. Seven VUS causing intermediate levels of exon inclusion (92%>FL>5%) were retained for further analysis because they illustrate the continuum of variant-induced FL transcript loss observed in the minigene assay and could eventually help in defining a $\Delta 3$ threshold for pathogenicity (c.165C>T, c.231T>G, c.68-8_68-7delinsAA, c.102A>G, c.316+6T>C, c.316+6T>A and c.316+6T>G, in increasing order of severity; Fig. 1C).

Confirmation of variant-induced spliceogenicity in RNA samples from patients with HBOC

To assess the physiologic relevance of the splicing defects revealed by the minigene assay, we analyzed the splicing pattern of *BRCA2e3* in human-derived samples, either LCL or PAXgene-stabilized blood, obtained from control individuals and from four patients carrying *BRCA2e3* variants (c.231T>G, c.68-8_68-7delinsAA, c.102A>G, and c.316+6T>C). No biological samples were available for carriers of c.165C>T, c.316+6T>A, and c.316+6T>G. Besides LCL and PAXgene samples from healthy individuals, two additional controls were used in this experiment: (i) a LCL from a patient harboring an unequivocal pathogenic Alu insertion in the middle of exon 3 (c.156_157insAlu) known to cause total exon skipping (33) and LCLs from four carriers of the neutral variant c.68-7T>A, known to lead to mild exon skipping (19). The biallelic splicing patterns of *BRCA2e3* in patient biological samples were analyzed by semiquantitative RT-PCR, a common approach used in clinical settings (34), and compared with those generated from equivalent RNA samples of control individuals (Fig. 2A and B; Supplementary Table S1). In LCL and PAXgene samples from healthy controls, we detected the natural alternative splicing pattern of *BRCA2e3* with approximately 10% $\Delta 3$, whereas carriers of c.68-7T>A displayed approximately 25% $\Delta 3$. These splicing patterns are comparable with previous reports of approximately 3% $\Delta 3$ in LCL control samples and approximately 13% $\Delta 3$ in carriers of c.68-7T>A as determined by qRT-PCR (19). Importantly, heterozygous carriers of c.231T>G, c.68-8_68-7delinsAA, c.102A>G, and c.316+6T>C showed a decrease in the relative amount of FL transcripts due to an increase in $\Delta 3$ (75%–38% FL; i.e., 25%–62% $\Delta 3$). These relative levels of $\Delta 3$ were lower than that observed for c.156_157insAlu (FL = 30%, i.e., $\Delta 3$ = 70%), suggesting that these four variants are leaky not only in the minigene assay but also in patients' cells. Nevertheless, assuming a balanced biallelic expression of *BRCA2* and taking into account that WT alleles seem to contribute to approximately 10% $\Delta 3$, it was expected that the LCL carrying the heterozygous c.156_157insAlu variant would display approximately 55% $\Delta 3$, instead of 70% as detected. It is thus possible that our RT-PCR conditions slightly overestimate the level of $\Delta 3$ possibly due to a PCR bias favoring the amplification of the smaller $\Delta 3$ RT-PCR products

Tubeuf et al.

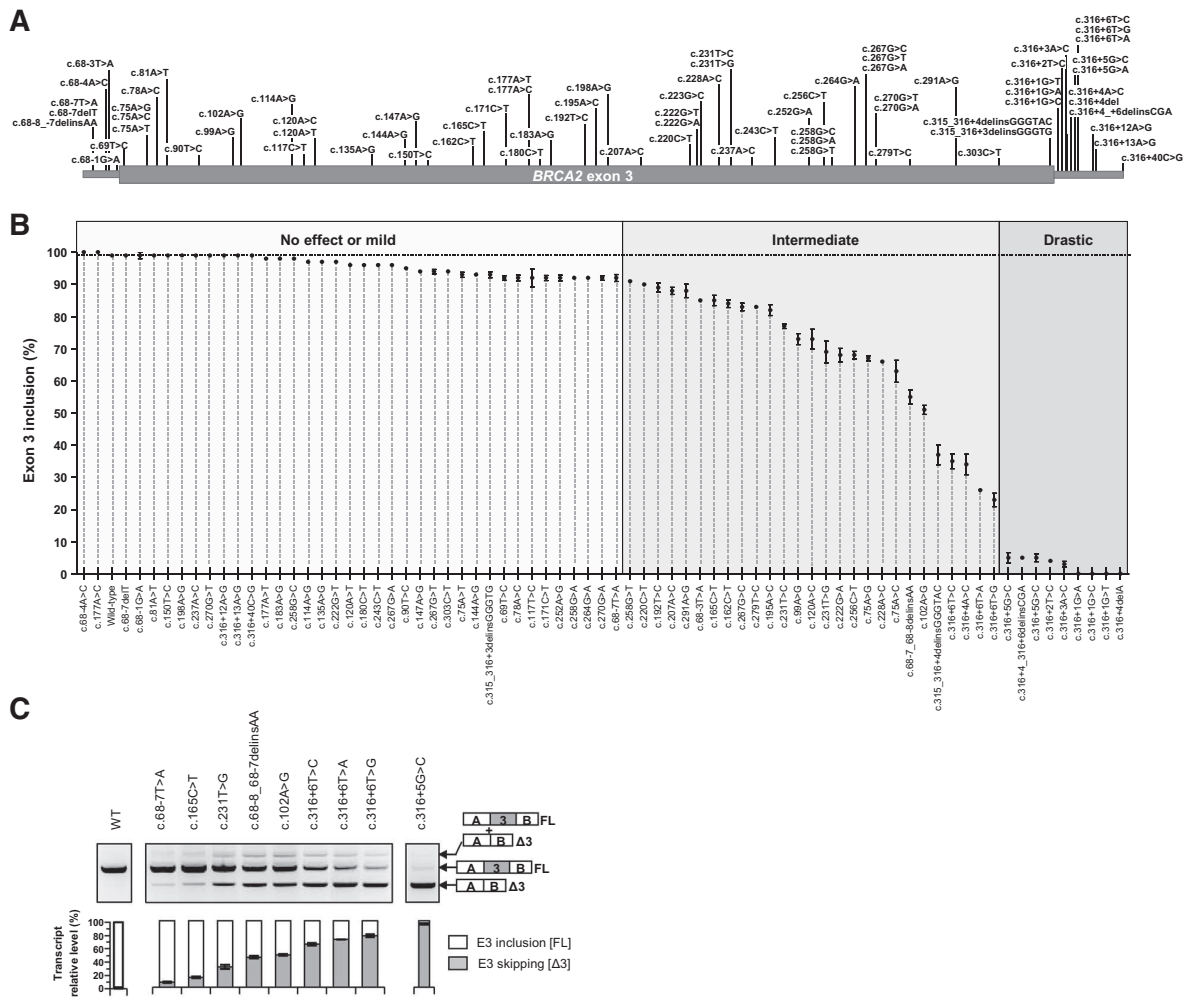


Figure 1. Identification of *BRCA2* exon 3 spliceogenic variants among translationally silent genetic alterations by using a minigene splicing assay. **A**, Distribution of the 74 variants reported within or in the vicinity of *BRCA2* exon 3. The diagram shows the relative position and identity of each variant within *BRCA2*e3 and flanking intronic regions. **B**, Impact on splicing of noncoding *BRCA2* exon 3 variants. WT and mutant pCAS2-*BRCA2*-e3 minigene constructs were transiently expressed in HeLa cells. The splicing patterns of the RNA produced from the different minigenes were then analyzed by semiquantitative fluorescent RT-PCR, followed by capillary electrophoresis. Results represent the mean of relative exon 3 inclusion (% FL) of three independent transfection experiments. Error bars, SEM values. **C**, Splicing pattern of pCAS2-*BRCA2*e3 minigenes carrying selected variants that cause gradual increase in *BRCA2*e3 skipping. Top, the RT-PCR products separated on an agarose gel. Bottom, the relative quantification of the fluorescent RT-PCR products separated by capillary electrophoresis. Results represent the mean of three independent transfection experiments. Error bars, SEM values. The identities of the two RT-PCR products obtained, with (FL) or without ($\Delta 3$) exon 3, are indicated on the right. FL+ $\Delta 3$ correspond to heteroduplexes containing the two products. E3, exon 3.

relative to FL. A similar impact on exon 3 splicing was observed by Colombo and colleagues but the effect was more exacerbated probably due to a higher number of PCR amplification cycles (19). Sequencing of the FL RT-PCR products of patients carrying the heterozygous c.231T>G variant showed the presence of both WT and mutant FL transcripts, with mutant FL transcripts appearing to be under-represented as compared with WT, further suggesting that this variation cause partial splicing defects (Supplementary Fig. S10). These results obtained from patient-derived RNA samples are in agreement with the minigene data. Indeed, we observed a good correlation ($R^2 = 0.9601$, Supplementary Fig. S11A) between the levels of

*BRCA2*e3 skipping evaluated in the monoallelic minigene-based assay and those assessed in RNA samples derived from patients carrying the same variants at the heterozygous state. Moreover, to better evaluate the contribution of WT and mutant alleles to the production of FL transcripts, we took advantage of the quantitative nature of ASE, i.e., the relative contribution of each allele to the production of RT-PCR products containing *BRCA2*e3 (Fig. 2C). ASE analysis indicated that FL transcripts expressed from the mutant alleles were in fact present in cells of a patient carrying c.102A>G (53% of WT) and c.231T>G (56%, 62%, 65% or 108% of WT, depending on the

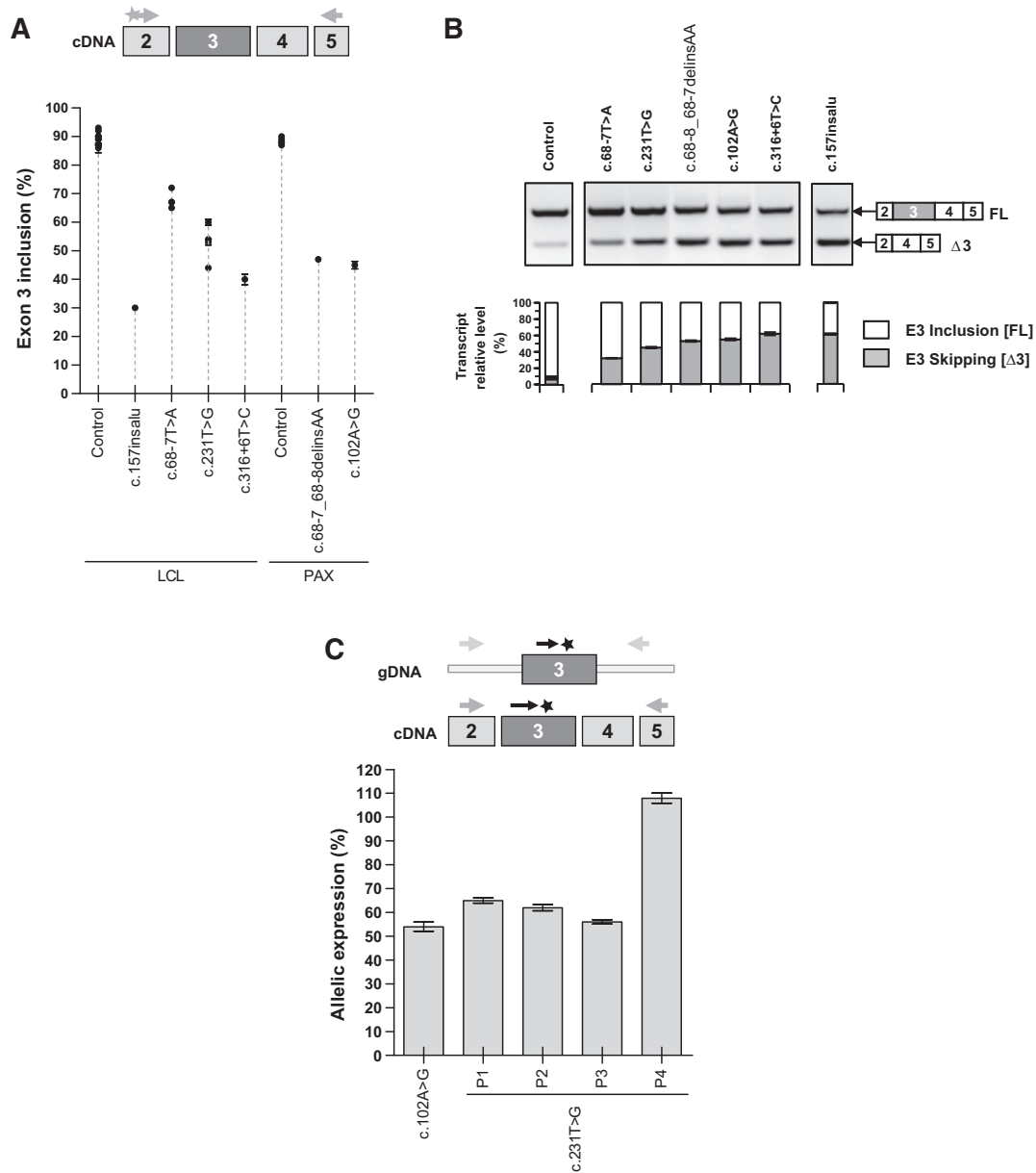


Figure 2.

BRCA2 exon 3 splicing patterns and allele-specific expression in patients carrying translationally silent variants. **A**, Alterations in the relative level of exon 3 inclusion caused by *BRCA2*e3 variants. The *BRCA2*e3 splicing patterns in patient-derived RNA samples were monitored by semiquantitative fluorescent RT-PCR by using forward and reverse primers located in exons 2 and 5, respectively, followed by capillary electrophoresis and compared with those from healthy donors (controls). The relative levels of exon inclusion (bottom) refer to the amount of full-length transcripts (FL; containing exon 3) relative to the total amount of transcripts (with and without exon 3) and are representative of three independent experiments. Error bars, SEM. **B**, Splicing pattern of *BRCA2*e3 variants shown in increasing order of spliceogenicity. Top, RT-PCR products separated on an agarose gel. Bottom, the relative quantification of the same products separated by capillary electrophoresis as described in **A**. Results represent the mean of three independent experiments and they all concern LCL RNA except for c.68-8_68-7delinsAA and c.102A>G that refer to PAXgene samples. Error bars, SEM values. The identities of the two RT-PCR products obtained, with (FL) or without (Δ3) exon 3, are indicated on the right. E3, exon 3. **C**, Allele-specific expression of transcripts including *BRCA2* exon 3 assessed by SNaPshot analysis. Genomic segment (gDNA) and complementary DNA (cDNA) containing *BRCA2*e3 were amplified in parallel using specific primers (gray arrows) and the SNaPshot quantitative primer extension assay was then performed with a variant-specific primer (black arrow) targeting the sequence immediately upstream the *BRCA2*e3 variant. Allele-specific expression, representing the relative contribution of the variant allele to the expression of full-length *BRCA2* transcripts as compared with WT (% of WT), was measured by normalization of the cDNA peak area ratio (variant/WT) to the corresponding gDNA peak area ratio (variant/WT). Results are representative of three independent experiments. Error bars, SEM values. P, patient.

Tubeuf et al.

patient). On the basis of the results of our minigene assays and RT-PCR analysis of patient RNA, we concluded that the observed allelic imbalances in FL transcripts are essentially due to variant-induced *BRCA2*e3 skipping and that the variants cause partial rather than total splicing defects. Surprisingly, we did not observe an allelic imbalance for one of the carriers of c.231T>G (108% of WT) despite an increase in Δ3 in patient biological material. Importantly, we found that this patient also harbors a pathogenic nonsense variation (*BRCA2* c.6515C>A, p.Ser2172*) *in trans* of c.231T>G. Most likely, the PTC introduced by the nonsense variation leads to nonsense-mediated decay of the transcripts expressed from this allele to a level similar to that of c.231T>G-induced exon skipping. Of note, we observed a correlation between the levels of *BRCA2*e3 skipping evaluated in the minigene assay and the ASE results obtained with equivalent patient-derived RNA samples ($R^2 = 0.9417$; Supplementary Fig. S11B). We surmise from these results that the minigene assay is a good surrogate system to evaluate the spliceogenicity of *BRCA2*e3 variants.

Functional characterization of *BRCA2*e3 spliceogenic variants in a mESC-based assay

In an attempt to uncover a RNA-related threshold for *BRCA2* haploinsufficiency, we evaluated the consequences of variant-induced *BRCA2*e3 skipping in *BRCA2* function by performing a mESC-based complementation assay (Fig. 3A; Supplementary Fig. S12). Here, we tested seven variants: four intronic (c.68-8_68-7delinsAA, c.316+6T>A, c.316+6T>C, and c.316+6T>G) and three synonymous (c.102A>G, c.165C>T and c.231T>G). These variants were selected on the basis of four main reasons. First, they caused a gradual increase in Δ3 in the minigene assay. Second, they are all translationally silent, which avoids any potential confounding effect produced by coding changes. Third, they are clinically interesting given that all except one (c.316+6T>A) were identified in patients suspected of HBOC. And fourth, their pathogenicity is unknown. We also included c.68-7T>A and c.316+5G>C as controls because these spliceogenic variants have been unequivocally classified as neutral and pathogenic, respectively (12, 19).

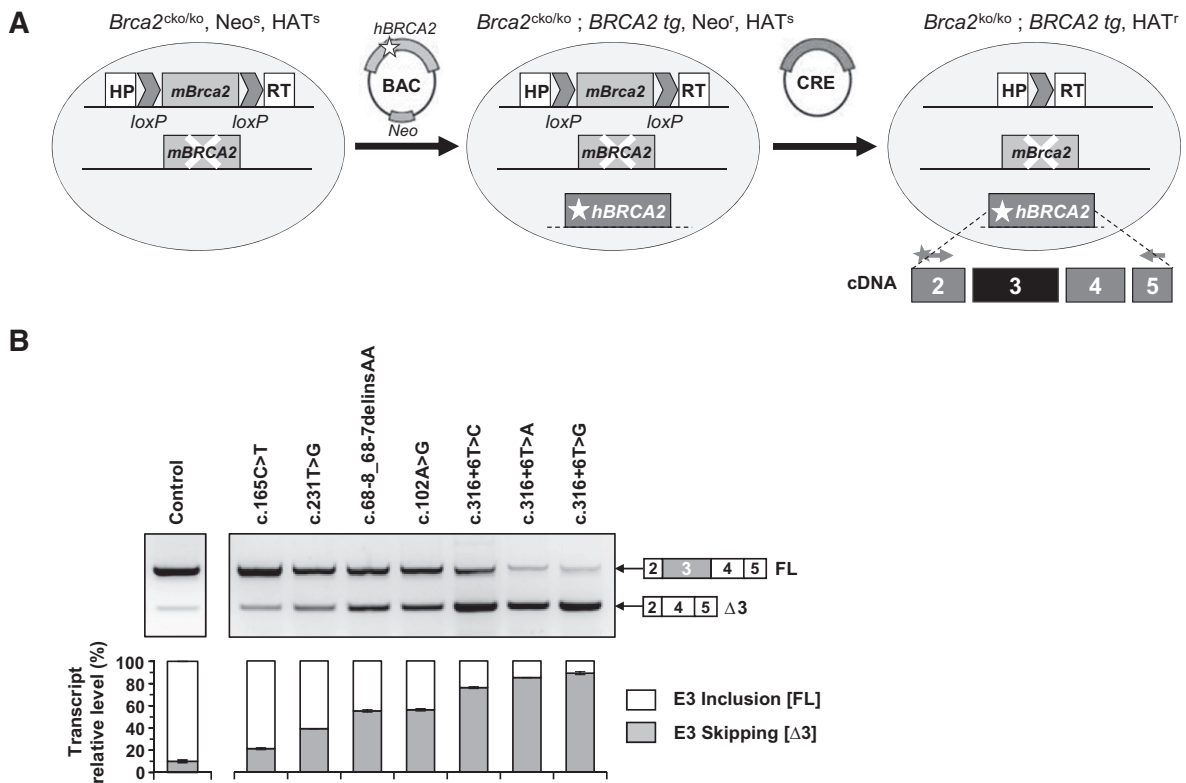


Figure 3. Functional analysis of *BRCA2* translational silent variants that cause gradual increase in exon 3 skipping by using a mouse embryonic stem cell (mESC)-based assay. **A**, Schematic representation of the mESC model used for the functional analysis of *BRCA2*e3 variants. PL2F7 mESCs with a conditional (*cko*) mouse *Brca2* allele (*mBrca2*) flanked with two *loxP* sites along with two halves (designated as HP and RT) of the human *HPRT1* minigene and a knockout (*ko*) of the second *mBrca2* allele were electroporated with BACs carrying human *BRCA2* (WT or variant *hBRCA2*). Resulting colonies were selected for further analysis after verification of *hBRCA2* expression by Western blot analysis (Supplementary Fig. S12). Then the conditional *mBrca2* allele was deleted by transient expression of Cre in the selected cells. Variants that could (fully or partially) complement *BRCA2* deficiency resulted in HAT-resistant clones (Supplementary Fig. S13). These viable clones were used for other functional studies including sensitivity to DNA-damaging agents (Supplementary Fig. S14). *BRCA2*e3 splicing patterns in HAT-resistant mESC were monitored by semiquantitative fluorescent RT-PCR by using forward and reverse primers located in exons 2 and 5, respectively, followed by capillary electrophoresis. Results from mESC complementation assays are summarized in Table 1. **B**, RT-PCR analysis of the splicing pattern of mESC expressing *hBRCA2* variants. Top, the RT-PCR products separated on an agarose gel. Bottom, relative quantification of equivalent fluorescent RT-PCR products separated by capillary electrophoresis. Results represent the mean of three independent experiments. Error bars, SEM values. The identities of the two RT-PCR products obtained, with (FL) or without (Δ3) exon 3, are indicated on the right. E3, exon 3; P, patient.

Table 1. Summary of functional effects of *BRCA2*e3 variants analyzed in a mESC-based assay.

Nucleotide	Amino acid	Complementation ^a	Sensitivity ^b	Splicing (FL%) ^c		Classification ^d
				Detected	% WT	
WT	-	Yes	No	90	100	-
c.68-7T>A	p.?	Yes	No	nd	nd	Neutral
c.165C>T	p.(Asn55=)	Yes	No	79	88	Neutral
c.231T>G	p.(Thr77=)	Yes	No	61	68	Neutral
c.68-8_68-7delinsAA	p.?	Yes	No	45	50	Neutral
c.102A>G	p.(Glu34=)	Yes	No	44	49	Neutral
c.316+6T>C	p.?	Yes	No	24	27	Neutral
c.316+6T>A	p.?	Poor	Yes	15	17	VUS (intermediate)
c.316+6T>G	p.?	Poor	Yes	11	12	VUS (intermediate)
c.316+5G>C	p.?	No	n/a	n/a	n/a	Pathogenic
c.316G>A	p.Gly106Arg	Poor	Yes	25	28	VUS (intermediate)

Abbreviations: n/a, not applicable; nd, not determined; p?, variant of unknown protein consequences (non-coding but it may affect RNA splicing) as per HGVS nomenclature.

^aComplementation phenotypes of *BRCA2*e3 variants based on viability of *Brca2*^{ko/ko} mESCs expressing either WT or mutant *BRCA2* after deletion of the conditional allele (see also **Fig. 3**; Supplementary Fig. S13).

^bSensitivity of HAT-resistant mESCs (expressing either WT or mutant *hBRCA2*) to six DNA-damaging agents (olaparib, methyl methanesulfonate, mitomycin C, cisplatin, camptothecin, and ionizing radiation). Survival was measured by XTT assay and then compared with that of mESCs expressing wild-type *hBRCA2* (see also Supplementary Fig. S14).

^cRelative quantification of splicing events in HAT-resistant mESCs expressing either WT or mutant *hBRCA2* was evaluated by semiquantitative fluorescent RT-PCR, followed by capillary electrophoresis. Results represent the mean of three independent experiments. Values relative to %WT were extrapolated from RT-PCR results displayed in the previous column (FL%) and assuming a similar *BRCA2* expression in the different mESCs clones.

^dSuggested nucleotide variant classification based on the results of the mESC complementation assay.

We first tested the ability of the variants to rescue the cell lethality conferred by loss of *BRCA2* after loxP/Cre-mediated deletion of the endogenous conditional *mBrca2* allele (**Fig. 3A**; **Table 1**; Supplementary Fig. S13). The two loxP sites of the conditional *mBrca2* are flanked by two halves of human *HPRT* minigene, which allow selection of recombinant clones in the presence of HAT. We observed that mESCs expressing the c.316+5G>C pathogenic variation were unable to form HAT-resistant colonies, indicating that *BRCA2* function was severely impaired, a result that is in agreement with the deleterious nature of this variant (12). In contrast and as expected, the neutral variation c.68-7T>A (19) was able to fully complement the loss of endogenous *mBrca2*. Interestingly, the complementation phenotype of five of the seven VUS, namely c.165C>T, c.231T>G, c.102A>G, c.68-8_68-7delinsAA and c.316+6T>C, resembled that of the neutral variant. However, in the case of c.316+6T>A and c.316+6T>G (variants that had the most severe splicing defects in the minigene assay among the seven VUS of interest), we observed fewer HAT-resistant colonies as compared with WT-expressing cells, indicating that *BRCA2* function was compromised in these cells, resulting in incomplete/poor complementation (Supplementary Fig. S13).

Because *BRCA2* has an important role in the repair of DSBs, loss of its function renders cells vulnerable to compounds that introduce toxic DNA lesions (35). Therefore, we next tested the sensitivity of the HAT-resistant mESC to six DNA-damaging agents (cisplatin, mitomycin C, methyl methanesulfonate, olaparib, camptothecin, and γ -irradiation) by cell survival measurements (**Table 1**; Supplementary Fig. S14). As expected, c.68-7T>A-expressing cells exhibited no difference in sensitivity to various DNA-damaging agents as compared with WT-expressing cells. Similarly, mESC carrying either c.165C>T, c.231T>G, c.102A>G, c.68-8_68-7delinsAA, or c.316+6T>C did not exhibit hypersensitivity to any of the DNA-damaging agents, strongly supporting that they are fully functional and are likely to be neutral variants. In contrast, c.316+6T>A and c.316+6T>G are associated with a severe hypersensitivity to various DNA-damaging agents as compared with WT or to c.68-7T>A-expressing cells, strongly indicating an impairment

in *BRCA2* function. We surmise that a reduction in FL transcripts down to 35% (as measured for the borderline c.316+6T>C variant in the minigene assay) is sufficient for *BRCA2* function, whereas a level equal to or lower than 26% FL (as measured for c.316+6T>A in the minigene assay) leads to *BRCA2* haploinsufficiency in mESCs. Moreover, a total loss-of-function was observed in mESCs when FL \leq 5% (as measured for c.316+5G>C in the minigene assay).

To validate the physiologic relevance of the mESC system for the evaluation of variant-induced *BRCA2*e3 splicing defects, we analyzed the splicing patterns of the different *BRCA2* variants in viable mESCs by semiquantitative RT-PCR. The WT *BRCA2* gene expressed in this system reproduced the alternative splicing of *BRCA2*e3 ($\Delta 3 = 10\%$, **Fig. 3B**) typically detected in normal human cells. Importantly, we confirmed that the five VUS that were fully functional in the mESC assay had increased levels of $\Delta 3$ representing a decrease in FL transcripts down to 27% of the WT *BRCA2* FL transcripts as extrapolated from the RT-PCR results. In contrast, c.316+6T>A and c.316+6T>G, which showed poor mESC-complementation, had even lower relative levels of FL transcripts (17% and 12%, respectively). These data suggests that the upper threshold for *BRCA2* haploinsufficiency in the mESCs lies between approximately 17% and approximately 27% FL and that for total loss-of-function the cutoff lies below 12% FL. The results of the mESC-derived RNA analysis were fully consistent with those obtained in the minigene assay not only in terms of whether or not a variant caused aberrant splicing but also in terms of the relative severity of the splicing defects ($R^2 = 0.9974$; Supplementary Fig. S15). Moreover, the results obtained in mESCs agree with those obtained with patient-derived samples, which highlights the physiologic pertinence of the mESC model to evaluate the consequences on splicing of *BRCA2*e3 variants. A biological classification of the selected variants based on the mESC complementation results is shown on **Table 1**.

Association of leaky *BRCA2* exon 3 variants with cancer risk

To gain insight into the clinical significance of leaky *BRCA2*e3 spliceogenic variants, we collected patient information for the seven

Tubeuf et al.

VUS analyzed in the mESC assay (Supplementary Table S6). Only one variant (c.231G>T) could be classified as neutral according to ACMG (36) and ENIGMA (37) guidelines given its: (i) high frequency in the African population (0.66%), (ii) the description of an homozygous individual in the general population; and (iii) the cooccurrence *in trans* with pathogenic *BRCA2* variants in HBOC patients without a FA phenotype. These data confirm that a decrease in FL transcripts from one *BRCA2* allele at least down to approximately 60% of WT (as determined for c.231G>T in the ASE analysis) is not associated with HBOC. Multifactorial likelihood analyses based on clinical, familial, and tumoral data from patients carrying four of the seven VUS (c.68-8_68-7delinsAA, c.102A>G, c.316G>A, and c.316+6T>C) were inconclusive, in part, because few families were accessible for analysis and no cosegregation information was available.

Functional impact of *BRCA2* missense VUS

Finally, we extended our minigene splicing analysis to 26 *BRCA2e3* coding variants (Fig. 4A) including all missense changes reported in the BRCA-Share database ($n = 23$), as well as one FA-associated missense variant (c.316G>A) and two previously described spliceogenic nonsense variants (c.92G>A and c.145G>T) (27, 28), the latter used as additional *BRCA2e3* spliceogenic controls. Of note, among the 24 missense variants, 21 were described as VUS (Supplementary Table S1). The minigene assay revealed that 12 out of the 26 variations tested (46%) altered the splicing pattern of *BRCA2e3* relative to WT (Fig. 4B; Supplementary Table S1). More precisely, 11 variants increased *BRCA2e3* skipping, including c.92G>A and c.145G>T as expected, and one variant (c.100G>A) caused two concomitant partial splicing defects, that is, skipping of *BRCA2e3* and a 45-nucleotide in-frame deletion at the beginning of the exon caused by the creation of a new 3' splice site (Supplementary Fig. S16). Given their positions within the exon, we suspect that c.316G>C and c.316G>A induce exon skipping by directly decreasing the strength of the 5' splice site (Supplementary Fig. S7), whereas the remaining spliceogenic missense variants likely modify exonic SREs. Importantly, we confirmed that four of the variants (c.92G>A, c.145G>T, c.316G>A, and c.316G>C) are associated with a major relative increase of $\Delta 3$ in patients' RNA as compared with healthy controls (Fig. 4C). Moreover, ASE analysis revealed a reduction in FL transcripts expressed from the mutant alleles in these biological samples (50%–24% of WT, Fig. 4C and D). In contrast, the 14 remaining variants showed no effect on splicing in the minigene assay (Fig. 4B), including c.223G>C, a variant that is associated, in patient RNA, with a splicing pattern similar to that observed in control samples (Fig. 4C) and to an absence of *in vivo* allelic imbalance (Fig. 4D), which is consistent with the minigene results.

Our findings reiterate the importance of the minigene assay in assessing the impact on splicing of *BRCA2e3* variants. Moreover, they pinpoint c.316G>A (p.Gly106Arg) as potentially leading to *BRCA2* haploinsufficiency because although the splicing efficiency of this variant (both in the minigene assay and in patient RNA) is similar to that of the borderline c.316+6T>C noncoding variant, the c.316G>A transition: (i) produces a Gly>Arg missense change at a highly conserved amino acid position (Supplementary Fig. S17) in the residual *BRCA2* FL transcripts, and (ii) has been identified *in trans* of *BRCA2* c.2806_2809del [p.(Ala938Profs*21), paternal allele] in a FA patient, which is suggestive of a disease-causing hypomorphic variant.

To test this hypothesis, we then determined the functional consequences of c.316G>A (p.Gly106Arg) in the mESC assay. As shown in Table 1, c.316G>A lead to a drastic reduction of the number of HAT-resistant mESC colonies and a severe hypersensitivity to various

DNA-damaging agents as compared with WT and to c.68-7T>A, strongly indicating an impairment of *BRCA2* function. Importantly, the complementation phenotype and degree of sensitivity to DNA-damaging agents were similar to those observed for c.316+6T>G and c.316+6T>A (Table 1; Supplementary Figs. S13 and S14) revealing that indeed c.316G>A (p.Gly106Arg) causes *BRCA2* haploinsufficiency but not total loss-of-function. Our results suggest that c.316G>A (Gly106Arg) is a hypomorphic allele that leads to *BRCA2* haploinsufficiency because of a negative impact both on *BRCA2e3* splicing and on FL protein function.

Discussion

Determining the pathogenicity of leaky *BRCA2* variants remains a major challenge in medical cancer genetics. To our knowledge, only one leaky *BRCA2* variant (c.68-7T>A) has been thoroughly assessed for its implication in HBOC (19). This variant has been classified as neutral by multifactorial analysis while all remaining *BRCA2* leaky variants linger as VUS until further evidence is collected (11, 19, 32). By using *BRCA2e3* as a model system and complementary functional assays, we provide the first calibration of *BRCA2e3* spliceogenicity and an estimation of *BRCA2* mRNA-based haploinsufficiency, both of which contribute to the interpretation of leaky *BRCA2* variants. In addition, our study identified a plethora of new spliceogenic *BRCA2e3* variants.

To date, only 17 SNVs in/near *BRCA2e3* (10 exonic and 7 intronic) have been reported as causing aberrant splicing, all shown to increase $\Delta 3$ (11, 12, 19, 27, 28, 32, 35, 38, 39). Our minigene results confirmed 15 of those initial findings (only 2 of the known spliceogenic variants being absent from our study) and uncovered 49 new splicing mutations (37 exonic, 10 intronic, and 2 at the exon–intron border) bringing the number of *BRCA2e3* spliceogenic variants to a total of 66, most affecting potential SREs. Importantly, the vast majority of the detected splicing defects were leaky (54 of 64 spliceogenic variants), 45 being less drastic than the splicing anomaly caused by c.316+5G>C, but stronger than that observed for the neutral variant c.68-7T>A, which implied that they remained as of unknown significance. These observations suggest that variant-induced leaky splicing defects are prevalent in *BRCA2e3* and that additional analyses are warranted for accurate assessment of their pathogenicity. Still, among the 49 newly identified spliceogenic variants, 4 caused major loss of *BRCA2e3* in the minigene assay similar to what was observed for c.316+5G>C. These variants (c.316+1G>A, c.316+1G>C, c.316+3A>C, and c.316+4_316+6delinsCGA) can thus be classified as pathogenic without further evidence (12). Moreover, we could also immediately classify 34 noncoding variants as neutral because they either had no impact on splicing in the minigene assay or induced a minor decrease in FL transcripts (equal or milder than c.68-7T>A).

To evaluate the biological significance of leaky splicing defects caused by *BRCA2e3* VUS, we next used a mESC-based assay known to reliably predict the pathogenicity of *BRCA2* variants (30, 31, 35, 40). We found that this assay recapitulates the normal alternative splicing of *BRCA2e3* as well as variant-induced partial splicing defects. Indeed, although *BRCA2* $\Delta 3$ levels were somewhat variable in our complementary approaches probably due to different genomic environments, tissue-specific alternative splicing patterns and/or other experimental specificities, we demonstrated a high concordance in splicing phenotypes between the mESC assay and both minigene and patient RNA analysis. Moreover, data on mESC viability and sensitivity to DNA-damaging agents were concordant with the clinical classifications of c.68-7T>A and c.316+5G>C. By testing selected spliceogenic *BRCA2e3* VUS in the mESC assay, we were able to redefine cut-off

Leaky Exon 3 Variants and *BRCA2* Haploinsufficiency

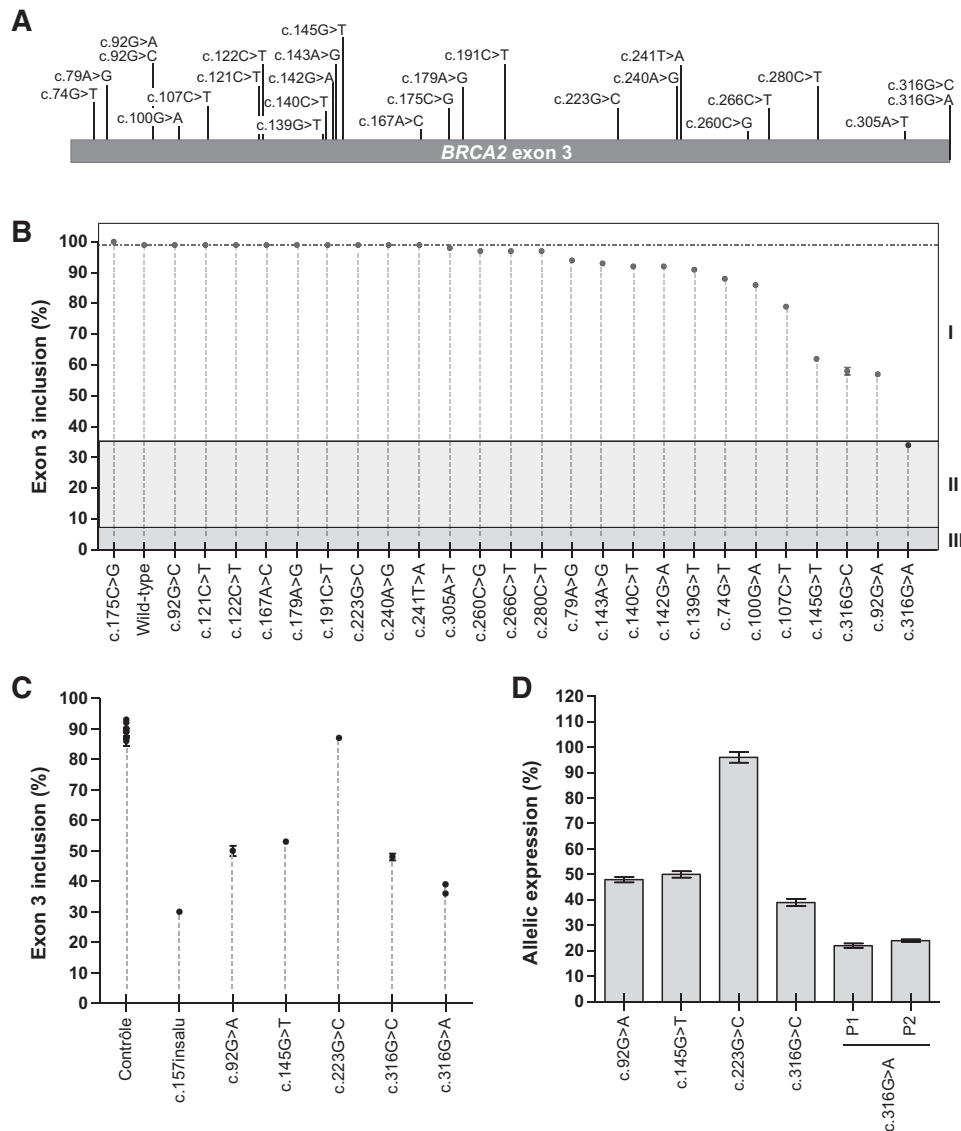


Figure 4.

RNA splicing impact of variants of unknown significance mapping to *BRCA2* exon 3. **A**, Distribution of the 26 selected coding variants within *BRCA2* exon 3. The diagram shows the relative position and identity of each variant within *BRCA2*e3 or its flanking intronic regions. **B**, Impact of *BRCA2* exon 3 variants on splicing observed in pCAS2-based minigene assays. Wild-type and mutant pCAS2-*BRCA2*-e3 minigene constructs were transiently expressed in HeLa cells. The splicing patterns of the RNA produced from the different minigenes were then analyzed by semiquantitative fluorescent RT-PCR, followed by capillary electrophoresis. Results represent the mean of exon 3 inclusion (FL) level of three independent transfection experiments. Error bars, SEM values. Dashed line, the level of FL produced by the WT minigene. Solid lines, FL levels that discriminate different classes of variants based on the splicing pattern of pCAS2-*BRCA2*e3 minigenes (c.316+6T>C and c.316+5G>C) and taking into account results from the mESC complementation assay shown in **Fig. 3**: likely neutral (I), of unknown clinical significance (II) and pathogenic variants (III). **C**, *BRCA2* exon 3 splicing patterns assessed in patient-derived samples. The *BRCA2*e3 splicing patterns in patient-derived RNA samples were monitored by semiquantitative fluorescent RT-PCR by using primers located in exons 2 and 5, and compared with those from healthy donors (controls). The levels of exon inclusion (FL) refer to the amount of full-length transcripts (containing exon 3) relative to the total amount of transcripts (with and without exon 3) and are representative of three independent experiments. Error bars, SEM values. **D**, Allele-specific expression of transcripts including *BRCA2* exon 3 measured by SNaPshot analysis in patient-derived samples. Genomic segment (gDNA) and complementary DNA (cDNA) containing *BRCA2*e3 were amplified in parallel using specific primers (gray arrows) and the SNaPshot quantitative primer extension assay was then performed with a variant-specific primer (black arrow) targeting the sequence immediately upstream the *BRCA2*e3 variant (star). Allele-specific expression levels, representing the relative contribution of the variant allele to the expression of full-length (FL) *BRCA2* transcripts as compared with WT (% of WT), were measured by normalization of the cDNA peak area ratio (variant/WT) to the corresponding gDNA peak area ratio (variant/WT). Results are representative of three independent experiments. Error bars, SEM values.

Tubeuf et al.

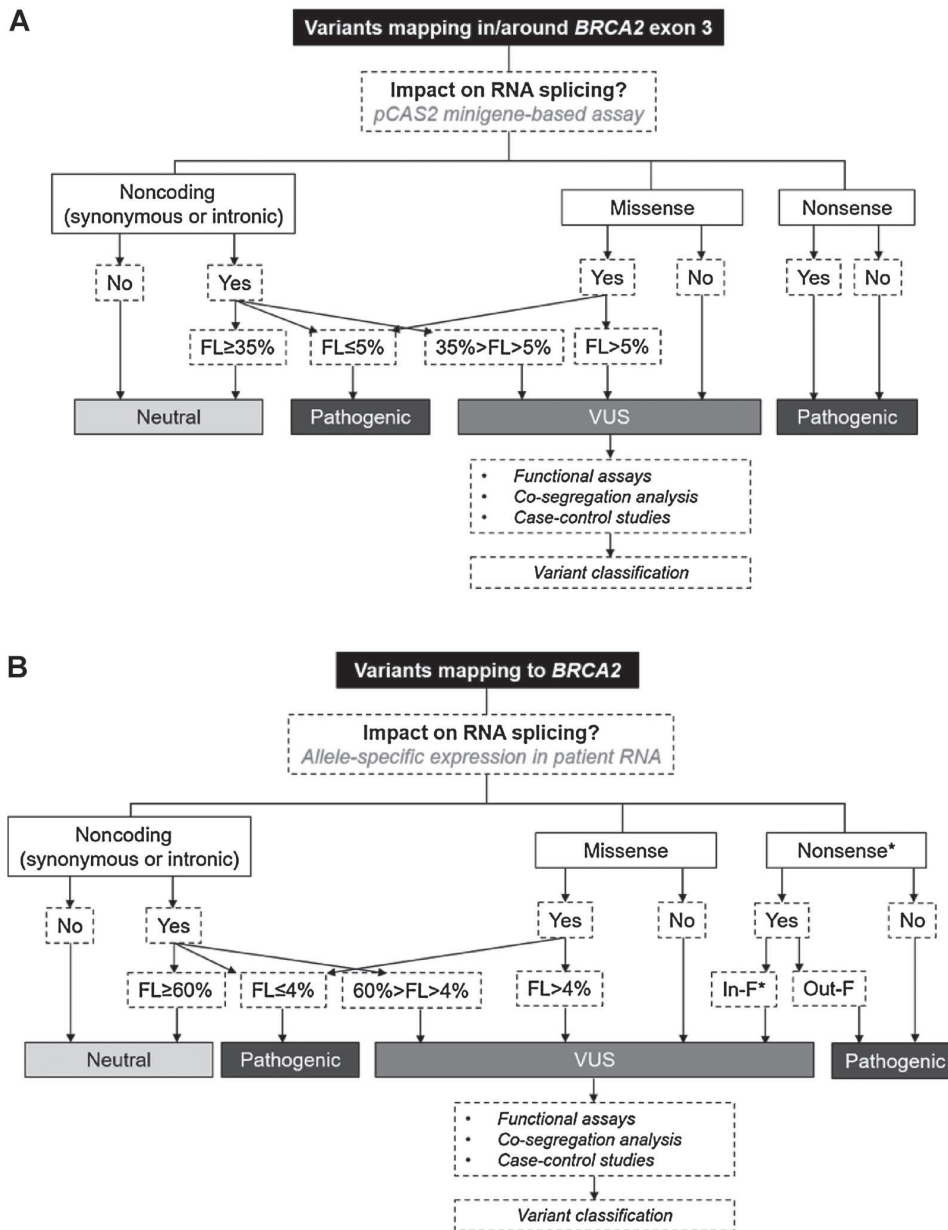


Figure 5.

Flowcharts describing the interest of RNA splicing assays and level of expression of *BRCA2* FL transcripts for classification of *BRCA2* VUS. **A**, Extreme decision thresholds for *BRCA2e3* variants based on data from pCAS2-*BRCA2e3* minigene splicing assays and mESC complementation/survival results, notably on c.316+6T>C and c.316+5G>C (35% FL and 5% FL thresholds, respectively). **B**, Conservative decision thresholds for *BRCA2e3* variants, as well as for variants mapping outside *BRCA2e3*, based on data from ASE analysis (Supplementary Table S1). The 60% FL threshold derives from ASE results obtained with c.231T>G carriers. The 4% FL threshold was extrapolated from the c.316+5G>C minigene results by taking into account an adjustment factor of 0.77, which was determined by comparing minigene data with the ASE values obtained with exonic variants (Supplementary Table S1). These classification charts are not valid for variants inducing the production of transcripts containing in-frame indels that can lead to the synthesis of potentially/partially functional proteins. Nonsense*, nonsense variants outside the last exon of the gene; FL, full-length reference transcripts containing *BRCA2e3* (NM_000059.3); In-F*, in-frame RNA splicing alterations not affecting essential functional domains of the *BRCA2* protein; Out-F, out-of-frame RNA splicing alterations resulting in frameshift modifications of *BRCA2* transcripts.

values, extrapolated from *BRCA2e3* splicing efficiencies, meant for improving variant interpretation (Fig. 5A and B). These thresholds allowed us to classify the 100 variants in our dataset as follows: 59 as neutral, 11 as pathogenic, and 30 as VUS (Supplementary Table S1). Our data suggests that noncoding *BRCA2e3* variants producing at least 27% FL transcripts in the mESC assay as compared with WT (or 35% in the minigene assay) can be considered neutral as they are expected to fully complement the loss of *BRCA2* in mESCs as seen for c.316+6T>C. A more conservative approach would be to take into account, as threshold for neutrality, the fraction of variant-expressed FL transcripts observed for c.231T>G (a minimum of 68%, 70%, or ~60% FL in mESC, minigene or patients' RNA assays, respectively, as compared with WT) given that this is clearly a nonpathogenic variant. Indeed, our results indicate, for the first time, that *BRCA2* tumor suppressor activity tolerates a substantial reduction in FL expression from one allele independently of the synthesis of alternatively spliced functional transcripts. Interestingly, certain *BRCA1* and *BRCA2* variants responsible for drastic FL losses were recently reported as not being necessarily associated with high cancer risk or total loss-of-function (41, 42). However, in these cases, alternatively spliced transcripts leading to the production of potentially or partially functional isoforms (*BRCA1* Δ9, 10, or *BRCA2* Δ12, respectively) were generated, suggesting a rescue mechanism underlying the preserved BRCA function.

A window of uncertainty prevails for variants showing hypomorphic phenotypes in the mESC assay such as c.316+6T>A and c.316+6T>G that reduce FL transcripts to approximately 15% WT in mESC (~25% WT in the minigene assay). It is possible that these variants confer moderate risks of breast/ovarian cancer as shown for *BRCA1* c.5096G>A/p.Arg1699Gln and *BRCA2* c.9104A>C/p.Tyr3035Ser (43–45) or are associated with lower penetrance (45). Noncoding spliceogenic variants with incomplete penetrance and/or variable degrees of disease expressivity have already been described in other cancer predisposition genes such as *RB1* (46), *PMS2* (47), and *VHL* (48). Possibly such variability also exists within the spectra of *BRCA2* variants.

Further studies will be essential for illuminating genotype-phenotype correlations of spliceogenic *BRCA2* VUS identified as leaky in this and other studies. Given the rarity of most of these variants, informative studies will more likely stem from international collaborative efforts, such as those conducted by the ENIGMA consortium (49), allowing the collection of data on large number of patients and their families as well as to perform case-control genotyping analysis to accurately estimate cancer risks conferred by individual variants. Finally, because only minimal amounts of FL transcripts seem to be required for sufficient *BRCA2* function, our study may pave the way for the development of new cancer prevention strategies based on RNA splicing correction in patients carrying *BRCA2* splicing variants, according to the paradigm of spinal muscular atrophy (50).

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

H. Tubeuf reports personal fees and nonfinancial support from Interactive Biosoftware [CIFRE PhD fellowship (#2015/0335)], grants from Groupement des Entreprises Françaises dans la Lutte contre le Cancer (Gefluc; Translational research grant), Fédération Hospitalo-Universitaire (FHU) Normandy Centre for Genomic and Personalized Medicine (NGP; translational research grant), European Union and Region Normandie (translational research grant), French National Cancer Institute and the Direction Générale de l'Offre des Soins (INCa/DGOS; translational research grant), European Regional Development Fund (ERDF; translational research grant); personal fees from EMBO (short-term fellowship #3436), Cancéropôle Nord-Ouest (short-term fellowship), and OpenHealth Institute during the conduct of the study.

G. Castelain reports grants from French National Cancer Institute and the Direction Générale de l'Offre des Soins (INCa/DGOS), Groupement des Entreprises Françaises dans la Lutte contre le Cancer (Gefluc), and other from Fédération Hospitalo-Universitaire (FHU) Normandy Centre for Genomic and Personalized Medicine (NGP; financial support to Inserm U1245) and other from European Union and Region Normandie (financial support to Inserm U1245) during the conduct of the study; and H. Tubeuf was funded by a CIFRE PhD fellowship (#2015/0335) from the French Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT) in the context of a public-private partnership between INSERM and Interactive Biosoftware. L. Meulemans reports grants from French National Cancer Institute and the Direction Générale de l'Offre des Soins (INCa/DGOS), grants from Groupement des Entreprises Françaises dans la Lutte contre le Cancer (Gefluc), other from Fédération Hospitalo-Universitaire (FHU) Normandy Centre for Genomic and Personalized Medicine (NGP; financial support to Inserm U1245), and other from European Union and Region Normandie (financial support to Inserm U1245) during the conduct of the study; and H. Tubeuf was funded by a CIFRE PhD fellowship (#2015/0335) from the French Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT) in the context of a public-private partnership between INSERM and Interactive Biosoftware. P. Pujol reports grants and personal fees from AstraZeneca, Pfizer; personal fees from MSD and Exact Sciences outside the submitted work. F. Vaz reports other from AstraZeneca (collaborated with BRCA testing for observational study) outside the submitted work. C. Colas reports personal fees from AstraZeneca outside the submitted work. P. Gaildrat reports grants from French National Cancer Institute and the Direction Générale de l'Offre des Soins (INCa/DGOS), Groupement des Entreprises Françaises dans la Lutte contre le Cancer (Gefluc), other from Fédération Hospitalo-Universitaire (FHU) Normandy Centre for Genomic and Personalized Medicine (NGP; financial support to Inserm U1245), and other from European Union and Region Normandie (financial support to Inserm U1245) during the conduct of the study; and H. Tubeuf was funded by a CIFRE PhD fellowship (#2015/0335) from the French Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT) in the context of a public-private partnership between INSERM and Interactive Biosoftware. A. Martins reports grants from French National Cancer Institute and the Direction Générale de l'Offre des Soins (INCa/DGOS), Groupement des Entreprises Françaises dans la Lutte contre le Cancer (Gefluc), other from Fédération Hospitalo-Universitaire (FHU) Normandy Centre for Genomic and Personalized Medicine (NGP; financial support to Inserm U1245), and other from European Union and Region Normandie (financial support to Inserm U1245) during the conduct of the study; and H. Tubeuf was funded by a CIFRE PhD fellowship (#2015/0335) from the French Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT) in the context of a public-private partnership between INSERM and Interactive Biosoftware. No potential conflicts of interest were disclosed by the other authors.

Authors' Contributions

H. Tubeuf: Conceptualization, software, formal analysis, funding acquisition, validation, investigation, visualization, methodology, writing-original draft, writing-review and editing. S.M. Caputo: Resources, funding acquisition, investigation, writing-review and editing. T. Sullivan: Investigation. J. Rondeau: Investigation. S. Krieger: Resources, writing-review and editing. V. Caux-Moncoutier: Resources. J. Hauchard: Investigation. G. Castelain: Investigation. A. Fiévet: Resources. L. Meulemans: Investigation. F. Révillion: Resources. M. Léon: Resources. N. Boutry-Kryza: Resources. C. Delnatte: Resources. M. Guillaud-Bataille: Resources. L. Cleveland: Investigation. S. Reid: Investigation. E. Southon: Investigation. O. Soukarieh: Investigation. A. Drouet: Investigation. D. Di Giacomo: Investigation. M. Vezain: Investigation. F. Bonnet-Dorion: Resources. V. Bourdon: Resources. H. Larbre: Resources. D. Muller: Resources. P. Pujol: Resources. F. Vaz: Resources. S. Audebert-Bellanger: Resources. C. Colas: Resources. L. Venat-Bouvet: Resources. A.R. Solano: Resources. D. Stoppa-Lyonnet: Resources, funding acquisition. C. Houdayer: Resources, writing-review and editing. T. Frebourg: Resources, funding acquisition, writing-review and editing. P. Gaildrat: Conceptualization, supervision, funding acquisition, validation, investigation, writing-original draft, writing-review and editing. S.K. Sharan: Resources, supervision, funding acquisition, validation, investigation, writing-review and editing. A. Martins: Conceptualization, supervision, funding acquisition, validation, investigation, visualization, methodology, writing-original draft, project administration, writing-review and editing, study design and direction.

Acknowledgments

This work was funded by a translational research grant from the French National Cancer Institute and the Direction Générale de l'Offre des Soins (INCa/DGOS, AAP/CFB/CI), by the OpenHealth Institute, the Groupement des

Tubeuf et al.

Entreprises Françaises dans la Lutte contre le Cancer (Gefluc), the Fédération Hospitalo-Universitaire (FHU) Normandy Centre for Genomic and Personalized Medicine (NGP), the European Union and Region Normandie as well as by the Intramural Research Program from the Center for Cancer Research of the NCI, NIH. Europe gets involved in Normandie with European Regional Development Fund (ERDF). H. Tubeuf was funded by a CIFRE PhD fellowship (#2015/0335) from the French Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT) in the context of a public-private partnership between INSERM and Interactive Biosoftware and by two short-term fellowship from EMBO (#3436) and Cancéropôle Nord-Ouest. J. Hauchard and G. Castelain were sponsored by the French INCa. The COVAR study is supported by the French Ligue contre le

cancer and INCa BCB (2013-1-BCB-01-ICH-1) and by the GENETICANCER and « Cercle de l'Olympe ». We thank Sabine Tourneur (Inserm U1245, Rouen, France) for technical assistance.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received March 31, 2020; revised May 14, 2020; accepted July 2, 2020; published first July 8, 2020.

References

- Cline MS, Liao RG, Parsons MT, Paten B, Alquaddoomi F, Antoniou A, et al. BRCA Challenge: BRCA Exchange as a global resource for variants in BRCA1 and BRCA2. *PLoS Genet* 2018;14:e1007752.
- Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, Phillips K-A, Mooij TM, Roos-Blom M-J, et al. Risks of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *JAMA* 2017;317:2402-16.
- Mersch J, Jackson MA, Park M, Nebgen D, Peterson SK, Singletary C, et al. Cancers associated with BRCA1 and BRCA2 mutations other than breast and ovarian. *Cancer* 2015;121:269-75.
- Niraj J, Färkkilä A, D'Andrea AD. The fanconi anemia pathway in cancer. *Annu Rev Cancer Biol* 2019;3:457-78.
- Caputo S, Benboudjema L, Sinilnikova O, Rouleau E, Bérout C, Lidereau R, et al. Description and analysis of genetic variants in French hereditary breast and ovarian cancer families recorded in the UMD-BRCA1/BRCA2 databases. *Nucleic Acids Res* 2012;40:D992-1002.
- Landrum MJ, Lee JM, Riley GR, Jang W, Rubinstein WS, Church DM, et al. ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic Acids Res* 2014;42:D980-5.
- Eccles DM, Mitchell G, Monteiro ANA, Schmutzler R, Couch FJ, Spurdle AB, et al. BRCA1 and BRCA2 genetic testing-pitfalls and recommendations for managing variants of uncertain clinical significance. *Ann Oncol* 2015;26:2057-65.
- Lindor NM, Goldgar DE, Tavtigian SV, Plon SE, Couch FJ. BRCA1/2 sequence variants of uncertain significance: a primer for providers to assist in discussions and in medical management. *Oncologist* 2013;18:518-24.
- Starita LM, Ahituv N, Dunham MJ, Kitzman JO, Roth FP, Seelig G, et al. Variant interpretation: functional assays to the rescue. *Am J Hum Genet* 2017;101:315-25.
- Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 2002;3:285-98.
- Bonnet C, Krieger S, Vezain M, Rousselin A, Tournier I, Martins A, et al. Screening BRCA1 and BRCA2 unclassified variants for splicing mutations using reverse transcription PCR on patient RNA and an ex vivo assay based on a splicing reporter minigene. *J Med Genet* 2008;45:438-46.
- Caputo SM, Léone M, Damiola F, Ehlen A, Carreira A, Gaidrat P, et al. Full in-frame exon 3 skipping of BRCA2 confers high risk of breast and/or ovarian cancer. *Oncotarget* 2018;9:17334-48.
- Prakash R, Zhang Y, Feng W, Jasin M. Homologous recombination and human health: the roles of BRCA1, BRCA2, and associated proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015;7:a016600.
- Martinez JS, Baldeyron C, Carreira A. Molding BRCA2 function through its interacting partners. *Cell Cycle* 2015;14:3389-95.
- Muller D, Rouleau E, Schultze I, Caputo S, Lefol C, Bièche I, et al. An entire exon 3 germ-line rearrangement in the BRCA2 gene: pathogenic relevance of exon 3 deletion in breast cancer predisposition. *BMC Med Genet* 2011;12:121.
- Zou JP, Hirose Y, Siddique H, Rao VN, Reddy ES. Structure and expression of variant BRCA2a lacking the transactivation domain. *Oncol Rep* 1999;6:437-40.
- Davy G, Rousselin A, Goardon N, Castéra L, Harter V, Legros A, et al. Detecting splicing patterns in genes involved in hereditary breast and ovarian cancer. *Eur J Hum Genet* 2017;25:1147-54.
- Fackenthal JD, Yoshimatsu T, Zhang B, de Garibay GR, Colombo M, De Vecchi G, et al. Naturally occurring BRCA2 alternative mRNA splicing events in clinically relevant samples. *J Med Genet* 2016;53:548-58.
- Colombo M, López-Perollo I, Meeks HD, Caleca L, Parsons MT, Li H, et al. The BRCA2 c.68-7T >A variant is not pathogenic: a model for clinical calibration of spliceogenicity. *Hum Mutat* 2018;39:729-41.
- Leman R, Gaildrat P, Le Gac G, Ka C, Fichou Y, Audrezet M-P, et al. Novel diagnostic tool for prediction of variant spliceogenicity derived from a set of 395 combined in silico/in vitro studies: an international collaborative effort. *Nucleic Acids Res* 2020;48:1600-1.
- Ke S, Shang S, Kalachikov SM, Morozova I, Yu L, Russo JJ, et al. Quantitative evaluation of all hexamers as exonic splicing elements. *Genome Res* 2011;21:1360-74.
- Di Giacomo D, Gaildrat P, Abuli A, Abdat J, Frébourg T, Tosi M, et al. Functional analysis of a large set of BRCA2 exon 7 variants highlights the predictive value of hexamer scores in detecting alterations of exonic splicing regulatory elements. *Hum Mutat* 2013;34:1547-57.
- Erkelenz S, Theiss S, Otte M, Widera M, Peter JO, Schaal H. Genomic HEXploring allows landscaping of novel potential splicing regulatory elements. *Nucleic Acids Res* 2014;42:10681-97.
- Xiong HY, Alipanahi B, Lee LJ, Bretschneider H, Merico D, Yuen RKC, et al. RNA splicing. The human splicing code reveals new insights into the genetic determinants of disease. *Science* 2015;347:1254806.
- Rosenberg AB, Patwardhan RP, Shendure J, Seelig G. Learning the sequence determinants of alternative splicing from millions of random sequences. *Cell* 2015;163:698-711.
- Tubeuf H, Charbonnier C, Soukarieh O, Blavier A, Lefebvre A, Dauchel H, et al. Large-scale comparative evaluation of user-friendly tools for predicting variant-induced alterations of splicing regulatory elements.
- Sanz DJ, Acedo A, Infante M, Durán M, Pérez-Cabornero L, Esteban-Cardena E, et al. A high proportion of DNA variants of BRCA1 and BRCA2 is associated with aberrant splicing in breast/ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 2010;16:1957-67.
- Fraile-Bethencourt E, Valenzuela-Palomo A, Díez-Gómez B, Goina E, Acedo A, Buratti E, et al. Mis-splicing in breast cancer: identification of pathogenic BRCA2 variants by systematic minigene assays. *J Pathol* 2019;248:409-20.
- Soukarieh O, Gaildrat P, Hamieh M, Drouet A, Baert-Desurmont S, Frébourg T, et al. Exonic splicing mutations are more prevalent than currently estimated and can be predicted by using in silico tools. *PLoS Genet* 2016;12:e1005756.
- Kuznetsov SG, Chang S, Sharan SK. Functional analysis of human BRCA2 variants using a mouse embryonic stem cell-based assay. *Methods Mol Biol* 2010;653:259-80.
- Kuznetsov SG, Liu P, Sharan SK. Mouse embryonic stem cell-based functional assay to evaluate mutations in BRCA2. *Nat Med* 2008;14:875-81.
- Théry JC, Krieger S, Gaildrat P, Révillion F, Buisine M-P, Killian A, et al. Contribution of bioinformatics predictions and functional splicing assays to the interpretation of unclassified variants of the BRCA genes. *Eur J Hum Genet* 2011;19:1052-8.
- Machado PM, Brandão RD, Cavaco BM, Eugénio J, Bento S, Nave M, et al. Screening for a BRCA2 rearrangement in high-risk breast/ovarian cancer families: evidence for a founder effect and analysis of the associated phenotypes. *J Clin Oncol* 2007;25:2027-34.
- Montalban G, Bonache S, Moles-Fernández A, Gadea N, Tenés A, Torres-Esquius S, et al. Incorporation of semi-quantitative analysis of splicing alterations for the clinical interpretation of variants in BRCA1 and BRCA2 genes. *Hum Mutat* 2019;40:2296-317.
- Mesman RLS, Calléja FMGR, Hendriks G, Morolli B, Misovic B, Devilee P, et al. The functional impact of variants of uncertain significance in BRCA2. *Genet Med* 2019;21:293-302.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus

Leaky Exon 3 Variants and *BRCA2* Haploinsufficiency

- recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17:405–24.
37. Spurdle AB, Healey S, Devereau A, Hogervorst FBL, Monteiro ANA, Nathanson KL, et al. ENIGMA—evidence-based network for the interpretation of germline mutant alleles: an international initiative to evaluate risk and clinical significance associated with sequence variation in *BRCA1* and *BRCA2* genes. *Hum Mutat* 2012;33:2–7.
 38. Biswas K, Das R, Eggington JM, Qiao H, North SL, Stauffer S, et al. Functional evaluation of *BRCA2* variants mapping to the *PALB2*-binding and C-terminal DNA-binding domains using a mouse ES cell-based assay. *Hum Mol Genet* 2012; 21:3993–4006.
 39. Thomassen M, Blanco A, Montagna M, Hansen TVO, Pedersen IS, Gutiérrez-Enriquez S, et al. Characterization of *BRCA1* and *BRCA2* splicing variants: a collaborative report by ENIGMA consortium members. *Breast Cancer Res Treat* 2012;132:1009–23.
 40. Hendriks G, Morolli B, Calléja FMGR, Plomp A, Mesman RLS, Meijers M, et al. An efficient pipeline for the generation and functional analysis of human *BRCA2* variants of uncertain significance. *Hum Mutat* 2014;35:1382–91.
 41. de la Hoya M, Soukarieh O, López-Perolio I, Vega A, Walker LC, van Ierland Y, et al. Combined genetic and splicing analysis of *BRCA1* c.[594-2A>C; 641A>G] highlights the relevance of naturally occurring in-frame transcripts for developing disease gene variant classification algorithms. *Hum Mol Genet* 2016;25:2256–68.
 42. Meulemans L, Mesman R, Caputo S, Krieger S, Guillaud-Bataille Guillaud-Bataille M, Caux-Moncoutier V. Skipping nonsense to maintain function: the paradigm of *BRCA2* exon 12. *Cancer Res* 2020;80:1374–86.
 43. Moghadasi S, Meeks HD, Vreeswijk MP, Janssen LA, Borg Å, Ehrencrona H, et al. The *BRCA1* c. 5096G>A p.Arg1699Gln (R1699Q) intermediate risk variant: breast and ovarian cancer risk estimation and recommendations for clinical management from the ENIGMA consortium. *J Med Genet* 2018;55:15–20.
 44. Shimelis H, Mesman RLS, Von Nicolai C, Ehlen A, Guidugli L, Martin C, et al. *BRCA2* hypomorphic missense variants confer moderate risks of breast cancer. *Cancer Res* 2017;77:2789–99.
 45. Spurdle AB, Whaley PJ, Thompson B, Feng B, Healey S, Brown MA, et al. *BRCA1* R1699Q variant displaying ambiguous functional abrogation confers intermediate breast and ovarian cancer risk. *J Med Genet* 2012;49:525–32.
 46. Valverde JR, Alonso J, Palacios I, Pestaña A. *RB1* gene mutation up-date, a meta-analysis based on 932 reported mutations available in a searchable database. *BMC Genet* 2005;6:53.
 47. Sjurson W, Bjørnevoll I, Engebretsen LF, Fjelland K, Halvorsen T, Myrvold HE. A homozygote splice site *PMS2* mutation as cause of Turcot syndrome gives rise to two different abnormal transcripts. *Fam Cancer* 2009;8:179–86.
 48. Sexton A, Rawlings L, McKavanagh G, Simons K, Winship I. A Novel von Hippel Lindau Gene Intronic Variant and Its Reclassification from VUS to Pathogenic: the Impact on a Large Family. *J Genet Couns* 2015;24:882–9.
 49. Parsons MT, Tudini E, Li H, Hahnen E, Wappenschmidt B, Feliubadaló L, et al. Large scale multifactorial likelihood quantitative analysis of *BRCA1* and *BRCA2* variants: An ENIGMA resource to support clinical variant classification. *Hum Mutat* 2019;40:1557–78.
 50. Ramdas S, Servais L. New treatments in spinal muscular atrophy: an overview of currently available data. *Expert Opin Pharmacother* 2020;21:307–15.

Cancer Research

The Journal of Cancer Research (1916–1930) | The American Journal of Cancer (1931–1940)

Calibration of Pathogenicity Due to Variant-Induced Leaky Splicing Defects by Using *BRCA2* Exon 3 as a Model System

Hélène Tubeuf, Sandrine M. Caputo, Teresa Sullivan, et al.

Cancer Res 2020;80:3593-3605. Published OnlineFirst July 8, 2020.




Updated version	Access the most recent version of this article at: doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-0895
Supplementary Material	Access the most recent supplemental material at: http://cancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2020/07/07/0008-5472.CAN-20-0895.DC1

Cited articles	This article cites 49 articles, 12 of which you can access for free at: http://cancerres.aacrjournals.org/content/80/17/3593.full#ref-list-1
-----------------------	--

E-mail alerts	Sign up to receive free email-alerts related to this article or journal.
Reprints and Subscriptions	To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at pubs@aacr.org .
Permissions	To request permission to re-use all or part of this article, use this link http://cancerres.aacrjournals.org/content/80/17/3593 . Click on "Request Permissions" which will take you to the Copyright Clearance Center's (CCC) Rightslink site.

Article

Plasma Peptide Concentrations and Peptide-Reactive Immunoglobulins in Patients with Eating Disorders at Inclusion in the French EDILS Cohort (Eating Disorders Inventory and Longitudinal Survey)

Marie Galmiche ^{1,2,3} , Nicolas Lucas ², Pierre Déchelotte ^{1,3,4,*}, Camille Deroissart ², Marie-Anne Le Solliec ², Julie Rondeaux ², Saida Azhar ², Sébastien Grigioni ^{1,3,4}, Guillaume Colange ⁴, Julie Delay ⁴, Najate Achamrah ^{1,3,4}, Vanessa Folope ^{1,3,4}, Liliana Belmonte ^{1,3,4}, Adèle Lamarre ⁴, Agnès Rimbert ^{1,3,4}, Tiphaine Saillard ⁴, André Petit ^{1,3,4}, Muriel Quillard ⁵, Moise Coeffier ^{1,3,4} , André Gillibert ⁶, Grégory Lambert ² , Romain Legrand ²  and Marie-Pierre Tavalacci ^{1,3,5} 

- ¹ Inserm UMR1073, 76000 Rouen, France; marie.galmiche3@gmail.com (M.G.); sebastien.grigioni@chu-rouen.fr (S.G.); Najate.Achamrah@chu-rouen.fr (N.A.); vanessa.folope@chu-rouen.fr (V.F.); lilibelmonte3@hotmail.com (L.B.); agnes.rimbert@chu-rouen.fr (A.R.); Andre.Petit@chu-rouen.fr (A.P.); Moise.Coeffier@chu-rouen.fr (M.C.); MP.Tavalacci@chu-rouen.fr (M.-P.T.)
- ² TargEDys SA, 91160 Longjumeau, France; lucasnicolas@hotmail.fr (N.L.); camillederoissart@gmail.com (C.D.); maleso@msn.com (M.-A.L.S.); julie.rdx@gmail.com (J.R.); saida-az@hotmail.fr (S.A.); glambert@targedys.com (G.L.); legrandromain@hotmail.fr (R.L.)
- ³ Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), University of Rouen, 76000 Rouen, France
- ⁴ Nutrition unit, University Hospital of Rouen, 76000 Rouen, France; guillaume.colange@chu-rouen.fr (G.C.); julie.delay@chu-rouen.fr (J.D.); Adele.Lamarre@chu-rouen.fr (A.L.); saillard.tiphaine@gmail.com (T.S.)
- ⁵ CIC-CRB 1404 INSERM, University Hospital of Rouen, 76000 Rouen, France; Muriel.Quillard@chu-rouen.fr
- ⁶ Department of Biostatistics, Rouen University Hospital, F 76000 Rouen, France; Andre.Gillibert@chu-rouen.fr
- * Correspondence: Pierre.Dechelotte@chu-rouen.fr; Tel.: +06-08-49-66-26

Received: 17 January 2020; Accepted: 14 February 2020; Published: 18 February 2020



Abstract: Eating disorders (EDs) are increasingly frequent. Their pathophysiology involves disturbance of peptide signaling and the microbiota–gut–brain axis. This study analyzed peptides and corresponding immunoglobulin (Ig) concentrations in groups of ED. In 120 patients with restrictive (R), bulimic (B), and compulsive (C) ED, the plasma concentrations of leptin, glucagon-like peptide-1 (GLP-1), peptide YY (PYY), and insulin were analyzed by Milliplex and those of acyl ghrelin (AG), des-acyl ghrelin (DAG), and α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) by ELISA kits. Immunoglobulin G (in response to an antigen) concentrations were analyzed by ELISA, and their affinity for the respective peptide was measured by surface plasmon resonance. The concentrations of leptin, insulin, GLP-1, and PYY were higher in C patients than in R patients. On the contrary, α -MSH, DAG, and AG concentrations were higher in R than in C patients. After adjustment for body mass index (BMI), differences among peptide concentrations were no longer different. No difference in the concentrations of the IgG was found, but the IgG concentrations were correlated with each other. Although differences of peptide concentrations exist among ED subtypes, they may be due to differences in BMI. Changes in the concentration and/or affinity of several anti-peptide IgG may contribute to the physiopathology of ED or may be related to fat mass.

Keywords: eating disorder; peptides; immunoglobulins; human; plasma

1. Introduction

Eating disorders (EDs) are a public health issue, characterized by important disturbances of food behavior, body image, and corpulence [1]. EDs are ubiquitous and the lifetime prevalence for all EDs ranges from 3.3% to 18.6% for women and from 0.8% to 6.5% for men [2]. As an alternative to the DSM-5 precise ED definition (standard classification), some authors have proposed to classify ED according to broad categories featuring the main symptom [3]. This classification based on pragmatic clinical approach describes three broad categories: Restrictive (R), bulimic (B), and compulsive (C) disorders.

Eating disorders are multifactorial diseases depending on the combination of genetic [4] and psychological factors [5,6], in close interaction with family, environmental, socio-cultural, and homeostatic factors [7,8]. The mechanisms of homeostatic regulation of eating behavior are regulated by numerous signaling pathways integrated in the hypothalamus [9]. Among these, peptides play a key role as anorectic or orexigenic factors [10]. Several studies display alterations of these peptides' plasma concentrations during ED, which could be indicative of or contribute to the onset and/or maintenance of the pathology.

The main anorexigenic peptides are leptin, insulin, peptide YY (PYY), glucagon-like peptide-1 (GLP-1), and α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH). At this time, only one orexigenic hormone has been demonstrated: Acyl ghrelin. This hormone comes from the non-octanoylated form, des-acyl ghrelin, which would have an anorectic role [11].

These changes in peptide concentrations and/or effects could be related to dysbiosis of gut microbiota, characterized by a change in the number or nature of bacteria present in the gut [12].

Moreover, the gut microbiota is also known to have an impact on the immune system and especially its maturation [13]. The dysbiosis of the gut microbiota during ED could impact the concentration of the circulating peptides but also modulate immunity by leading to an inappropriate process and thus by having an impact on immunoglobulin (Ig) concentrations and their affinity [14–16]. In germ-free mice, a decrease in Ig concentrations associated with an alteration of intestinal functions was observed [17].

The involvement of autoantibodies on the hypothalamic system and thus on the regulation of food intake of AN and BN patients was already suggested in 2002. Indeed, anti- α -melanocyte-stimulating hormone and anti-adrenocorticotrophic hormone (anti-ACTH) antibodies from these patients were able to bind to melanocortins and corticotrophin-containing neurons from the hypothalamus of rats. These autoantibodies anti- α -MSH and anti-ACTH could be produced as a result of concomitant activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the immune system. In fact, the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis is a characteristic feature of AN [18].

The different functional properties of these Ig, such as affinity and plasma concentration, could either reduce or reinforce the biological activity of the peptide on eating behavior [19–21]. In fact, a change in the affinity of IgG and IgM (in response to first contact with an antigen) against α -MSH within the adaptive response to food deprivation was observed in rats [22]. The production of α -MSH-directed Ig could be influenced by the combination of stress, food restriction, or altered intestinal permeability [23]. Finally, we previously reported that some proteins, such as caseinolytic peptidase B (ClpB), may share some effect with α -MSH by molecular mimicry [20,21]. Indeed, a part of the ClpB protein produced by Enterobacteriaceae, such as *E. coli* or *H. alvei*, presents a molecular mimicry with α -MSH, which can reduce food intake in rodents [19–21]. In a preliminary study, plasma ClpB concentrations were increased in patients with ED as compared to controls, but without a difference among AN, BN, and BED [21].

To allow a comprehensive assessment of clinical and biological features in patients with well-characterized ED, the EDILS prospective cohort (Eating Disorders Inventory and Longitudinal Survey) was launched at Rouen University Hospital. Based on the analysis of the first 120 patients included in this cohort, the main objective of the present study was to measure the different peptides involved in the regulation of eating behavior (leptin, insulin, GLP-1, PYY, α -MSH, and acyl and des-acyl ghrelin) and their corresponding Ig in three groups of patients with ED of the restrictive

(R), bulimic (B), or compulsive (C) types. This study also allowed study of the different associations between biological data but also between clinical co-morbidities and biological parameters.

2. Materials and Methods

2.1. Study Design: EDILS Cohort

The EDILS cohort with biocollection was launched in 2015 after approval by the French national committee “Informatique et liberté” (N° CNIL: 1787487) and the Ethics Committee (N° CPP/CE 002/2014). All patients aged 18 or older referring to the Nutrition Department for the first consultation for a non-treated ED were potentially considered for inclusion. During the first consultation, the physician established the ED diagnostic according to the DSM-5 classification. After agreeing to participate and having given written consent, patients were invited to fill in the first questionnaire and received a stool collection kit. The questionnaire collected at patients’ inclusion enabled description of their clinical features, including anthropometric, sociodemographic, and addiction risk data. In addition, standardized EDI-2, BSQ, and HAD questionnaires were filled in. The EDI-2 has been validated to determine personality traits and comorbidities frequently associated in patients with ED [24]. The Body Shape Questionnaire (BSQ) is a standardized questionnaire assessing patients’ bodily concerns [25]. Finally, the HAD questionnaire was used to evaluate anxiety and depression [26]. In order to determine significant differences according to EDI-2 and BSQ, the cut-off corresponds to the median of the scores. For the HAD sub-item, the scores higher than the cut-off (11) mean that patients have certain anxiety/depression and vice versa.

All data used in this article are from the first self-questionnaire provided to the 120 patients enrolled between April 2015 and January 2018.

As part of their usual care, patients came back to the hospital within a few weeks for a comprehensive evaluation on a morning day hospital basis. Patient plasma was collected between 8 and 11 in the morning after an overnight fast. In addition to routine blood samples, aprotinin- and heparin-containing tubes were taken and shortly after centrifuged for 15 min at 4 °C at 3500 rpm; 1–3 aliquots of 600 µL per each tube were prepared and frozen at –80 °C until analyses.

Although the DSM-5 is recognized as the gold standard for the diagnosis of ED, the difference among typical and atypical ED in this classification is mainly related to the degree of severity while the clinical features are essentially similar. In addition, it has been proposed that broad categories of ED (restrictive, bulimic, and compulsive) are useful for the clinical approach of ED [2,27]. Finally, in the biological analysis of the present study, there were no statistically significant differences between results from patients with typical versus atypical ED, the only exception being for PYY. Therefore, in order to combine biological and clinical profiles, we pooled the patients included in this study in 3 broad categories of restrictive (R), bulimic (B), and compulsive (C) ED. The R category includes AN, restrictive food intake disorder, and atypical AN; B category includes BN or atypical BN of low frequency or duration; and the C group includes BED, BED of low frequency or duration, and night eating syndrome. “Restrictive” patients are characterized by a Body Mass Index (BMI) lower than normal according to the WHO [BMI <18.5]. “Bulimic” patients are normal weight or overweight [18.5 < BMI < 30]. On the contrary, “compulsive” patients have obesity and therefore a BMI greater than 30.

Clinical and biological data will be presented in the following sections according to these 3 broad groups, except for PYY concentrations for which data will be presented separately according to typical and atypical ED.

2.2. Peptide Concentrations

GLP-1(7-36), PYY (3-36), leptin, insulin, α -MSH, and des-acyl ghrelin (DAG) were the anorexigenic peptide concentrations measured; acyl ghrelin (AG) was the orexigenic peptides measured.

Plasma concentrations of AG, DAG, and α -MSH were measured using an enzyme-linked immunosorbent assay kit (ELISA kit) and following the supplier instructions. The coefficients of variation for the measurement of peptide concentrations were less than 10%.

Plasma concentrations of leptin, insulin, GLP-1, and PYY were measured using a Milliplex Map Kit with the associated protocol (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). The coefficient of variation for these 2 peptide concentrations was less than 15%. The choice of the form of the peptide studied was also chosen according to the literature. PYY (3-36) is more potent than PYY (1-36) in inhibiting gastric emptying [28]. GLP-1(7-36) analysis was chosen because it is the major circulating bioactive species in humans [29].

2.3. IgG Concentrations

Plasma concentrations of IgG anti-acyl ghrelin, des-acyl ghrelin, PYY, GLP-1, insulin, and leptin were measured using an enzyme-linked immunosorbent assay technique (ELISA) according to an already published protocol [30]. The total and free IgG concentration for each peptide was measured. The coefficients of variation of the IgG concentrations were less than 10%.

2.4. Affinity Measurements

First, the IgG was purified with the MelonGel[®] Purification kit (LifeTechnologies, Carlsbad, CA, USA) and according to supplier instructions. After purification, the IgG concentration of each sample was measured using Nanodrop 2000 C (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) with HBS-EP buffer as the blank.

The affinity of patients' IgG for each peptides of interest were determined by surface plasmon resonance (SPR) with BIAcore T200 (GE Healthcare, Velizy Villacoublay, France). For the coating, peptides were diluted at 0.5 mg/mL in 10 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) and 250RU of peptides were covalently coated on 3 cells of the CM5 sensor chip (GE Healthcare), using an amine coupled kit (GE Healthcare). Affinity kinetic analysis was performed using a single-cycle method with five serial dilutions at $\frac{1}{2}$ of each IgG sample from 840 nM to 52.5 nM. Here, 60 μ L of each sample dilution were injected at 30 μ L/min followed by 5 min of dissociation. Finally, the binding surface was regenerated with 50 mM NaOH resulting in the return of the sensorgram baseline. The affinity kinetic data were analyzed with the BioEvaluation 4.1.1 program (GE Healthcare) and kinetics curves were fitted using Langmuir's 1:1 model after correction with the reference cell. For affinity measurements, the coefficients of variation are less than 5%.

2.5. Statistical Analysis

Data were analyzed in the Xlstat and R statistical software (version 3.5.0, The R Foundation for Statistical Analysis). Comparison of clinical data among ED subtypes groups was performed by the Kruskal–Wallis test, but the comparison of the sex ratio was performed by Fisher's exact test.

All biological data were rank transformed before multivariable analysis to be consistent with rank tests; then, ranks were divided by the number of observations and multiplied by 100 in order to express these variables as empirical percentiles of the overall distribution (three ED groups pooled). Unadjusted, age- and sex-adjusted, then age-, sex-, and BMI-adjusted general linear models were then estimated on the transformed variables (percentiles). The small number of patients in the bulimic group did not allow a reliable statistical interpretation; the results were thus presented just as descriptive data. So, the C group was compared to the R group.

The correlogram (graphical representation of a correlation matrix) was made using the Spearman's correlation coefficient.

Three principal component analyses (PCAs) were performed after percentiles transformation for: (1) All IgG quantifications, (2) all IgG affinities, and (3) all peptides measures. These PCAs were designed to perform a dimensional reduction of the data set and their performances were analyzed by

scree plots, showing eigenvalues of the data set associated to the eigenvalues of 20 simulated PCAs in a dataset of the same size but with no correlation between any biological variable.

Twenty-three fully adjusted (adjusted on age, sex, and BMI) comparisons of percentiles of raw biological variables among ED subtypes were performed with a Bonferroni multiple testing procedure keeping a family-wise error rate (FWER) equal to 5%. The two comparisons of the first component of PCAs of IgG concentrations and IgG affinities were performed with a second Bonferroni FWER equal to 5%. Ninety-two age-, sex-, ED subtype-, and BMI-adjusted tests were performed in general linear models to assess the correlations between four clinical variables (BSQ, EDI-2, anxiety subscale of HAD, depression subscale of HAD) and biological variables; a third FWER at 5% was applied for these comparisons. Eight more tests were performed with the first components of PCAs of IgG concentrations and IgG affinities; a fourth FWER at 5% was applied for these comparisons. Comparisons of clinical variables among ED subtypes were performed at the 5% significance threshold without multiple testing corrections.

3. Results

3.1. Characteristics of the Patients

As described in the methods section, the 120 patients included were pooled in 3 broad categories. The R group included 35 patients (17 with typical AN, 5 patients with atypical AN, and 13 patients with restrictive eating disorder). The B group included 12 patients (7 with typical BN and 5 with atypical BN). Finally, the C group included 67 patients (38 with typical BED, 29 with atypical BED and 6 with night eating syndrome).

The population was composed of mainly female patients, with only 14% of men (Table 1). As expected, the mean BMI was significantly lower in the R than in the B and C group (16.4 kg/m² vs. 23.2 kg/m² and 38.1 kg/m²; *p* < 0.001). Patients from the R group were significantly younger than those from the C group but not from the B group (29.4 vs. 39.4 years and 36.0; *p* < 0.001 and *p* = 0.13).

Table 1. Characteristics of patients according to the form of ED (*n* = 120).

Characteristics	Restrictive	Bulimic	Compulsive	<i>p</i> -Value
Men/Women	2/33	1/11	14/59	0.98
BMI (kg/m²)	16.4 ± 2	23.2 ± 6	38.1 ± 6.8	<0.001
Age (Years)	29.4 ± 11.2	36.0 ± 16.5	39.4 ± 12.3	<0.001
EDI-2	77.5 ± 41.8	85.3 ± 29.2	90.4 ± 34.1	0.18
<i>Drive for thinness</i>	9.1 ± 6.9	12.1 ± 5.2	10.2 ± 5.1	0.28
<i>Bulimia</i>	2.1 ± 4.4	8.8 ± 5.2	5.6 ± 5.9	<0.001
<i>Body dissatisfaction</i>	11.1 ± 7.0	13.9 ± 7.0	20.3 ± 7.4	<0.001
<i>Ineffectiveness</i>	9.8 ± 7.3	8.5 ± 6.8	9.6 ± 7.4	0.92
<i>Perfectionism</i>	6.7 ± 4.6	7.0 ± 4.7	5.3 ± 4.1	0.23
<i>Interpersonal distrust</i>	5.7 ± 4.3	4.8 ± 3.5	5.0 ± 3.7	0.83
<i>Interoceptive awareness</i>	8.2 ± 6.8	9.3 ± 4.5	8.3 ± 6.6	0.59
<i>Maturity fears</i>	6.3 ± 5.1	4.0 ± 3.8	5.8 ± 4.3	0.26
<i>Asceticism</i>	5.3 ± 3.3	5.9 ± 2.9	5.5 ± 3.3	0.65
<i>Impulse Regulation</i>	5.5 ± 6.2	5.8 ± 4.6	7.2 ± 4.6	0.04
<i>Social Insecurity</i>	7.8 ± 3.4	5.1 ± 3.1	7.0 ± 4.0	0.10
BSQ	74.6 ± 34.0	96.2 ± 28.9	101.4 ± 24.3	<0.01
<i>Using laxatives and vomiting in order to reduce body dissatisfaction</i>	5.9 ± 3.9	7.7 ± 3.1	5.3 ± 2.0	0.03
<i>Unsuited cognitions and behaviors in order to control the weight</i>	16.0 ± 7.1	21.5 ± 6.6	19.0 ± 4.7	0.01
<i>Body dissatisfaction compared to the lower parts of the body</i>	32.7 ± 16.9	43.1 ± 13.1	47.2 ± 12.2	<0.01
<i>Social avoidance and shame of the exposure of the body</i>	19.9 ± 8.2	23.9 ± 10.4	30.0 ± 8.6	<0.001
HAD				
<i>Anxiety</i>	11.3 ± 4.6	12.3 ± 4.3	10.5 ± 4.6	0.17
<i>Proven anxiety (Score > 11)</i>	68%	81%	49%	
<i>Depression</i>	8.4 ± 4.2	7.9 ± 4.1	8.1 ± 4.3	0.79
<i>Proven depression (Score > 11)</i>	29%	72%	31%	

BMI: Body Mass Index; EDI-2: Eating Disorder Inventory; BSQ: Body Shape Questionnaire; HAD: Hospital anxiety and depressive scale; Mean ± SD. The significant differences are in bold.

No significant differences in the EDI-2 total score among the three ED forms were found. However, the sub-items of EDI-2 body dissatisfaction and impulse regulation were significantly higher in C patients than R and B patients. As expected, bulimia was significantly higher in B groups compared to others (Table 1).

The total BSQ and each sub item were significantly higher in the C group than in the R and B groups (Table 1).

3.2. Peptide Concentrations

Plasma concentrations of the anorexigenic hormones leptin, insulin, GLP-1, and PYY were higher in C compared to R patients (Figure 1). In contrast, α -MSH, des-acyl ghrelin, and acyl-ghrelin concentrations were higher in R compared to C patients (Figure 1). Statistical comparisons for non-adjusted and adjusted data are presented in Table 2. Adjustment on age and sex did not notably change the level of statistical significance. After additional adjustment on BMI, peptide concentrations were no longer statistically different.

Table 2. Linear models explaining peptide concentrations associated with food intake according to different adjustments.

Peptides Conc.	Restrictive vs. Compulsive * Unadjusted Models	<i>p</i> **	Restrictive vs. Compulsive * Adjusted Models 1 †	<i>p</i> **	Restrictive vs. Compulsive * Adjusted Models 2 ‡	<i>p</i> **
Leptin	−51.3 [−58 to −44.5]	<0.0001	−51.8 [−59.1 to −44.5]	<0.0001	−11.1 [−22.3 to 0]	1.00
Insulin	−39.1 [−48.5 to −29.8]	<0.0001	−35.8 [−45.7 to −25.9]	<0.0001	−19.8 [−38.9 to −0.8]	0.96
GLP-1	−17.6 [−28.7 to −6.5]	0.05	−17.8 [−29.7 to −5.8]	0.09	−10.3 [−33.6 to 13]	1.00
PYY	−15.9 [−27.3 to −4.5]	0.15	−18.1 [−30.4 to −5.8]	0.10	−21.6 [−45.6 to 2.4]	1.00
α -MSH	10.8 [−0.8 to 22.5]	1.00	16.2 [3.9 to 28.5]	0.23	24.2 [0.3 to 48.1]	1.00
Des-acyl ghrelin	29.2 [18.8 to 39.6]	<0.0001	29 [18.2 to 39.8]	<0.0001	14.4 [−6.4 to 35.2]	1.00
Acyl ghrelin	25.7 [14.9 to 36.5]	0.0002	25.7 [14.3 to 37.1]	0.0004	14.6 [−7.4 to 36.7]	1.00

* Interpretable as a difference of percentile means of the considered value; ** *p*-value adjusted by the Bonferroni method on the 23 comparisons (between all biological studied factors); † adjusted on age (linear effect) and sex; ‡ adjusted on age (linear effect), sex, and BMI (linear effect).

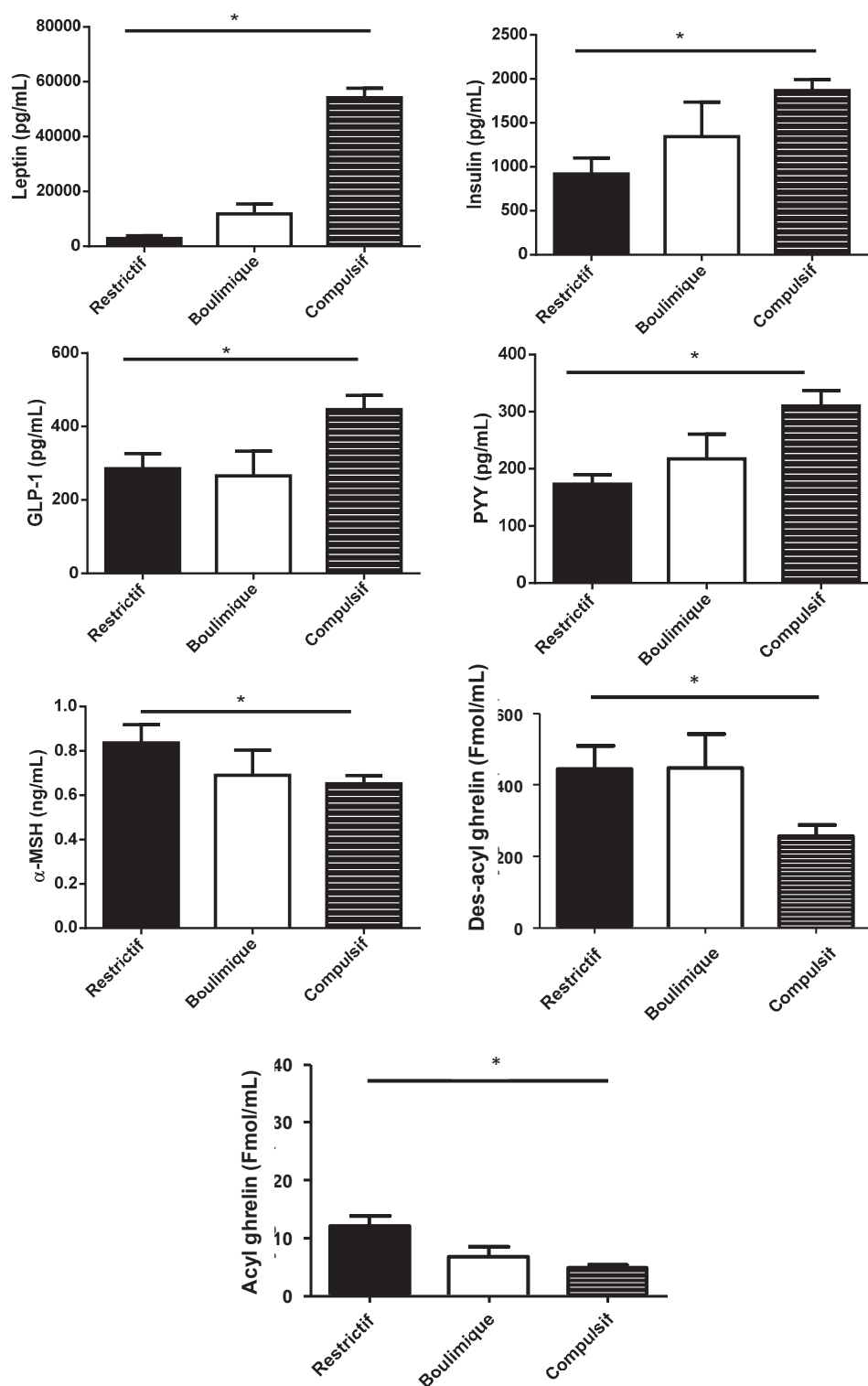


Figure 1. Plasma concentration of peptides associated with food intake according to broad categories of ED. * Significance after adjustment on age and sex. The standard deviation is represented by the error bar.

3.3. Immunoglobulin Concentrations and Affinity

The concentrations of free and bound IgG were measured. Since the level of free IgG is much lower than the concentration of bound IgG (four times, except for anti-ClpB IgG) and since no significant difference was found for free IgG among ED groups, the results were presented as total IgG.

Except for the anti-DAG IgG, all IgG profiles are broadly similar, i.e., a lower rate in bulimic patients compared to the other two groups (Figure 2).

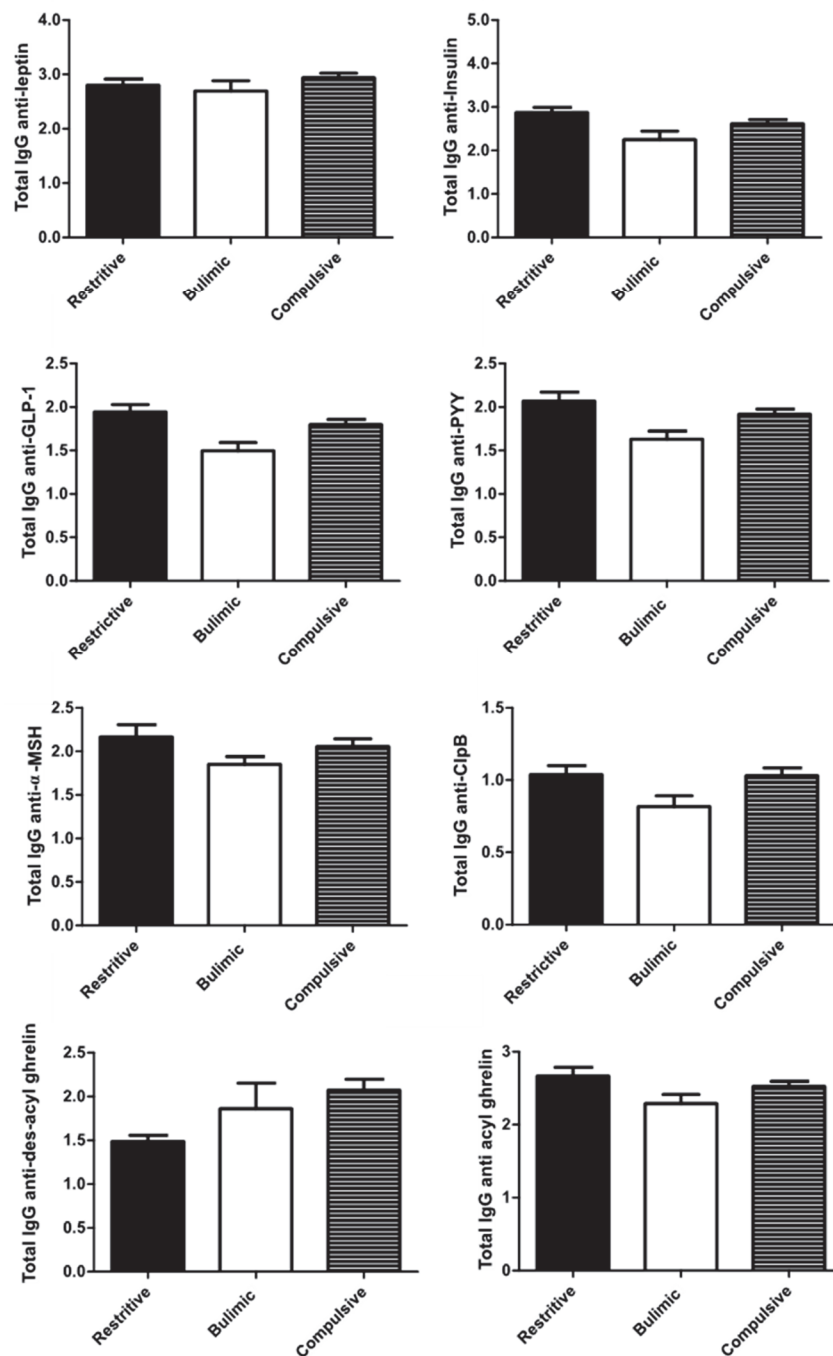


Figure 2. Total plasma IgG against peptides associated with food intake according to broad categories of ED. The standard deviation is represented by the error bar.

With or without adjustment, there was no significant difference between the concentrations of different IgGs among C and R patients (Table 3).

Table 3. Linear models explaining plasma IgG concentrations of peptides associated with food intake according different adjustments.

	Plasma Anti-Peptide IgG/ Kd	Restrictive vs. Compulsive * Unadjusted Models	<i>p</i> **	Restrictive vs Compulsive Adjusted Models 1 †	<i>p</i> **	Restrictive vs Compulsive * Adjusted Models 2 ‡	<i>p</i> **
Plasma anti-peptide IgG	Anti-leptin	−6.5 [−18.2 to 5.2]	1.00	−8.5 [−21.1 to 4.2]	1.00	−17.6 [−42.2 to 7]	1.00
	Anti-insulin	8 [−3.5 to 19.5]	1.00	7.8 [−4.4 to 19.9]	1.00	0.2 [−23.4 to 23.9]	1.00
	Anti-GLP-1	10.1 [−1.3 to 21.5]	1.00	10.1 [−2 to 22.2]	1.00	−0.7 [−24.2 to 22.9]	1.00
	Anti-PYY	5.9 [−5.6 to 17.5]	1.00	3.5 [−8.9 to 15.8]	1.00	−5.9 [−30 to 18.1]	1.00
	Anti-α-MSH	4.3 [−7.3 to 15.9]	1.00	−0.7 [−12.8 to 11.5]	1.00	−1.1 [−24.9 to 22.7]	1.00
	Anti-Acyl ghrelin	4.1 [−7.5 to 15.7]	1.00	−0.2 [−12.5 to 12.2]	1.00	−12.9 [−37 to 11.1]	1.00
	Anti-Des-acyl ghrelin	−9.3 [−21 to 2.3]	1.00	−10 [−22.6 to 2.6]	1.00	−5.2 [−29.7 to 19.3]	1.00
	Anti-ClpB	4.9 [−6.6 to 16.4]	1.00	6.8 [−5.6 to 19.1]	1.00	5.1 [−19 to 29.1]	1.00
Kd of plasma IgG	Anti-leptin	−5.5 [−17.2 to 6.3]	1.00	−6.5 [−19.2 to 6.2]	1.00	−18.3 [−43 to 6.4]	1.00
	Anti-insulin	−6 [−17.7 to 5.8]	1.00	−6.9 [−19.6 to 5.7]	1.00	−11.4 [−36.2 to 13.4]	1.00
	Anti-GLP1	−5.4 [−17.1 to 6.3]	1.00	−4.2 [−16.9 to 8.5]	1.00	−9 [−33.8 to 15.7]	1.00
	Anti-PYY	−5.6 [−17.3 to 6.2]	1.00	−4.9 [−17.5 to 7.8]	1.00	−7.5 [−32.2 to 17.2]	1.00
	Anti-α-MSH	0.5 [−11.2 to 12.3]	1.00	0.9 [−11.7 to 13.5]	1.00	9.3 [−15.2 to 33.9]	1.00
	Anti-Acyl ghrelin	13.9 [2.4 to 25.5]	0.42	13.1 [0.6 to 25.5]	0.92	16.7 [−7.7 to 41]	1.00
	Anti-des-acyl ghrelin	−3.6 [−15.3 to 8.2]	1.00	−4.7 [−17.3 to 8]	1.00	−6.1 [−30.8 to 18.7]	1.00
	Anti-ClpB	15.8 [4.3 to 27.2]	0.17	16.4 [4 to 28.8]	0.23	0.2 [−23.7 to 24.1]	1.00

* Interpretable as a difference of percentile means of the considered value; ** *p*-value adjusted by the Bonferroni method on the 23 comparisons (between all biological studied factors); † adjusted on age (linear effect) and sex; ‡ adjusted on age (linear effect), sex, and BMI (linear effect). Statistically significant results are in bold.

The affinity profiles among the three broad categories of TCA were different according to IgG (Figure 3). Before adjustment, the affinity of anti-acyl ghrelin and anti-CipB IgGs was significantly lower in the R group compared to the C group (Table 3). Adjustment on age and sex did not change the results, whereas after adjustment on the BML, the affinity difference among the C and R group was no longer significant.

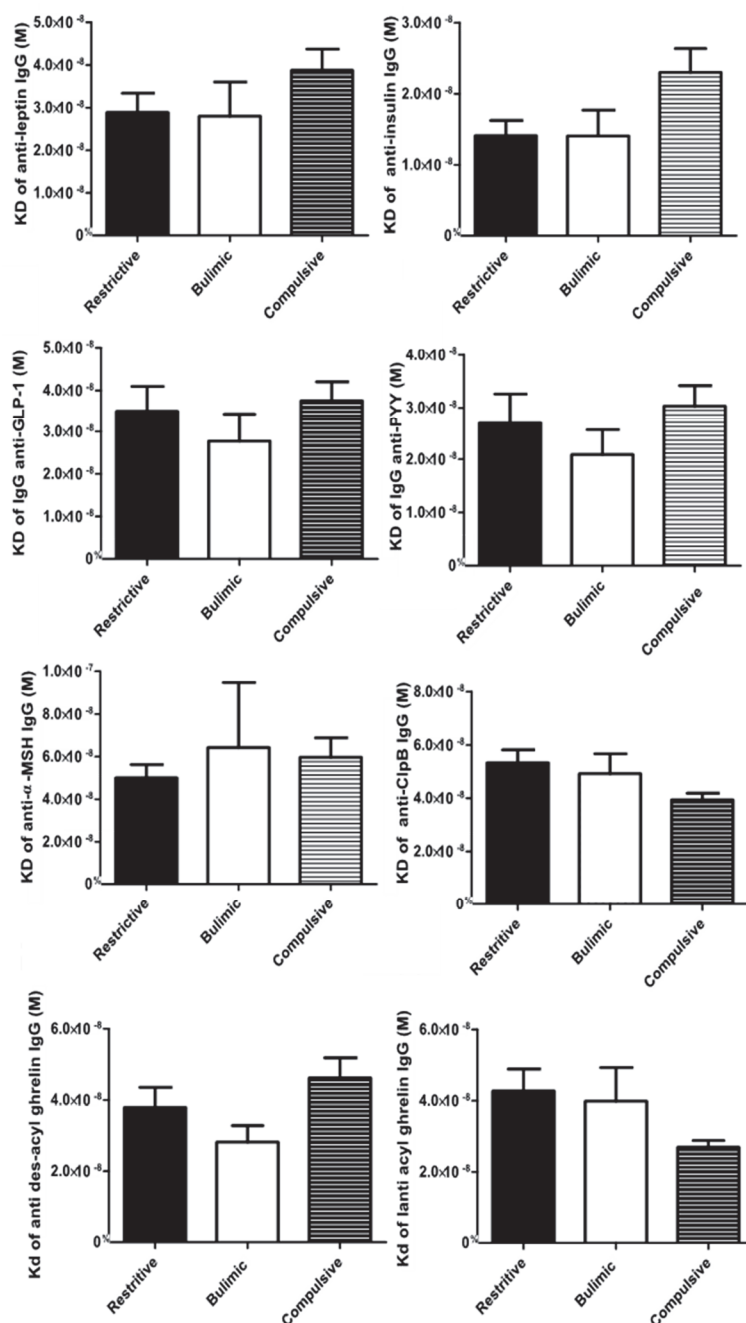


Figure 3. Affinity of plasma IgG against peptides associated with food intake according to broad categories of ED. The standard deviation is represented by the error bar.

3.4. Association between Biological Data/Principal Component Analyses (PCAs)

The correlogram (Figure 4) showed that IgG concentrations had weak to medium correlations with each other. The same was observed for the affinities of various IgG. On the other hand, the

affinities and concentrations of the IgG were not correlated. Finally, peptide concentrations had weak positive and negative correlations with each other (Figure 4).

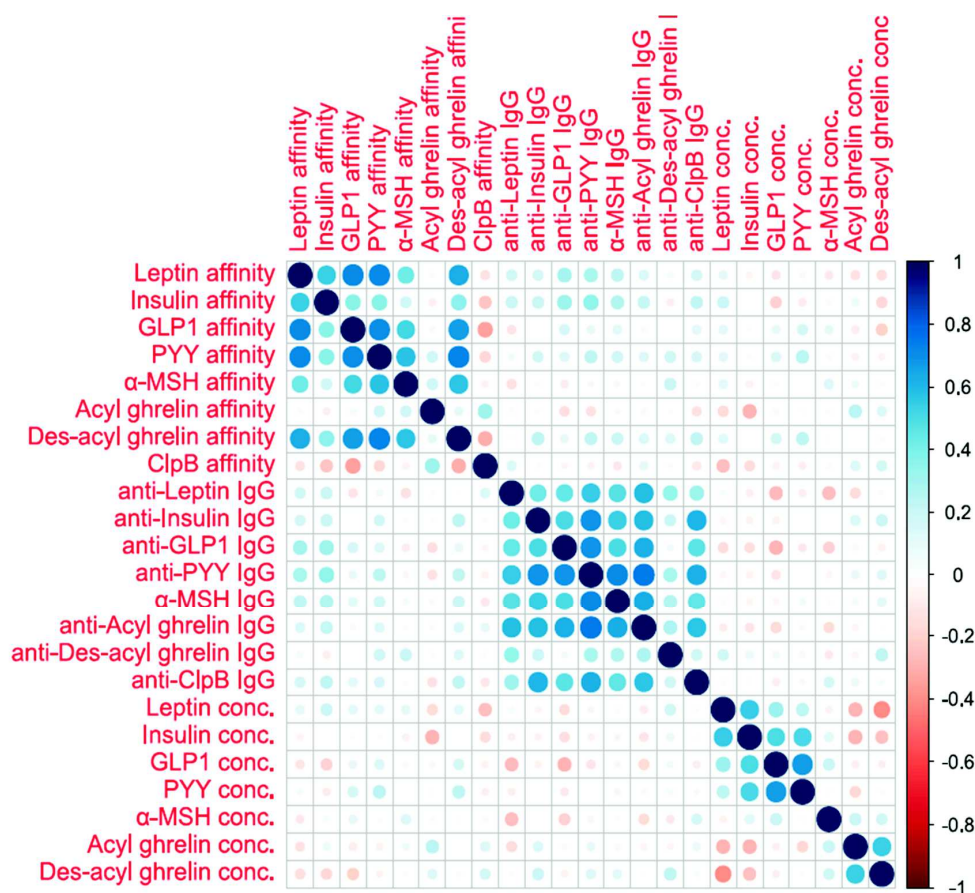


Figure 4. Correlogram representing all the correlations between the studied biological variables.

The first principal component of the principal component analysis (PCA) of IgG concentrations explained 56% of the variance of all IgG concentrations, which was considered acceptable to use the first principal component as a new variable for analysis. Variance explained by the first principal component of IgG affinities explained 48% of the variance, but the explained variance for peptide concentrations (38%) was considered as too low for analysis as the variance explained by chance assuming no correlation between concentrations was 20%.

Therefore, the PCAs allowed construction of two variables respectively representing the IgG concentration and their affinity.

The first principal component of the IgG concentration was expressed as the following linear combination:

$$0.36 \times \text{Leptin IgG conc} + 0.38 \times \text{Insulin IgG conc} + 0.37 \times \text{GLP1 IgG conc} + 0.45 \times \text{PYY IgG conc} + 0.40 \times \alpha\text{-MSH IgG conc} + 0.43 \times \text{Acylghrelin IgG conc} + 0.19 \times \text{Desacylghrelin IgG conc}.$$

The first principal component of the IgG affinity was expressed as the following linear combination:

$$0.36 \times \text{Leptin IgG KD} + 0.38 \times \text{Insulin IgG KD} + 0.37 \times \text{GLP1 IgG KD} + 0.45 \times \text{PYY IgG KD} + 0.40 \times \alpha\text{-MSHIgG KD} + 0.43 \times \text{Acylghrelin IgG KD} + 0.19 \times \text{Desacylghrelin IgG KD}.$$

The first component of the IgG concentrations was not significantly increased in R patients compared to C patients, without adjustment (+4.3, 95% CI: -7.2 to +15.8, $p = 0.92$ on the percentile scale) and with adjustment on age, sex, and BMI (-6.8, 95% CI: -30.7 to +17.0, $p = 1.00$). The first component of IgG affinities was not significantly decreased in R patients compared to C patients,

without adjustment (−5.9, 95% CI: −17.6 to 5.8, $p = 0.64$ on the percentile scale) and with adjustment on age, sex, and BMI (−5.7, 95% CI: −30.4 to +19, $p = 1.00$).

3.5. Association between Clinical and Biological Data

Unadjusted correlations of clinical variables to biological variables showed a significant correlation between leptin concentration and BSQ ($p = 0.0007$ after multiple testing correction for 92 tests). An increase in 100 percentiles of BSQ was associated to an increase of 39.6 (95% CI: 22.8 to 56.3) percentiles of leptin without adjustment. After adjustment on age, sex, and ED subtype, no association was significant. After further adjustment on BMI, no association was significant (all p -values > 0.10)

The analysis of correlations between the clinical variables and the first components of IgG concentrations and affinities PCAs showed no significant correlation without adjustment or with adjustment.

4. Discussions

This study provides for the first time a comprehensive pattern of peptides and their plasma IgG concentrations in three groups of untreated patients with well-characterized ED (Figure 5). In terms of prevalence, the population included is fairly representative of the usual clinical population, with R, B, and C patients accounting for 29%, 10%, and 61% of the recruitment. The C disorders prevail over R and B in accordance with previous prevalence studies, and this case mix is close to the estimation of the prevalence of ED in France [31]. Most interestingly, all these patients were included before the initiation of care in the Rouen University Hospital, and may thus be considered as “naive” patients, which prevents from bias related to previous therapeutic interventions. However, a few patients in each group did receive some non-specific symptomatic treatments, such as anxiolytics (mainly benzodiazepins) or spasmolytics (e.g., phloroglucinol) for abdominal discomfort, which is commonly associated to ED.

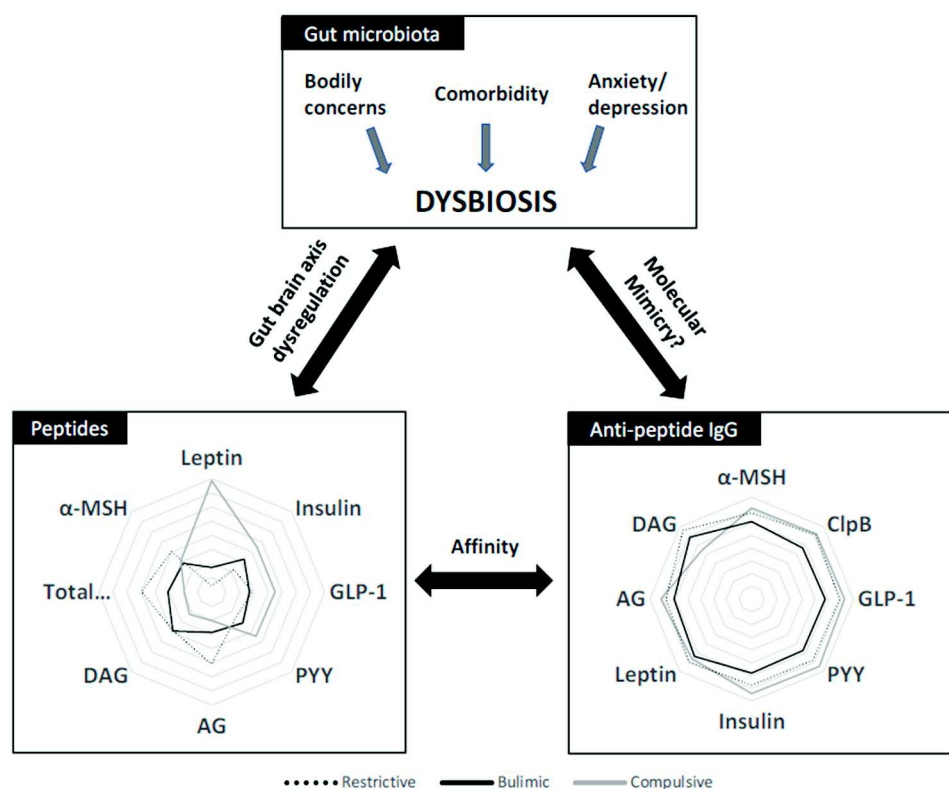


Figure 5. Interaction between gut microbiota, peptides, and immunoglobulin G concentrations in broad categories of ED (restrictive, bulimic, and compulsive).

The mean interval between the onset of disease and the first specialized consultation was 5, 7, and 10 years for the R, B, and C group, respectively, and patients with C were older than in patients of other groups. This is a common finding that the severity and the earlier onset in the life of R and B disorders lead to a referral for care at a younger age and conversely for C patients [32].

In this study, patient plasma was collected in the morning in the fasting state. In addition, a statistical test analyzing the results of the plasma analyses according to the time of collection (between 8 and 11 a.m.) was performed and showed no significant difference.

In humans, obesity is associated with an increase in leptin concentrations, suggesting that leptin signaling is impaired. In our cohort, the leptin concentration was higher in C patients compared to R ones. As expected, this difference was no longer significant after adjustment on BMI and it is impossible to determine the influence of BMI regardless of the diagnostic group. In fact, BMI is a clinical parameter that generally facilitates the diagnosis (and reflects the patient's ED form). Resistance to leptin in C patients could thus be induced by weight gain and therefore by hyperphagia. This may be related to a change in its transport at the blood–brain barrier, leading to ongoing ingestion of rewarding foods, and reinforcing the addictive hyperphagic behaviors [33,34].

GLP-1 and PYY are secreted by the endocrine cells of the proximal small intestine and distal small intestine during the passage of nutrients [35–37]. These two peptides induce delayed gastric emptying and satiety signaling [38]. The concentrations of both were increased in the C group compared to the R group, suggesting resistance to these peptides in these patients, as previously reported in obese and binge-eating patients [39]. Binge eating is characterized by massive ingestion of high-fat and high-sugar food, which may stimulate an increased release of PYY and GLP-1 by endocrine cells either directly, by a nutrient effect, or indirectly [21,40] with the induction of dysbiosis and the overstimulation of endocrine cells by microbiota-derived signals.

Increase of plasma insulin in response to food intake, mostly glucose and some amino acids, also contributes to the signaling of satiety acting at the hypothalamic level [41], as evidenced by the reduction of food intake after an intracerebroventricular injection of insulin. The increased insulin plasma concentrations observed in C patients in the present study could result from two additive mechanisms: The direct endocrine response to massive carbohydrate ingestion and the reduced central clearance of insulin resulting from downregulation of insulin receptors' expression in the hypothalamus [42] in response to repeated bingeing [43].

Only few studies have reported plasma concentrations of α -MSH during ED, limiting the knowledge on these biological changes in AN [44,45]. Circulating α -MSH may be from peripheral or central origin. One study showed a decrease in the plasma α -MSH concentration in AN compared to controls all along the day [44] while another study reported no significant difference among AN and controls [45]. In the physiological situation, α -MSH is secreted by the activation of POMC neurons in the arcuate nucleus by some signals, such as leptin, an increased leptin concentration signaling replenishment of energy stores leads to increased POMC expression, and α -MSH release, which finally reduces food intake [46]. For the first time, our results show a comparison of plasma α -MSH concentrations among the three main groups of ED and no significant difference was found among ED. In rats, repeated exposure to mild stress increased the concentrations and affinity of α -MSH-reactive IgG that could modify α -MSH signaling [22]. In another study, anti α -MSH IgG concentrations decreased during gut mucositis in rats, a model associated with prolonged anorexia [47]. Different types of stress may have different effects on the anti-MSH IgG concentration. In the present study, we observed no significant difference in the anti- α -MSH IgG concentrations and their affinity among the three groups. This is in agreement with another report from our group comparing anti-MSH IgG concentrations among AN, BN, and BED (DSM-IV) patients [48]. It is worth discussing if some bacterial signaling molecules may contribute to the induction of satiety in a way that is similar to endogenous α -MSH. Indeed, a part of the ClpB protein produced by Enterobacteriaceae, such as *E. coli* or *H. alvei*, presents a molecular mimicry with α -MSH, which can reduce food intake in rodents. In a preliminary study, plasma ClpB concentrations were increased in patients with ED as compared to controls, but

without differences among AN, BN, and BED [21]. In this same study, no significant difference was observed for anti-ClpB Ig among groups. In the present study, in well-defined groups of naïve patients from a single center, we observed increased anti-ClpB Ig in R and C patients as compared to B. In addition, the affinity of anti-ClpB Ig was increased in C as compared to R patients. This may contribute to blunting the satiating effect of ClpB in C patients by limiting the binding of this peptide on its receptor, and also limit the effect of α -MSH by cross-reaction between this peptide and anti-ClpB Ig.

Several studies have reported increased total ghrelin concentrations during AN while it is reduced during BED. In our study, we confirmed the increased total ghrelin in R patients as compared to B and C groups. Interestingly, both AG and DAG concentrations were increased in R patients, and DAG accounted for 96% of total ghrelin, which confirms a previous study where AG concentration represented only 2–5% of total ghrelin in rodents and 10% in humans. DAG may act both as a direct inhibitor of AG and also by decreasing plasma AG concentration. The acylation of ghrelin may be modulated by the diet [49,50], especially by lipid intake; indeed, a high consumption of medium-chain fatty acids increased the AG concentration [51]. Thus, during restrictive ED, the limitation of energy intake may elicit increased ghrelin secretion and may simultaneously impair the activity of ghrelin O acyl transferase (GOAT), resulting in an increased proportion of DAG, and finally to a resistance to the effect of AG perpetuating reduced food intake. Some previous studies in the literature have shown that modulation of the signaling of ghrelin would be possible through Ig. In a former study in a small group of patients with AN, anti-AG IgG was decreased as compared to healthy volunteers while anti-DAG IgG was not different [52]. Another study reported similar results [53]; the affinity of anti-AG IgG was decreased in AN patients compared to obese [53,54]. Increased affinity of anti-AG IgG in obese patients was associated with in vitro protection of ghrelin and potentiation of its orexigenic effect after passive transfer in mice [53]. In this study, the affinity of anti-AG IgG tended to be lower in the R than C group, which could limit AG protection and reduce its orexigenic effect. It looks unlikely that the anti-DAG IgG concentration influences the biological actions of DAG, since DAG is found mainly in the unbound form in AN as well as obese patients and in controls [53]. Thus, elevated DAG by itself, regardless of Ig, may play a key role in the perpetuation of reduced food intake.

No significant difference in the concentrations of the different IgGs against peptides on food intake was found. However, the correlogram underlines an association between the concentrations of the different IgGs (except for anti-DAG IgG), which may mean that IgG concentrations altogether may reflect the presence of an ED. For logistic and regulatory reasons, the inclusion of healthy volunteers in the EDILS study started after the inclusion of ED patients. The future comparison of a larger group of patients to healthy volunteers paired on age, sex, and BMI (in the case of B patients) will determine whether an increase or decrease in IgG concentrations is representative of the change in eating behavior or only modifications of body mass.

Indeed, all patients in the present study displayed high anxiety and depressive HAD scores, with a mean total HAD score of 19 as compared to the usual value of 8.4 in the general population [55]. Similarly, EDI-2 scores in our ED patients ranged between 73 and 86 while the usual score in the general population is around 33.5 [56]. Finally, the mean BSQ score in the C group (101) was higher than the mean of 74.5 reported in the general population [57]. Bodily dissatisfaction is tightly correlated with low self-esteem in women [58] and also promotes depressive behavior [59]. Thus, EDs are tightly associated with anxiety, depression, and bodily dissatisfaction, which are comorbidities well known to have an important link with intestinal dysbiosis, suggesting that the comorbidities associated with ED might be at the origin or the intricate consequences of dysbiosis altering peptide signaling directly or via the modulation of IgG [12,60].

Before closing, a limitation of our manuscript should be mentioned. In particular, in the present study, we evaluated the circulating levels of gut peptides in a single time-point. As demonstrated in medical literature [61–63], the altered secretion in eating disorders should be investigated dynamically with more time-points. Nevertheless, as specified in our protocol, the sampling conditions were strictly standardized: The patient's blood sample was drawn at 08.00–11.00 a.m. after an overnight fast. In

addition, we found no statistical association between circulating levels of each gut peptide and the exact time of blood sampling.

At that stage, due to the limited number of patients in the different groups, these results should be considered as preliminary and generate hypotheses that need to be confirmed on a larger study population.

In conclusion, this study provides new information about orexigenic and anorexic peptides and corroborates some previous indication of peptide-altered signaling in different groups of ED. Figure 5 proposes an integrative view of our data on peptides and Ig in the different groups of ED studied. Although differences in the peptide concentrations exist among ED subtypes, they may be due to the differences in BMI. In some but not all instances, we can speculate that ED- or BMI-related peptide-resistance patterns are related to the modulation of the respective IgG concentration or affinity. Further studies are ongoing to establish whether intestinal dysbiosis is implicated in the modulation of the production by the microbiota of peptides or peptide mimetics regulating food intake and eliciting the intestinal or systemic production of anti-peptide IgG. An ongoing recruitment of healthy volunteers in our service opens the perspective of a comparative analysis of these peptides and immunoglobulins with a larger population of ED patients over a wide range of body mass.

Author Contributions: Conceptualization, N.L., P.D., G.L. and R.L.; Formal analysis, M.G. and A.G.; Funding acquisition, P.D. and G.L.; Investigation, M.G.; Methodology, N.L., C.D., M.-A.L.S., J.R., S.A., S.G., G.C., J.D., N.A., V.F., L.B., A.L., A.R., T.S., A.P., M.Q., M.C. and R.L.; Project administration, P.D.; Resources, G.L.; Supervision, P.D. and G.L.; Validation, P.D.; Visualization, M.G.; Writing—original draft, M.G.; Writing—review & editing, N.L., P.D., G.L., R.L. and M.-P.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding

Acknowledgments: The support of TargEDys SA company and the Ministry of Industry and Technology for the funding of MG CIFRE thesis contract is acknowledged and the support of European Union and Normandie Regional Council. Europe gets involved in Normandie with European Regional Development Fund (ERDF).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest

Abbreviations

α -MSH	alpha-Melanocyte-stimulating hormone
AN	Anorexia nervosa
BN	Bulimia nervosa
BED	Binge eating disorder
BSQ	Body Shape Questionnaire
ED	Eating Disorder
EDI-2	Eating Disorder Inventory
HAD	Hospital Anxiety and Depression
IgG	Immunoglobulin G
OSFED	Other Specified Feeding or Eating Disorders
UFED	Unspecified Feeding or Eating Disorders

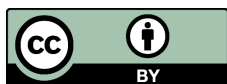
References

- Schmidt, U.; Adan, R.; Böhm, I.; Campbell, I.C.; Dingemans, A.; Ehrlich, S.; Elzackers, I.; Favaro, A.; Giel, K.; Harrison, A.; et al. Eating disorders: The big issue. *Lancet Psychiatry* **2016**, *3*, 313–315. [[CrossRef](#)]
- Galmiche, M.; Déchelotte, P.; Lambert, G.; Tavolacci, M.P. Prevalence of eating disorders over the 2000–2018 period: A systematic literature review. *Am. J. Clin. Nutr.* **2019**, *109*, 1402–1413. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mitchison, D.; Morin, A.; Mond, J.; Slewa-Younan, S.; Hay, P. The Bidirectional Relationship between Quality of Life and Eating Disorder Symptoms: A 9-Year Community-Based Study of Australian Women. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0120591. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cui, H.; Moore, J.; Ashimi, S.S.; Mason, B.L.; Drawbridge, J.N.; Han, S.; Hing, B.; Matthews, A.; McAdams, C.J.; Darbro, B.W.; et al. Eating disorder predisposition is associated with *ESRRA* and *HDAC4* mutations. *J. Clin. Investig.* **2013**, *123*, 4706–4713. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

5. Fairburn, C.G.; Cooper, Z.; Shafran, R. Cognitive behaviour therapy for eating disorders: A “transdiagnostic” theory and treatment. *Behav. Res. Ther.* **2003**, *41*, 509–528. [[CrossRef](#)]
6. Hardaway, J.A.; Crowley, N.A.; Bulik, C.M.; Kash, T.L. Integrated circuits and molecular components for stress and feeding: Implications for eating disorders: Integrated circuits and molecular components. *Genes Brain Behav.* **2015**, *14*, 85–97. [[CrossRef](#)]
7. Stice, E.; Marti, C.N.; Durant, S. Risk Factors for Onset of Eating Disorders: Evidence of Multiple Risk Pathways from an 8-Year Prospective Study. *Behav. Res.* **2011**, *49*, 622–627. [[CrossRef](#)]
8. Ford, E.S.; Zhao, G.; Tsai, J.; Li, C. Low-Risk Lifestyle Behaviors and All-Cause Mortality: Findings From the National Health and Nutrition Examination Survey III Mortality Study. *Am. J. Public Health* **2011**, *101*, 1922–1929. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Smith, P.M.; Ferguson, A.V. Neurophysiology of hunger and satiety. *Dev. Disabil. Res. Rev.* **2008**, *14*, 96–104. [[CrossRef](#)]
10. Williams, K.W.; Elmquist, J.K. From neuroanatomy to behavior: Central integration of peripheral signals regulating feeding behavior. *Nat. Neurosci.* **2012**, *15*, 1350–1355. [[CrossRef](#)]
11. Delhanty, P.P.J.D.; Neggers, B.S.J.C.M.M.; van der Lely, A.-J.A.-J. Ghrelin: The differences between acyl- and des-acyl ghrelin. *Eur. J. Endocrinol.* **2012**, *167*, 601–608. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Fetissov, S.O. Role of the gut microbiota in host appetite control: Bacterial growth to animal feeding behaviour. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2017**, *13*, 11–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Littman, D.R.; Pamer, E.G. Role of the Commensal Microbiota in Normal and Pathogenic Host Immune Responses. *Cell Host Microbe* **2011**, *10*, 311–323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Atkinson, W. Food elimination based on IgG antibodies in irritable bowel syndrome: A randomised controlled trial. *Gut* **2004**, *53*, 1459–1464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Macpherson, A.J.; Uhr, T. Compartmentalization of the Mucosal Immune Responses to Commensal Intestinal Bacteria. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2004**, *1029*, 36–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Whittingham, S.; Irwin, J.; Mackay, I.R.; Marsh, S.; Cowling, D.C. Autoantibodies in Healthy Subjects. *Australas. Ann. Med.* **1969**, *18*, 130–134. [[CrossRef](#)]
17. Thompson, G.R.; Trexler, P.C. Gastrointestinal structure and function in germ-free or gnotobiotic animals. *Gut* **1971**, *12*, 230–235. [[CrossRef](#)]
18. Fetissov, S.O.; Hallman, J.; Orelund, L.; af Klinteberg, B.; Grenback, E.; Hulting, A.-L.; Hökfelt, T. Autoantibodies against -MSH, ACTH, and LHRH in anorexia and bulimia nervosa patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 17155–17160. [[CrossRef](#)]
19. Fetissov, S.O.; Hamze Sinno, M.; Coquerel, Q.; Do Rego, J.C.; Coëffier, M.; Gilbert, D.; Hökfelt, T.; Déchelotte, P. Emerging role of autoantibodies against appetite-regulating neuropeptides in eating disorders. *Nutrition* **2008**, *24*, 854–859. [[CrossRef](#)]
20. Tennoune, N.; Chan, P.; Breton, J.; Legrand, R.; Chabane, Y.N.; Akkermann, K.; Järv, A.; Ouelaa, W.; Takagi, K.; Ghouzali, I.; et al. Bacterial ClpB heat-shock protein, an antigen-mimetic of the anorexigenic peptide α -MSH, at the origin of eating disorders. *Transl. Psychiatry* **2014**, *4*, e458. [[CrossRef](#)]
21. Breton, J.; Legrand, R.; Akkermann, K.; Järv, A.; Harro, J.; Déchelotte, P.; Fetissov, S.O. Elevated plasma concentrations of bacterial ClpB protein in patients with eating disorders. *Int. J. Eat. Disord.* **2016**, *49*, 805–808. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Sinno, M.H.; Rego, J.C.D.; Coëffier, M.; Bole-Feysot, C.; Ducrotté, P.; Gilbert, D.; Tron, F.; Costentin, J.; Hökfelt, T.; Déchelotte, P.; et al. Regulation of feeding and anxiety by α -MSH reactive autoantibodies. *Psychoneuroendocrinology* **2009**, *34*, 140–149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Jésus, P.; Ouelaa, W.; François, M.; Riachy, L.; Guérin, C.; Aziz, M.; Do Rego, J.-C.; Déchelotte, P.; Fetissov, S.O.; Coëffier, M. Alteration of intestinal barrier function during activity-based anorexia in mice. *Clin. Nutr.* **2014**, *33*, 1046–1053. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Garner, D.M.; Olmstead, M.P.; Polivy, J. Development and validation of a multidimensional eating disorder inventory for anorexia nervosa and bulimia. *Int. J. Eat. Disord.* **1983**, *2*, 15–34. [[CrossRef](#)]
25. Rousseau, A.; Knotter, R.-M.; Barbe, R.-M.; Raich, R.-M.; Chabrol, H. Étude de validation de la version française du Body Shape Questionnaire. *L'Encéphale* **2005**, *31*, 162–173. [[CrossRef](#)]
26. Mykletun, A.; Stordal, E.; Dahl, A.A. Hospital Anxiety and Depression (HAD) scale: Factor structure, item analyses and internal consistency in a large population. *Br. J. Psychiatry* **2001**, *179*, 540–544. [[CrossRef](#)]

27. Walsh, B.T.; Sysko, R. Broad Categories for the Diagnosis of Eating Disorders (BCD-ED): An Alternative System for Classification. *Int. J. Eat. Disord.* **2009**, *42*, 754–764. [[CrossRef](#)]
28. Chelikani, P.K.; Haver, A.C.; Reidelberger, R.D. Comparison of the inhibitory effects of PYY(3-36) and PYY(1-36) on gastric emptying in rats. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2004**, *287*, R1064–R1070. [[CrossRef](#)]
29. Dailey, M.J.; Moran, T.H. Glucagon-like peptide 1 and appetite. *Trends Endocrinol. Metab.* **2013**, *24*, 85–91. [[CrossRef](#)]
30. Fetissov, S.O. Neuropeptide Autoantibodies Assay. In *Neuropeptides*; Merighi, A., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2011; Volume 789, pp. 295–302. ISBN 978-1-61779-309-7.
31. Andreeva, V.A.; Tavolacci, M.-P.; Galan, P.; Ladner, J.; Buscail, C.; Péneau, S.; Galmiche, M.; Hercberg, S.; Déchelotte, P.; Julia, C. Sociodemographic correlates of eating disorder subtypes among men and women in France, with a focus on age. *J. Epidemiol. Community Health* **2019**, *73*, 56–64. [[CrossRef](#)]
32. Volpe, U.; Tortorella, A.; Manchia, M.; Monteleone, A.M.; Albert, U.; Monteleone, P. Eating disorders: What age at onset? *Psychiatry Res.* **2016**, *238*, 225–227. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Banks, W.A. Blood-Brain Barrier as a Regulatory Interface. *Front. Eat. Weight Regul.* **2010**, *63*, 102–110.
34. Meier, U.; Gressner, A.M. Endocrine Regulation of Energy Metabolism: Review of Pathobiochemical and Clinical Chemical Aspects of Leptin, Ghrelin, Adiponectin, and Resistin. *Clin. Chem.* **2004**, *50*, 1511–1525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Gibbons, C.; Caudwell, P.; Finlayson, G.; Webb, D.-L.; Hellström, P.M.; Näslund, E.; Blundell, J.E. Comparison of Postprandial Profiles of Ghrelin, Active GLP-1, and Total PYY to Meals Varying in Fat and Carbohydrate and Their Association With Hunger and the Phases of Satiety. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2013**, *98*, E847–E855. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Murphy, K.G.; Bloom, S.R. Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature* **2006**, *444*, 854–859. [[CrossRef](#)]
37. Williams, D.L.; Baskin, D.G.; Schwartz, M.W. Evidence that Intestinal Glucagon-Like Peptide-1 Plays a Physiological Role in Satiety. *Endocrinology* **2009**, *150*, 1680–1687. [[CrossRef](#)]
38. Steinert, R.E.; Beglinger, C.; Langhans, W. Intestinal GLP-1 and satiation: From man to rodents and back. *Int. J. Obes.* **2016**, *40*, 198–205. [[CrossRef](#)]
39. Culbert, K.M.; Racine, S.E.; Klump, K.L. Hormonal Factors and Disturbances in Eating Disorders. *Curr. Psychiatry Rep.* **2016**, *18*, 65. [[CrossRef](#)]
40. Clarke, G.; Stilling, R.M.; Kennedy, P.J.; Stanton, C.; Cryan, J.F.; Dinan, T.G. Minireview: Gut Microbiota: The Neglected Endocrine Organ. *Mol. Endocrinol.* **2014**, *28*, 1221–1238. [[CrossRef](#)]
41. Bruning, J.C. Role of Brain Insulin Receptor in Control of Body Weight and Reproduction. *Science* **2000**, *289*, 2122–2125. [[CrossRef](#)]
42. Obici, S.; Feng, Z.; Karkanas, G.; Baskin, D.G.; Rossetti, L. Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nat. Neurosci.* **2002**, *5*, 566–572. [[CrossRef](#)]
43. Kullmann, S.; Heni, M.; Veit, R.; Scheffler, K.; Machann, J.; Häring, H.-U.; Fritsche, A.; Preissl, H. Selective Insulin Resistance in Homeostatic and Cognitive Control Brain Areas in Overweight and Obese Adults. *Diabetes Care* **2015**, *38*, 1044–1050. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Galusca, B.; Prévost, G.; Germain, N.; Dubuc, I.; Ling, Y.; Anouar, Y.; Estour, B.; Chartrel, N. Neuropeptide Y and α -MSH Circadian Levels in Two Populations with Low Body Weight: Anorexia Nervosa and Constitutional Thinness. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0122040. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Moriya, J.; Takimoto, Y.; Yoshiuchi, K.; Shimosawa, T.; Akabayashi, A. Plasma agouti-related protein levels in women with anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinology* **2006**, *31*, 1057–1061. [[CrossRef](#)]
46. Nam, S.-Y.; Kratzsch, J.; Wook Kim, K.; Rae Kim, K.; Lim, S.-K.; Marcus, C. Cerebrospinal Fluid and Plasma Concentrations of Leptin, NPY, and α -MSH in Obese Women and Their Relationship to Negative Energy Balance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2001**, *86*, 4849–4853. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Coquerel, Q.; Sinno, M.H.; Boukhattala, N.; Coëffier, M.; Terashi, M.; Bole-Feysot, C.; Breuillé, D.; Déchelotte, P.; Fetissov, S.O. Intestinal inflammation influences α -MSH reactive autoantibodies: Relevance to food intake and body weight. *Psychoneuroendocrinology* **2012**, *37*, 94–106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Lucas, N.; Legrand, R.; Bôle-Feysot, C.; Breton, J.; Coëffier, M.; Akkermann, K.; Järv, A.; Harro, J.; Déchelotte, P.; Fetissov, S.O. Immunoglobulin G modulation of the melanocortin 4 receptor signaling in obesity and eating disorders. *Transl. Psychiatry* **2019**, *9*, 87. [[CrossRef](#)]

49. Al Massadi, O.; Tschöp, M.H.; Tong, J. Ghrelin acylation and metabolic control. *Peptides* **2011**, *32*, 2301–2308. [[CrossRef](#)]
50. Kirchner, H.; Gutierrez, J.A.; Solenberg, P.J.; Pfluger, P.T.; Czyzyk, T.A.; Willency, J.A.; Schürmann, A.; Joost, H.-G.; Jandacek, R.J.; Hale, J.E.; et al. GOAT links dietary lipids with the endocrine control of energy balance. *Nat. Med.* **2009**, *15*, 741–745. [[CrossRef](#)]
51. Nishi, Y.; Hiejima, H.; Hosoda, H.; Kaiya, H.; Mori, K.; Fukue, Y.; Yanase, T.; Nawata, H.; Kangawa, K.; Kojima, M. Ingested Medium-Chain Fatty Acids Are Directly Utilized for the Acyl Modification of Ghrelin. *Endocrinology* **2005**, *146*, 2255–2264. [[CrossRef](#)]
52. Terashi, M.; Asakawa, A.; Harada, T.; Ushikai, M.; Coquerel, Q.; Sinno, M.H.; Déchelotte, P.; Inui, A.; Fetissov, S.O. Ghrelin reactive autoantibodies in restrictive anorexia nervosa. *Nutrition* **2011**, *27*, 407–413. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Takagi, K.; Legrand, R.; Asakawa, A.; Amitani, H.; François, M.; Tennoune, N.; Coëffier, M.; Claeysens, S.; do Rego, J.-C.; Déchelotte, P.; et al. Anti-ghrelin immunoglobulins modulate ghrelin stability and its orexigenic effect in obese mice and humans. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Lucas, N.; Legrand, R.; Breton, J.; Déchelotte, P.; Fetissov, S.O. Increased affinity of ghrelin-reactive immunoglobulins in obese Zucker rats. *Nutrition* **2017**, *39–40*, 98–99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Spinhoven, P.; Ormel, J.; Sloekers, P.P.A.; Kempen, G.I.J.M.; Speckens, A.E.M.; Hemert, A.M.V. A validation study of the Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS) in different groups of Dutch subjects. *Psychol. Med.* **1997**, *27*, 363–370. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Nevenon, L.; Clinton, D.; Norring, C. Validating the EDI-2 in three Swedish female samples: Eating disorders patients, psychiatric outpatients and normal controls. *Nord. J. Psychiatry* **2006**, *60*, 44–50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Ghaderi, A.; Scott, B. Prevalence and psychological correlates of eating disorders among females aged 18–30 years in the general population. *Acta Psychiatr. Scand.* **1999**, *99*, 261–266. [[CrossRef](#)]
58. Furnham, A.; Badmin, N.; Sneade, I. Body Image Dissatisfaction: Gender Differences in Eating Attitudes, Self-Esteem, and Reasons for Exercise. *J. Psychol.* **2002**, *136*, 581–596. [[CrossRef](#)]
59. Paxton, S.J.; Neumark-Sztainer, D.; Hannan, P.J.; Eisenberg, M.E. Body Dissatisfaction Prospectively Predicts Depressive Mood and Low Self-Esteem in Adolescent Girls and Boys. *J. Clin. Child Adolesc. Psychol.* **2006**, *35*, 539–549. [[CrossRef](#)]
60. Dinan, T.G.; Cryan, J.F. Gut–brain axis in 2016: Brain–gut–microbiota axis—Mood, metabolism and behaviour. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *14*, 69–70. [[CrossRef](#)]
61. Rigamonti, A.E.; Cella, S.G.; Bonomo, S.M.; Mancina, G.; Grassi, G.; Perotti, M.; Agosti, F.; Sartorio, A.; Müller, E.E.; Pincelli, A.I. Effect of somatostatin infusion on peptide YY secretion: Studies in the acute and recovery phase of anorexia nervosa and in obesity. *Eur. J. Endocrinol.* **2011**, *165*, 421–427. [[CrossRef](#)]
62. Rigamonti, A.E.; Sartorio, A.; Scognamiglio, P.; Bini, S.; Monteleone, A.M.; Mastromo, D.; Marazzi, N.; Cella, S.G.; Monteleone, P. Different Effects of Cholestyramine on Postprandial Secretions of Cholecystokinin and Peptide YY in Women with Bulimia Nervosa. *NPS* **2014**, *70*, 228–234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Monteleone, P.; Martiadis, V.; Rigamonti, A.E.; Fabrazzo, M.; Giordani, C.; Muller, E.E.; Maj, M. Investigation of peptide YY and ghrelin responses to a test meal in bulimia nervosa. *Biol. Psychiatry* **2005**, *57*, 926–931. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]





Commensal *Hafnia alvei* strain reduces food intake and fat mass in obese mice—a new potential probiotic for appetite and body weight management

Romain Legrand¹ · Nicolas Lucas¹ · Manon Dominique^{1,2,3} · Saida Azhar¹ · Camille Deroissart^{1,2,3} · Marie-Anne Le Solliec^{1,2,3} · Julie Rondeaux^{1,2,3} · Séverine Nobis^{2,3} · Charlène Guérin^{2,3} · Fatima Léon^{3,4} · Jean-Claude do Rego^{3,4} · Nicolas Pons⁵ · Emmanuelle Le Chatelier⁵ · S. Dusko Ehrlich⁵ · Gregory Lambert¹ · Pierre Déchelotte^{1,2,3,6} · Sergueï O. Fetissov^{1,2,3,7}

Received: 27 April 2019 / Revised: 2 December 2019 / Accepted: 11 December 2019 / Published online: 7 January 2020
© The Author(s) 2020. This article is published with open access

Abstract

Background/objectives Based on the recent identification of *E. coli* heat shock protein ClpB as a mimetic of the anorexigenic α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH), the objective of this study was to preclinically validate *Hafnia alvei*, a ClpB-producing commensal bacterium as a potential probiotic for appetite and body weight management in overweight and obesity.

Methods The involvement of enterobacterial ClpB in the putative anti-obesity effects was studied using ClpB-deficient *E. coli*. A food-grade *H. alvei* HA4597 strain synthesizing the ClpB protein with an α -MSH-like motif was selected as a candidate probiotic to be tested in *ob/ob* and high-fat diet (HFD)-fed obese and overweight mice. The relevance of the enterobacterial ClpB gene to human obesity was studied by in silico analysis of fecal metagenomes of 569 healthy individuals from the “MetaHIT” database.

Results Chronic per os administration of native but not ClpB-deficient *E. coli* strain reduced body weight gain ($p < 0.05$) and daily meal frequency ($p < 0.001$) in *ob/ob* mice. Oral gavage of *H. alvei* for 18 and 46 days in *ob/ob* and HFD-fed obese mice, respectively, was well tolerated, reduced body weight gain and fat mass in both obesity models ($p < 0.05$) and decreased food intake in hyperphagic *ob/ob* mice ($p < 0.001$). Elevated fat tissue levels of phosphorylated hormone-sensitive lipase were detected in *H. alvei*-treated *ob/ob* mice ($p < 0.01$). Enterobacterial ClpB gene richness was lower in obese vs. non-obese humans ($p < 0.0001$) and correlated negatively with BMI in genera of *Enterobacter*, *Klebsiella* and *Hafnia*.

Conclusions *H. alvei* HA4597 strain reduces food intake, body weight and fat mass gain in hyperphagic and obese mice. These data combined with low enterobacterial ClpB gene abundance in the microbiota of obese humans provide the rationale for using *H. alvei* as a probiotic for appetite and body weight management in overweight and obesity.

These authors contributed equally: Romain Legrand, Nicolas Lucas

These authors jointly supervised this work: Pierre Déchelotte, Sergueï O. Fetissov

Supplementary information The online version of this article (<https://doi.org/10.1038/s41366-019-0515-9>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Gregory Lambert
glambert@targedys.com

✉ Sergueï O. Fetissov
Serguei.Fetissov@univ-rouen.fr

Extended author information available on the last page of the article

Introduction

The etiology of obesity is multifactorial, with the genetic predisposition playing a key role including both the human genome and the metagenomes of multiple microorganisms constituting the body microbiota inhabiting various epithelial surfaces [1]. The gut microbiota is the principal source of bacteria, viruses and fungi in the body with the number of bacteria approximately equal to the total number of human cells [2]. The composition of the gut microbiota changes rapidly due to diet and is influenced by age, sex, geographical location and drugs such as antibiotics [3, 4]. The altered composition of the gut microbiota in obesity has been well documented; its transfer in experimental animals

was accompanied by the transfer of an obesity phenotype providing proof of its causal role in obesity pathogenesis [5, 6]. Inversely, a healthy microbiota contribute to the regulation of various physiological processes including the regulation of feeding behavior [7].

It is hence conceivable that the restoration of a healthy microbiota or a modulation of its composition aimed at increasing beneficial bacterial species may represent a strategy for appetite and body weight management in obesity [8]. However, several recent papers reviewed the limited efficiency of traditional probiotic bacteria of the *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in obesity [9, 10]. A new generation of probiotics should be developed based on the analysis of the gut microbiota composition and a better understanding of the mechanisms of action of commensal bacteria on the host [11]. In this study, we used the recently generated data of specific bacteria-host communication to develop a new potential probiotic for appetite and body weight management in obesity.

The key underlying finding was the identification of *E.coli* heat shock protein ClpB as an antigen-mimetic of the anorexigenic α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH) [12]. Unexpectedly, the same study showed that oral gavage to lean mice with *E.coli* native but not ClpB-deficient strains decreased their food intake and body weight, suggesting a key role of the ClpB in the anorexigenic effect of *E.coli*. Considering the key role of α -MSH-mediated melanocortin signaling system in the regulation of energy balance, exemplified by marked hyperphagia and obesity in its deficient states in both rodents and humans, the α -MSH mimetic properties of bacterial ClpB suggest that commensal bacteria producing similar with the *E.coli* ClpB protein, may be used as an anti-obesity probiotic [13–15].

Thus, the objectives of this study were to demonstrate the relevance of ClpB protein in potential anti-obesity effects of ClpB expressing bacteria and to preclinically validate *Hafnia alvei* (*H.alvei*) a food-grade, commensal specie of the *Hafniaceae* (formerly *Enterobacteriaceae*) family as a putative anti-obesity probiotic [16]. For this purpose, the presence of α -MSH mimetic epitopes in the ClpB protein of the *H.alvei* HA4597 strain was analyzed using both in silico and proteomic approaches. Then, we tested *H.alvei* HA4597 in two mouse models of obesity: genetic, leptin-deficient *ob/ob* mice and nutritional, high-fat diet (HFD)-induced obesity. The complementarity of these models is related to the hyperphagia and severe obesity with a standard chow consumption in *ob/ob* mice combined with moderate obesity in otherwise normo-/hypophagic HFD-fed mice as a model of nutritionally induced overweight. In addition, to test the relevance of ClpB to the anti-obesity effects, in a separate experiment, ClpB-expressing and ClpB-deficient bacteria were supplied to *ob/ob* mice. Finally, to further justify the rationale for supplementation

of ClpB-expressing probiotic in humans, we performed in silico analysis of the metagenomes from the human fecal microbiota samples of 569 healthy individuals available from the database of the MetaHIT consortium [17] and in which the prevalence of the *E.coli* ClpB gene was analyzed in relation to BMI and obesity.

Materials and methods

Animals

Animal experiments were approved by the Local Ethical Committee of Normandy (approval N5986). All mice were purchased from Janvier Labs (L'Arbresle, France); they were housed in a specialized animal facility (22 ± 2 °C, relative humidity $40 \pm 20\%$) under a 12 h light (7:00 a.m.–7:00 p.m.)/12 h dark cycle. Mice were kept in standard plastic cages ($n = 3$ per cage) with ad libitum food (3430 Kliba Nafag standard diet, Kaiseraugst, Switzerland, unless exposed to an HFD) and water access. B6.V-Lep *ob/ob* JRj mice ($n = 75$) and C57 Bl/6 JRj mice ($n = 70$) both males were 6 weeks of age at arrival. After acclimation for 7 days, C57Bl/6 mice had *ad libitum* access to an HFD with the following caloric content: 45% fat, 35% carbohydrates, and 20% proteins (D12451, Research Diets, New Brunswick, NJ, USA) for 19 weeks. Food intake per cage and individual body weight were measured daily. For the study of the effects of ClpB-deficient *E.coli* strain on feeding behavior, after 7 days of acclimation *ob/ob* mice were placed in individual BioDAQ cages (Research Diets).

Experimental procedures in mice

For the study of the ClpB-deficient *E.coli* K12 effects, *ob/ob* mice were randomly divided into three groups ($n = 8$ of each) with the same mean body weight. Sample size was estimated based on previous experiments [12]. One group received the *E.coli* K12 native strain and another group the *E.coli* K12 ClpB-deficient strain; both strains were received in LB medium and the control group received LB medium only via intragastric gavage as described below for *H.alvei*. The experimental procedure was alike the one described above but mice were kept in individual BioDAQ cages. The *E.coli* strains and culture conditions have been previously described [12].

For the study of *H.alvei* HA4597 effects, both *ob/ob* and C57Bl6 mice with obesity induced by HFD were randomly divided into two groups *ob/ob* ($n = 12$, in each) and HFD ($n = 22$ in each) with the same mean body weight. Randomization was performed by each cage of three so that the animals from the same cage belonged to the same group. From day 1 onwards, mice received once daily at 6:00 p.m.

H.alvei HA4597 cultured strain in LB medium or LB medium (control group) in a volume of 10 mL/kg, via intragastric gavage using a steel drenching cannula (Socorex, Ecublens, Switzerland). Before the gavage, individual body weight and food & water intakes (by cage) were measured. Abnormal symptoms and behavior (sickness and aggressiveness) were monitored and if they occurred, such animals were removed from the study. Body composition was analyzed using the MiniSpec LF50 (Bruker, Rheinstetten, Germany) before and at the end of the treatment (day 18 for *ob/ob* and day 46 for HFD mice). Then, mice were terminally anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine/xylazine solution (80/10 mg/kg) and a blood sample (~0.5 mL) was taken via abdominal aorta puncture in aprotinin EDTA (1 mg/mL) containing tubes (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, USA). The tubes were centrifuged at $1500 \times g$ during 20 min, and plasma samples were stored at -80°C . The following tissues were dissected and snap-frozen in liquid nitrogen prior to storage at -80°C : hypothalamus, epididymal fat pads, and fecal colon content.

Proteomic analysis of *Hafnia alvei* HA4597

The TargEDys proprietary *H.alvei* HA4597 strain (manufactured by Biodis, Noyant, France) was analyzed for the presence of α -MSH-like epitopes using western blot (WB) and immunoprecipitation with α -MSH antibodies (Delphi Genetic, Charleroi, Belgium). Total protein from *H.alvei* HA4597 cultures was extracted and processed for WB. Shotgun LC-MS/MS mass spectrometry (Biognosys, Schlieren, Switzerland) was used for the identification of bacterial proteins precipitated by α -MSH antibodies after total protein extraction from *H.alvei* HA4597 and *E.coli* K12. For the detailed procedure see Supplementary data.

Hafnia alvei HA4597 strain preparation for animal experiments

The *H.alvei* HA4597 strain was pre-cultured by incubating under agitation of 100 μL of the bacterial stock suspension in 10 mL of Luria Broth culture medium (LB, Conda, Madrid, Spain) overnight at 37°C . The optical density of diluted preculture (1:10 vol. in culture medium) was measured using a spectrophotometer at 600 nm (LB medium served as blank) to adjust the optical density at 0.01 at the beginning of the culture. Then, the bacterial culture was started with LB medium at 37°C under agitation. After 4 h of incubation, *H.alvei* culture samples were taken and stored at -20°C until use. The number of CFU per animal was determined prior to the gavage consisting of 3×10^8 CFU/day for *ob/ob* mice and 4×10^7 CFU/day for the HFD model.

ClpB protein assay

Development and validation of an *E.coli* ClpB immunoassay has been described [18]. In brief, rabbit polyclonal anti-*E.coli* K12 ClpB antibodies (Delphi Genetics) were coated onto 96-well Maxisorp plates (Nunc, Rochester, NY). One hundred microliters of plasma samples or ClpB protein (Delphi Genetics) standard dilutions were incubated for 2 h at room temperature (RT). Mouse monoclonal anti-*E.coli* K12 ClpB antibodies (Delphi Genetics) and goat anti-mouse alkaline phosphatase conjugated IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, USA) were used for ClpB detection and p-nitrophenyl phosphate solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) as a substrate. The reaction was stopped by 3 N NaOH and optical density was determined at 405 nm using a microplate reader Metertech 960 (Metertech Inc., Taipei, Taiwan). Concentration was measured by referring to the ClpB protein standard curve.

ClpB DNA in fecal content

Total DNA was extracted from the colonic fecal content using the QIAamp Mini Spin Columns, following the manufacturer's instructions (Qiagen, Courtaboeuf, France). The PCR conditions and ClpB DNA primers have been described [12], 16 S rRNA gene primers were used from Turner et al. [19].

Phosphorylated hormone-sensitive lipase (pHSL) levels in fat tissue

To evaluate the possible effects of *H.alvei* HA4597 supplementation on fat tissue lipolysis, the levels of pHSL protein, a lipolytic marker, were studied by WB in the epididymal fat tissue of both models using anti-pHSL antibodies (Cell Signaling Technology, MA, USA).

Expression of hypothalamic neuropeptides

To study the possible effects of *H.alvei* HA4597 supplementation on the hypothalamic feeding-regulatory neuropeptides, mRNA expression of agouti-related protein (AgRP), neuropeptide Y (NPY), and proopiomelanocortin (POMC) were determined by RT-PCR. Total RNA was extracted from mouse hypothalami in TRIZOL reagent according to the supplier instructions (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). RT-PCR was performed using 1 μg of total RNA and 200 U of SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) followed by SYBR Green technology on BioRad CFX96 real-time PCR system (BioRad, Hercules, CA, USA). The PCR primers for the detection of mRNA

precursors of NPY, POMC, and AgRP have been published [20].

In silico analysis of the presence of the *H.alvei* and *E.coli* ClpB gene in human gut microbiota

In silico screening was performed against the 9,879,896 microbial genes catalog representative of the human intestinal microbiota (IGC catalog) established from metagenomic assembling of 1267 individuals [17], for details see the supplemental data. For this study, only data from 569 healthy individuals (384 European and 185 Chinese) with their annotated BMI were considered. Ethical approvals for the sample collection and informed consent have been obtained by National ethical committee for all studied groups [17]. The amino acid sequence of the chaperone protein ClpB of *E. coli* K12 (also known as heat shock protein F84.1; NCBI accession number: NP_417083.1) was used as query to screen the metagenomic data. The reference catalog was screened at the protein level using Blastp (v.2.7.1+) with an *e*-value threshold of $1E-5$ and 40% identity at least over 90% of protein length. Targeted ClpB encoding gene presence and abundance were measured using IGC abundance table established in Li et al. [18].

Statistical analysis

Data were analyzed using GraphPad Prism 5.02 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Group differences were compared by the analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post tests or Kruskal–Wallis test followed by Dunn's post tests according to normality results evaluated by the Kolmogorov–Smirnov test. Individual group differences were analyzed using two-sided Student's *t*-test or Mann–Whitney's test. Dynamics of body weight and food intake changes were analyzed by two-way repeated measurements (RM) ANOVA followed by Bonferroni's post tests. For all tests, $p < 0.05$ was considered statistically significant. Results are shown as mean \pm SEM.

Results

E.coli K12 native but not the ClpB mutant strain decreases body weight gain in obese mice

A decrease in body weight gain was observed after 4 days of treatment by *E.coli* K12 bacteria and persisted throughout the following 16 days of the study (Fig. 1a). Per os administration of mice with the ClpB mutant *E.coli* K12 strain had no significant effect on body weight gain (Fig. 1a, b). Total fat mass was also decreased in mice receiving *E.coli* K12 native but not the ClpB mutant strain

(Fig. 1c), the latter was significant when compared directly with the control group (Student's *t*-test $p < 0.05$). Analysis of feeding behavior revealed that supplementation in *E.coli* K12 reduced the total daily food intake as compared with both control and ClpB-deficient strain-fed mice (Fig. 1d). Decrease in total food intake was due to a decrease in the number of meals (Fig. 1e) without changing the meal size (not shown). A weaker anorexigenic effect was observed in mice supplemented with the ClpB mutant strain (Fig. 1d) which was also due to a decrease in meal number (Student's *t*-test $p < 0.01$ vs. controls) without affecting meal size (not shown).

Hafnia alvei HA4597 produces ClpB protein with α -MSH-like epitope

WB on *H.alvei* extracted proteins using anti- α -MSH polyclonal antibodies revealed several bands including one at about 96 kDa corresponding to the molecular weight of the full ClpB molecule, and a further two bands at around 20 and 10 kDa (Fig. 2a).

Using mass spectrometry identification following the immunoprecipitation of *H.alvei* HA4597 and *E.coli* K12 total proteins with an anti- α -MSH polyclonal antibody, 507 ± 70 and 792 ± 28 proteins were respectively recovered and 114 and 96 proteins, respectively, were significantly enriched in samples precipitated by α -MSH antibodies vs. total IgG (data not shown). ClpB was among the recovered proteins in both strains but it was about 10 times more abundant in *H.alvei* HA4597 than in *E.coli* K12 (Fig. 2b). High levels of ClpB recovery by total IgG was expected due to the natural presence of ClpB-reactive IgG in non-immunized animals and humans [12]. Sequence alignments between α -MSH and recovered proteins showed that only the ClpB protein from both *H.alvei* HA4597 and *E.coli* K12 strains displayed the α -MSH-like epitope with the predicted melanocortin-like activity (Fig. 2c). These data were confirmed and further extended by in silico analysis of the bacterial protein reference database (see below).

Hafnia alvei HA4597 reduces body weight gain and fat mass in ob/ob and HFD obese mice

H.alvei treatment was not accompanied by any adverse effects. In *ob/ob* mice, body weight gain was significantly lower after 9 days of *H.alvei* HA4597 gavage resulting in a 50.1% decrease at the last day of treatment (Fig. 3a). In the HFD mouse model, prior to *H.alvei* provision, the obesity was induced by HFD (Supplementary Fig. 1). In HFD-fed obese mice, the body weight gain decreased during the *H.alvei* HA4597 treatment as compared with the control group starting from the 23rd day of treatment (Fig. 3b), with

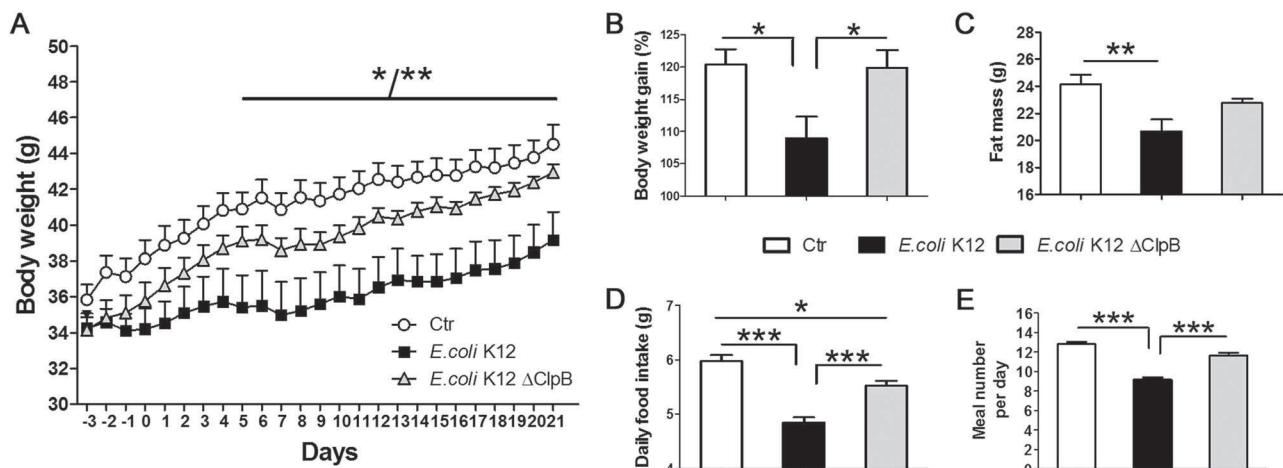


Fig. 1 Effects of *E. coli* K12 native and ClpB-deficient strains in *ob/ob* mice. **a** Body weight dynamics. **b** Body weight gain (%). **c** Total fat mass. **d** Daily food intake. **e** Daily meal number. **a** 2-Way RM ANOVA $p < 0.01$, Bonferroni post tests $**p < 0.01$ for days 6, 8, 11,

and 12, other days $*p < 0.05$. **b** ANOVA $p < 0.05$, Tukey's post tests $*p < 0.05$. **c** ANOVA $p < 0.01$, Tukey's post tests $**p < 0.01$. **d** ANOVA $p < 0.0001$, Tukey's post tests $***p < 0.001$, $*p < 0.05$. **e** Kruskal–Wallis $p < 0.0001$, Dunn's post tests $***p < 0.001$.

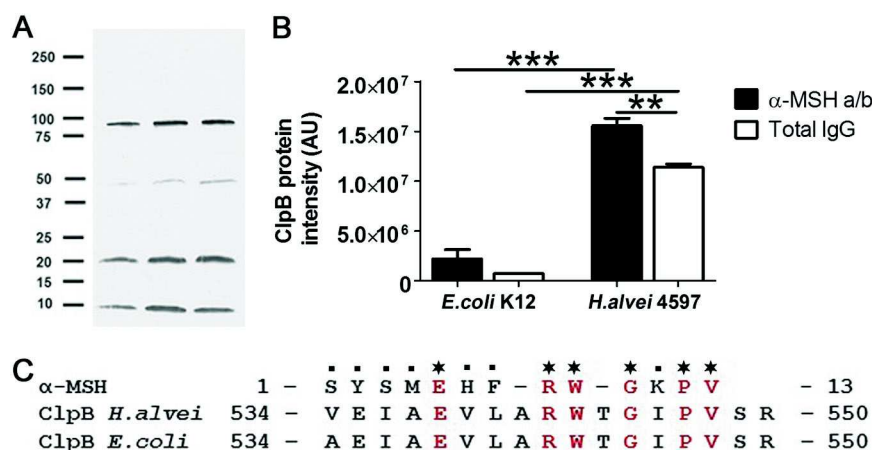


Fig. 2 Proteomic analysis of *H. alvei* HA4597 for α -MSH-mimetic proteins. **a** Western blot of *H. alvei* extracted total proteins using anti- α -MSH antibodies (each lane correspond to a different *H. alvei* sample). **b** Intensity of the ClpB protein recovered from *H. alvei* and *E. coli* K12 after immunoprecipitation using rabbit polyclonal α -MSH antibodies or total rabbit IgG and identified by mass spectrometry (AU

arbitrary units). **c** Amino acid sequence alignment between the α -MSH peptide and the ClpB proteins from *H. alvei* and *E. coli*. Stars indicate identical amino acids, periods indicate weak similarity < 0.5 of Gonnet PAM250 Matrix used in the EMBOS Stretcher program (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/>). **b** ANOVA, $p < 0.0001$, Tukey's post tests $***p < 0.001$, $**p < 0.01$.

the largest difference observed at day 33 corresponding to a 94.7% decrease (0.13 ± 0.41 vs. 2.53 ± 0.43 g). At the last day of treatment this difference decreased to a 38.1% (2.3 ± 0.4 vs. 3.8 ± 0.41 g, Student's t -test $p < 0.05$).

Analysis of the body composition revealed lower gain of fat and loss of lean mass in *H. alvei* HA4597-treated *ob/ob* mice (Fig. 3c), corresponding to a 38.3% and 126.8% decrease, respectively. A decrease of fat mass gain was also observed in the HFD model, corresponding to 51.9%, while a mean decrease of lean mass (72.4%) did not reach significance (Fig. 3d).

Hafnia alvei HA4597 reduces food intake in *ob/ob* mice

In the hyperphagic *ob/ob* model, *H. alvei* HA4597 treatment was accompanied by significantly lower cumulative food intake observed from day 9 and resulting in a 20.8% decrease in food intake at the last day of the experiment (Fig. 3e). No significant differences of cumulative food intake were observed between the *H. alvei* HA4597-treated and the control mice in the HFD-induced obesity model

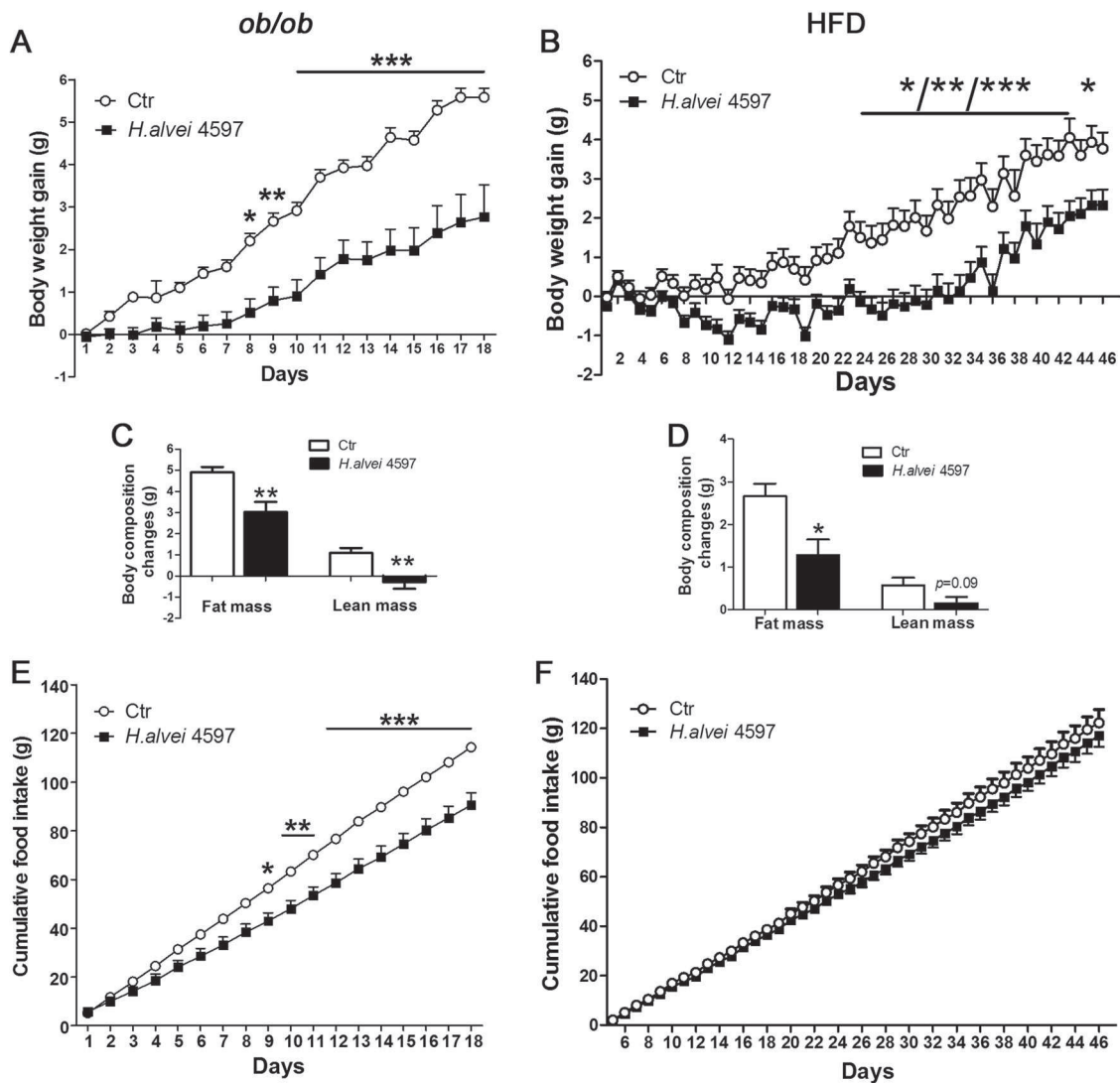


Fig. 3 Effects of *H. alvei* HA4597 in *ob/ob* and HFD-fed obese mice on body weight, body composition, and food intake. Body weight dynamics in *ob/ob* (a) and in HFD-fed obese mice (b). Total fat and lean tissue mass in *ob/ob* (c) and in HFD-fed obese mice (d). Cumulative food intake in *ob/ob* (e) and in HFD-fed obese mice (f).

Two-way RM ANOVA, a, b $p < 0.001$, e $p < 0.05$, Bonferroni post tests, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, b *for days 23–25, 38, 41, and 47, **for days 26, 27, 30, 37, 39, 42, and 43, ***for days 28, 29, 31–36, and 40. c, d Mann–Whitney tests, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

(Kruskal–Wallis test $p = 0.29$), although a separation of the cumulative food intake curves was visible between the two groups after 4 weeks of treatment (Fig. 3f).

***H. alvei* HA4597 increases ClpB DNA and plasma levels of ClpB protein in obese mice**

H. alvei provision increased colonic content of ClpB DNA and plasma concentrations of ClpB protein in *ob/ob* mice (Fig. 4a). Although a tendency of increased ClpB DNA content was observed in HFD obese mice treated by *H. alvei* HA4597 (Mann–Whitney test $p = 0.09$), the plasma concentration of ClpB protein did not change significantly (Mann–Whitney test $p = 0.49$), (Fig. 4b).

***H. alvei* HA4597 increases lipolytic marker in obese mice**

Using the WB, we found that after 18 days of *H. alvei* treatment in *ob/ob* mice, the pHSL levels were significantly higher than in the control group (Fig. 4c). In the HFD obese mice treated with *H. alvei* a trend of increasing pHSL levels was observed (Mann–Whitney test $p = 0.08$), (Fig. 4d).

***H. alvei* HA4597 decreases AgRP mRNA in the hypothalamus of obese mice**

We found that in both *ob/ob* and HFD obese mice, *H. alvei* HA4597 treatment was accompanied by lower mRNA

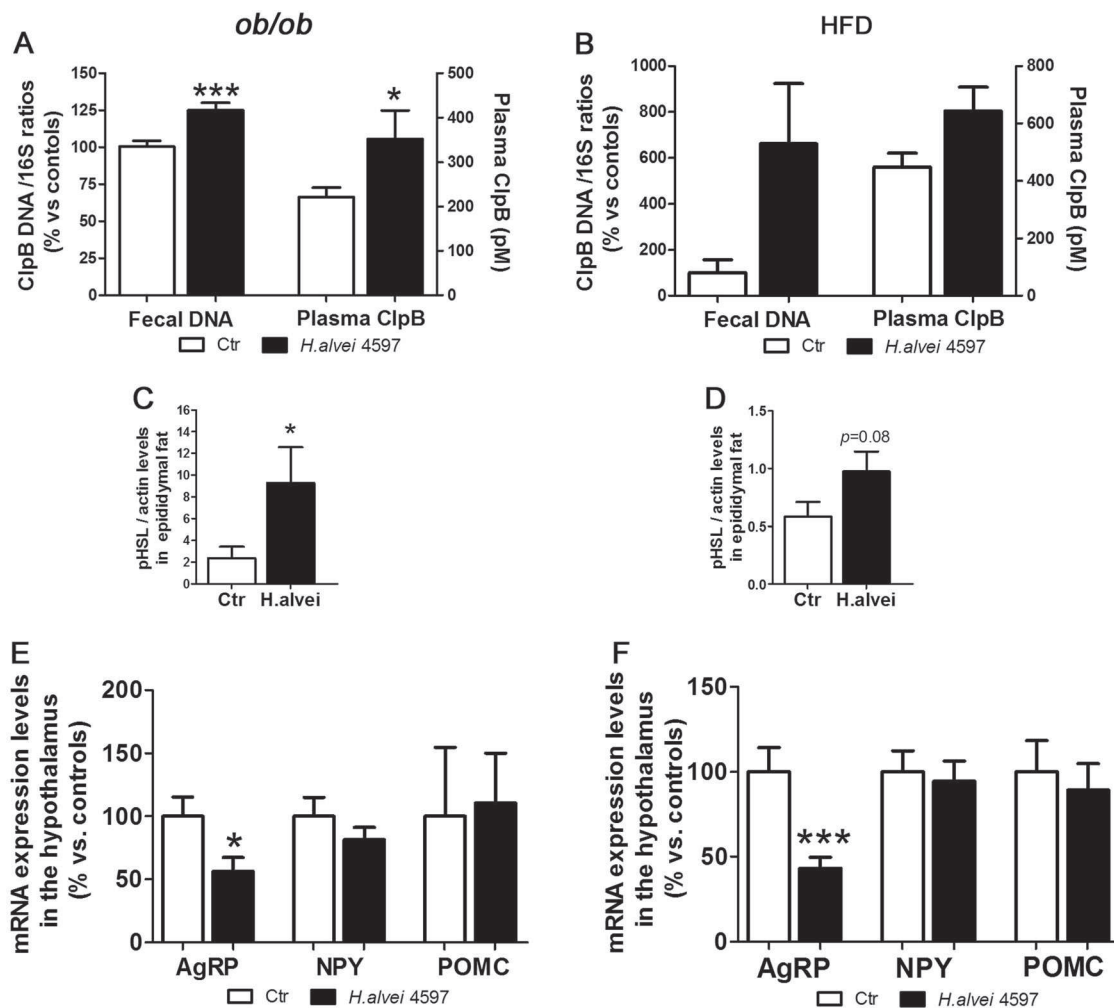


Fig. 4 Effects of *H. alvei* HA4597 in *ob/ob* and HFD-fed obese mice on ClpB production, pHSL levels, and hypothalamic neuropeptide mRNA. Levels of ClpB DNA in colonic feces and of ClpB protein in plasma of *ob/ob* (a) and of HFD-fed obese mice (b). Actin-normalized pHSL levels in the epididymal fat tissue in *ob/ob* (c) and in HFD-fed

obese mice (d). Hypothalamic mRNA expression levels of AgRP, NPY, and POMC in *ob/ob* (e) and in HFD-fed obese mice (f) relative to controls (100%). a Fecal DNA, Student's *t*-test *** $p < 0.001$. a, e, f Mann–Whitney tests, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

expression levels of an orexigenic neuropeptide AgRP (Fig. 4e, f). However, we did not find significant differences in NPY and POMC mRNA expression levels (Fig. 4e, f).

Enterobacterial ClpB gene is depleted in gut microbiota of obese humans

Using Blastp, the 10M protein reference catalog was interrogated for the *E. coli* K12 ClpB protein sequence. A total of 1527 hits were identified with identity ranging between 40 and 100%. Taxonomic distribution according to sequence identity showed that more than 80% identity was present in the order *Enterobacteriales* including families of *Enterobacteriaceae*, *Hafniaceae*, *Morganellaceae* and in some unclassified microorganisms (Fig. 5). Moreover, the search for the α -MSH-like motif of *E. coli* ClpB, as shown in Fig. 2c, resulted in its detection in 12 annotated genomic

records all corresponding to the *Enterobacteriales* order and represented by species of *Escherichia coli*, *Citrobacter portucalensis*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter xiangfangensis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella michiganensis*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella aerogenes*, *Proteus mirabilis*, and *Hafnia paralvei* (Supplementary Table 1). Of note, there is no specie annotated directly to *Hafnia alvei* in the catalog.

When the *Enterobacteriales* ClpB gene species richness were analyzed for their relation to BMI, the microbiota of obese individuals was found to be depleted from these genes as compared with lean and overweight individuals ($p < 0.0001$) but there were no significant differences between the latter groups (Fig. 6a). However, the main contribution of such difference was due to high richness of the *Enterobacteriales* ClpB genes in the Chinese cohort as compared with Europeans (Fig. 6b). Nevertheless, it is of

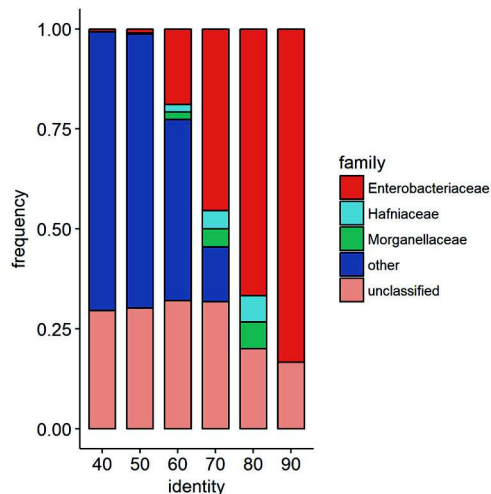


Fig. 5 Taxonomic distribution at family level of *E. coli* ClpB homology according to sequence identity (from 40 to 90%). Note that all identified families with more than 80% homology belong to the order of *Enterobacteriales*. Genus *Hafnia* belongs to the new family of *Hafniaceae* and genus *Proteus* to the new family of *Morganellaceae*.

interest that mean BMI values in both lean and overweight groups were significantly lower in Chinese vs. European cohorts (21.29 ± 0.15 vs. 22.39 ± 0.14 , Mann–Whitney test, $p < 0.0001$ and 26.49 ± 0.1 vs. 27.32 ± 0.2 , Mann–Whitney test, $p < 0.01$, respectively). Within the European cohort, only a tendency of increased ClpB gene richness in lean vs. obese group was observed (Fig. 6c). No significant differences were found between three BMI groups within the Chinese cohort, although the obese group was underrepresented having only two individuals (Fig. 6b). To avoid potential bias, Chinese cohort has been excluded in the BMI correlation analysis. Significant negative correlations within the European cohort were found between BMI and abundance of four *Enterobacteriales* ClpB species. These included *Enterobacter xiangfangensis*, *Klebsiella michiganensis 1*, *Klebsiella michiganensis 2*, and *Hafnia paralvei* (Spearman's $\rho = -0.10$, $p = 0.04$ and $\rho = -0.11$, $p = 0.02$, $\rho = -0.12$, $p = 0.02$, and $\rho = -0.12$, $p = 0.02$, respectively, Supplementary Fig. 2). These four species were significantly enriched in lean individuals compared with obese individuals (FDR adjusted $p = 0.04$).

Although *Hafnia alvei* specie was not detected in the IGC reference catalog which lacks its full genomic annotation, the closed phylogenetically *Hafnia paralvei* (msp_1240) was weakly represented. Only 13 healthy individuals harbored this specie in their gut microbiota. Using an alternative bioinformatics approach, blasting of the *H. alvei* HA4597 specie genome resulted in its detection in metagenome of eight healthy humans i.e., it represents a relatively rare commensal gut specie.

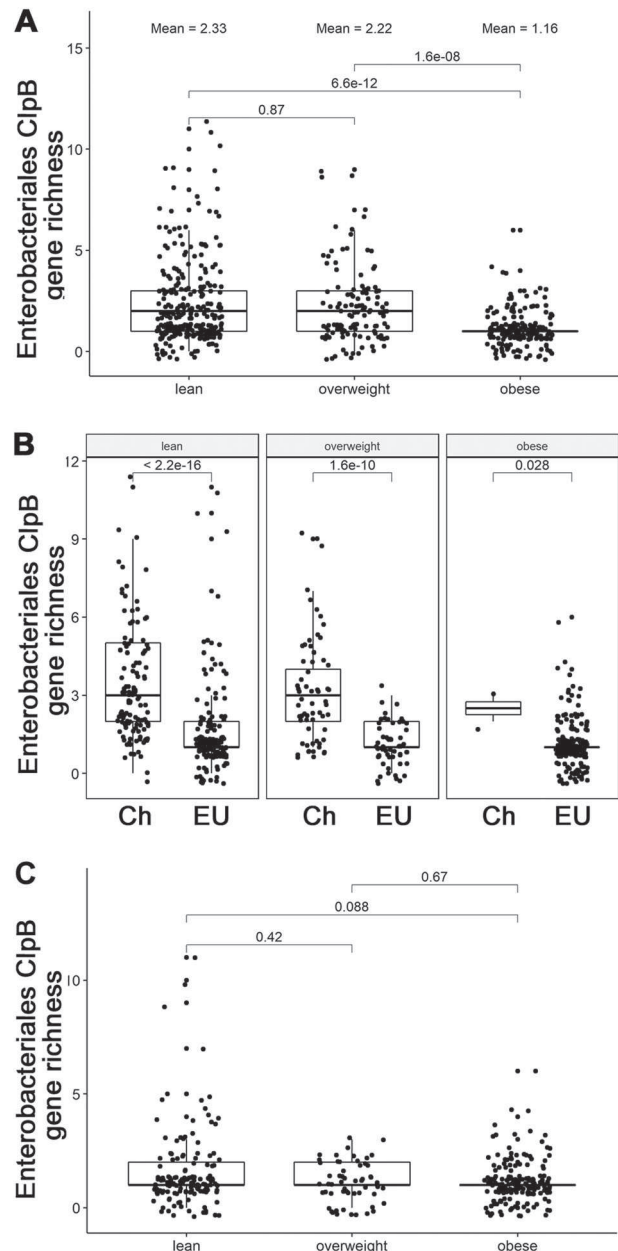


Fig. 6 Enterobacteriales ClpB gene richness in human gut microbiota according to BMI status. a Total combined cohort. b Chinese (Ch) and European (EU) cohorts. c European cohort. *P* values for the Mann–Whitney test are shown.

Discussion

Bacteria of the genus *Hafnia* were identified and named in 1954 by Danish microbiologist Møller after the Latin name for Copenhagen [21]. The food origin of *H. alvei* was documented by its isolation from raw milk and subsequently from cheese and is considered as part of normal milk microbiota [22, 23]. High numbers of *H. alvei* have been reported in Camembert cheese, up to 10^8 of viable bacteria per g [24]. Since the nineties, *H. alvei* has been

added to milk during the manufacturing of soft cheese due to its beneficial cheese ripening properties. As a result, these bacteria have been consumed naturally and in high amounts for decades by the general population. There have been no adverse effects identified in immunocompetent individuals associated with cheese-derived *H.alvei* intake, therefore, justifying it as a safe food-grade bacteria annotated by The International Dairy Federation for Microbial Food Cultures [25]. Furthermore, its random presence in the gut microbiota of healthy humans justifies the appellation of *H.alvei* as a gut commensal.

It is of relevance for the present study to note that *H.alvei* is the only commensal specie from the *Enterobacteriales* order to date to carry a food-grade status. In fact, although some other species such as *E.coli* or *Enterobacter* are common members of the human gut microbiota, they do not have food-grade status and their presence in food products is considered as a marker of fecal microbial contamination [26]. Therefore, the aforementioned food-grade properties of *H.alvei* as well as the expression of the ClpB gene with the same α -MSH-like motif as in *E.coli* served for its selection and validation as a potential probiotic strain for appetite and body weight management in the present study.

Anti-obesity probiotic should be able to interfere with at least two major pro-obesity factors such as hyperphagia and fat tissue accumulation [27]. In this aspect, activation of specific melanocortin receptors (MCR) by α -MSH represents a well-established pharmacological target triggering both anorexigenic and lipolytic effects [28]. Indeed, a recent report showed a marked anti-obesity effect of an α -MSH synthetic peptide analog setmelanotide in two patients with congenital obesity caused by POMC deficiency [29]. Thus, as long as safe and efficient pharmacological anti-obesity compounds continue being developed, a probiotic with natural α -MSH mimetic properties may become an option for obesity and overweight prevention or treatment.

In the present study, we confirmed that the α -MSH-like motif, initially described in *E.coli* K12 ClpB is conserved in the *Enterobacteriales* order including the *Hafnia* genus and that the *H.alvei* HA4597 strain synthesizes the α -MSH-mimetic ClpB protein. The recovery of some other bacterial proteins by immunoprecipitation with α -MSH antibodies was due to their binding α -MSH-non related or possibly shorter α -MSH-like motifs which did not contain the melanocortin core sequence i.e., they cannot *a priori* activate the MCR. For instance, a mimicry of the α -MSH N-terminal was previously identified in the elongation factor-G of *E.coli* by the Roth's group using corticotropin antibodies [30]. We were also able to detect this protein in *H.alvei* after precipitation with an α -MSH antibody but it was about 600 times less abundant than the ClpB (data not shown). We also showed for the first time that *per os*

administration of a laboratory *E.coli* strain from the same with *H.alvei* *Enterobacteriales* order in *ob/ob* mice decreases their food intake, fat mass and body weight gain and that ClpB was the main active substance responsible for these effects. Although the exact mechanisms of action of ClpB on the regulation of appetite and energy metabolism remain to be established, the α -MSH-mimetic properties may play a key role because the appetite-reducing effects of traditional probiotics *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, known to express ClpB-like proteins with no homology to α -MSH [31], have not been reported in either animal or human studies [9]. With regard to the possible ClpB action sites, it activated the hypothalamic anorexigenic POMC neurons [18] and a recent report showed the capacity of ClpB to stimulate secretion of peptide YY, a satiety hormone from the gut [32, 33]. The underlying receptors and intracellular pathways still need to be determined, but the ability of the α -MSH-like motif of ClpB to activate cAMP release by type one MCR has been shown [34] pointing to the spatial complementarity between this ClpB peptide fragment and the MCRs.

Our data revealed that *H.alvei* HA4597 displays the desired probiotic properties of an anti-obesity or weight loss supplement i.e., produce anorexigenic and lipolytic effects in hyperphagic *ob/ob* mice resulting in decreased fat mass and body weight gain. The body weight and fat tissue lowering effects were also observed in HFD obese mice, although without significant anorexigenic and lipolytic actions. Considering low grade obesity and hypophagia in the HFD obesity model, moderate anorexigenic and lipolytic actions of *H.alvei* HA4597 may cumulate to reduce total adiposity. In fact, decreased levels of AgRP mRNA expression in the hypothalamus were found in both *ob/ob* and HFD mice indicating inhibition of the brain orexigenic circuitry by *H.alvei*. AgRP neurons are known to be inhibited by PYY [35] and, hence, may transmit intestinal satietogenic effects triggered by *H.alvei* ClpB. Indeed, intestinal epithelium including the enteroendocrine cells was shown to express MCR [36].

Finally, the low abundance of ClpB gene expressing *Enterobacteriales* species found in the microbiota of obese subjects in the present *in silico* analysis may indicate insufficient anorexigenic signaling from the gut microbiota to the host, further providing the rationale for supplementation of commensal bacteria expressing the ClpB protein with an α -MSH-like motif. These results are in agreement with previous reports showing a low prevalence of *Enterobacteriaceae* in obese individuals [37]. Thus, our study has validated *H.alvei* HA4597 food-grade bacterial strain as a new potential anti-obesity and anti-overweight probiotic because the desired effects of lowering appetite and/or body weight have been obtained in two mouse models of obesity and overweight.

Acknowledgements The authors would like to thank Antonia Trower and Clémentine Picolo, Managers at TargEDys SA., for their help in manuscript writing. SF is supported by TMP of Inserm.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest NL, RL, SA, CD, and MALS were full-time employees of TargEDys SA. SOF and PD are co-founders and consultants of TargEDys SA. GL is the CEO of TargEDys SA. Other co-authors declare no conflict of interest.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Rosenbaum M, Knight R, Leibel RL. The gut microbiota in human energy homeostasis and obesity. *Trends Endocrinol Metab.* 2015;26:493–501.
- Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biol.* 2016;14:e1002533.
- Yatsunenok T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature.* 2012;486:222–7.
- Bolnick DI, Snowberg LK, Hirsch PE, Lauber CL, Org E, Parks B, et al. Individual diet has sex-dependent effects on vertebrate gut microbiota. *Nat Commun.* 2014;5:4500.
- Cotillard A, Kennedy SP, Kong LC, Prifti E, Pons N, Le Chatelier E, et al. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature.* 2013;500:585–8.
- Tumbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature.* 2006;444:1027–131.
- Fetissov SO. Role of the gut microbiota in host appetite control: bacterial growth to animal feeding behaviour. *Nat Rev Endocrinol.* 2017;13:11–25.
- Muscogiuri G, Cantone E, Cassarano S, Tuccinardi D, Barrea L, Savastano S, et al. Gut microbiota: a new path to treat obesity. *Int J Obes Suppl.* 2019. <https://doi.org/10.1038/s41367-019-0011-7>.
- Kobyliak N, Conte C, Cammarota G, Haley AP, Styriak I, Gaspar L, et al. Probiotics in prevention and treatment of obesity: a critical view. *Nutr Metab (Lond).* 2016;13:14.
- Crovesy L, Ostrowski M, Ferreira DMTP, Rosado EL, Soares-Mota M. Effect of *Lactobacillus* on body weight and body fat in overweight subjects: a systematic review of randomized controlled clinical trials. *Int J Obes.* 2017;41:1607.
- Cani PD, de Vos WM. Next-generation beneficial microbes: the case of *Akkermansia muciniphila*. *Front Microbiol.* 2017;8:1765.
- Tennoune N, Chan P, Breton J, Legrand R, Chabane YN, Akkermann K, et al. Bacterial ClpB heat-shock protein, an antigen-mimetic of the anorexigenic peptide [alpha]-MSH, at the origin of eating disorders. *Transl Psychiatry.* 2014;4:e458.
- Yaswen L, Diehl N, Brennan MB, Hochgeschwender U. Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat Med.* 1999;5:1066–70.
- Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Gruters A. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet.* 1998;19:155–7.
- Farooqi IS, Keogh JM, Yeo GSH, Lank EJ, Cheetham T, O'Rahilly S. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *N Engl J Med.* 2003;348:1085–95.
- Adeolu M, Alnajjar S, Naushad S, Gupta R. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacterales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016;66:5575–99.
- Li J, Jia H, Cai X, Zhong H, Feng Q, Sunagawa S, et al. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol.* 2014;32:834.
- Breton J, Tennoune N, Lucas N, François M, Legrand R, Jacquemot J, et al. Gut commensal *E. coli* proteins activate host satiety pathways following nutrient-induced bacterial growth. *Cell Metab.* 2016;23:1–11.
- Turner S, Pryer KM, Miao VPW, Palmer JD. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis I. *J Eukaryotic Microbiol.* 1999;46:327–38.
- Hamze Sinno M, Do Rego JC, Coëffier M, Bole-Feysot C, Ducrotte P, Gilbert D, et al. Regulation of feeding and anxiety by α -MSH reactive autoantibodies. *Psychoneuroendocrinology.* 2009;34:140–9.
- Moller V. Distribution of amino acid decarboxylases in Enterobacteriaceae. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1954;35:259–77.
- Gaya P, Medina M, Nuntez M. Enterobacteriaceae, coliforms, faecal coliforms and salmonellas in raw ewes'milk. *J Appl Bacteriol.* 1987;62:321–6.
- Tornadizo E, Fresno JM, Carballo J, Martín-Sarmiento R. Study of Enterobacteriaceae throughout the manufacturing and ripening of hard goats' cheese. *J Appl Bacteriol.* 1993;75:240–6.
- Richard J, Zadi H. Inventaire de la flore bactérienne dominante des Camemberts fabriqués avec lait cru. *Le Lait, INRA Ed.* 1983;63:25–42.
- Federation ID. Safety demonstration of microbial food cultures (MFC) in fermented food products (Annex 4). *Bull Int Dairy Fed.* 2012;455:68.
- Mogren L, Windstam S, Boqvist S, Vågsholm I, Söderqvist K, Rosberg AK, et al. The hurdle approach—a holistic concept for controlling food safety risks associated with pathogenic bacterial contamination of leafy green vegetables. A Review. *Front Microbiol.* 2018;9:1965.
- Richard D. Cognitive and autonomic determinants of energy homeostasis in obesity. *Nat Rev Endocrinol.* 2015;11:489.
- Anderson EJP, Çakir I, Carrington SJ, Cone RD, Ghamari-Langroudi M, Gillyard T, et al. 60 YEARS OF POMC: regulation of feeding and energy homeostasis by α -MSH. *J Mol Endocrinol.* 2016;56:T157–T74.
- Kühnen P, Clément K, Wiegand S, Blankenstein O, Gottesdiener K, Martini LL, et al. Proopiomelanocortin deficiency treated with a melanocortin-4 receptor agonist. *N Engl J Med.* 2016;375:240–6.

30. Qiang X, Liotta AS, Shiloach J, Gutierrez JC, Wang H, Ochani M, et al. New melanocortin-like peptide of *E. coli* can suppress inflammation via the mammalian melanocortin-1 receptor (MC1R): possible endocrine-like function for microbes of the gut. *NPJ Biofilms Microb.* 2017;3:31.
31. Fetissov SO, Legrand R, Lucas N. Bacterial protein mimetic of peptide hormone as a new class of protein-based drugs. *Curr Med Chem.* 2019;26:546–53.
32. Dominique M, Breton J, Guérin C, Bole-Feysot C, Lambert G, Déchelotte P, et al. Effects of macronutrients on the in vitro production of ClpB, a bacterial mimetic protein of α -MSH and its possible role in the satiety signaling. *Nutrients.* 2019;11:2115.
33. Cox HM, Tough IR, Woolston A-M, Zhang L, Nguyen AD, Sainsbury A, et al. Peptide YY is critical for acylethanolamine receptor Gpr119-induced activation of gastrointestinal mucosal responses. *Cell Metab.* 2010;11:532–42.
34. Ericson MD, Schnell SM, Freeman KT, Haskell-Luevano C. A fragment of the *Escherichia coli* ClpB heat-shock protein is a micromolar melanocortin 1 receptor agonist. *Bioorg Med Chem Lett.* 2015;25:5306–8.
35. Batterham RL, Cowley MA, Small CJ, Herzog H, Cohen MA, Dakin CL, et al. Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature.* 2002;418:650–4.
36. Panaro Brandon L, Tough Iain R, Engelstoft Maja S, Matthews Robert T, Digby Gregory J, Møller Cathrine L, et al. The melanocortin-4 receptor is expressed in enteroendocrine L cells and regulates the release of peptide YY and glucagon-like peptide 1 in vivo. *Cell Metab.* 2014;20:1018–29.
37. Million M, Angelakis E, Maraninchi M, Henry M, Giorgi R, Valero R, et al. Correlation between body mass index and gut concentrations of *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium animalis*, *Methanobrevibacter smithii* and *Escherichia coli*. *Int J Obes.* 2013;37:1460–6.

Affiliations

Romain Legrand¹ · Nicolas Lucas¹ · Manon Dominique^{1,2,3} · Saida Azhar¹ · Camille Deroissart^{1,2,3} · Marie-Anne Le Solliec^{1,2,3} · Julie Rondeaux^{1,2,3} · Séverine Nobis^{2,3} · Charlène Guérin^{2,3} · Fatima Léon^{3,4} · Jean-Claude do Rego^{3,4} · Nicolas Pons⁵ · Emmanuelle Le Chatelier⁵ · S. Dusko Ehrlich⁵ · Gregory Lambert¹ · Pierre Déchelotte^{1,2,3,6} · Sergueï O. Fetissov^{1,2,3,7}

¹ TargEDys SA, University of Rouen, 76183 Rouen, France

² Inserm UMR1073, Nutrition, Gut and Brain Laboratory, 76183 Rouen, France

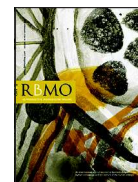
³ Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), University of Rouen Normandy, 76183 Rouen, France

⁴ Animal Behavioral Platform SCAC, University of Rouen Normandy, 76183 Rouen, France

⁵ MGP MetaGénoPolis, INRA, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy en Josas, France

⁶ Rouen University Hospital, CHU Charles-Nicolle, 76183 Rouen, France

⁷ Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication, Inserm UMR1239, Mont-Saint-Aignan, France



ARTICLE

DNA methylation and histone post-translational modifications in the mouse germline following in-vitro maturation of fresh or cryopreserved prepubertal testicular tissue

**BIOGRAPHY**

Antoine Oblette is a PhD student in the Gametogenesis and Gamete Quality Team within the Institute for Research and Innovation in Biomedicine and the University Hospital of Rouen in France. His area of research covers fertility preservation and restoration in young boys with cancer.

Antoine Oblette¹, Julie Rondeaux¹, Ludovic Dumont, Marion Delessard, Justine Saulnier, Aurélie Rives, Nathalie Rives, Christine Rondanino*

KEY MESSAGE

DNA methylation and histone post-translational modifications, which play an important role during spermatogenesis and embryonic development, occur in the mouse germline in in-vitro matured cryopreserved mouse prepubertal testes. These epigenetic modifications will have to be further explored before applying this fertility restoration strategy to testicular tissue from prepubescent boys.

ABSTRACT

Research question: Do cryopreservation and in-vitro culture procedures affect the expression of DNA methyltransferases (DNMT) and histone-modifying enzymes, as well as the establishment of DNA methylation and histone post-translational modifications (PTM) in germ cells in prepubertal mouse testicular tissue?

Design: This study investigated the expression of epigenetic modification enzymes, DNA methylation and histone PTM, and the spermatogenic progression after in-vitro maturation of fresh or cryopreserved mouse prepubertal testicular tissue. Fresh or cryopreserved testicular fragments from 6–7 days post-partum mice were cultured for 30 days in the presence of retinol with or without FSH.

Results: The in-vitro maturation of fresh or cryopreserved tissue allowed the differentiation of spermatogonia into spermatozoa. Differences in the levels of transcripts encoding epigenetic modification enzymes (*Dnmt1*, *Dnmt3a*, *Jarid1b*, *Src1*, *Sirt1*, *Hdac1*) were found between 30-day tissue cultures and age-matched in-vivo controls. DNMT1/DNMT3a expression and the presence of 5-methylcytosine (5mC) were detected in spermatogonia and leptotene/zygotene spermatocytes in cultures. The relative 5mC fluorescence intensity was similar in spermatozoa produced in cultures of cryopreserved tissues or *in vivo*. H3K4me3, H3K9ac and H4K8ac were present in all germ cell types but differences in the proportion of germ cells containing these epigenetic marks were found after cultures.

Conclusions: Despite differences with the in-vivo situation, DNA methylation and histone methylation and acetylation occur in the mouse germline in in-vitro matured fresh or cryopreserved mouse prepubertal testicular tissue, and the expression of the enzymes catalysing these epigenetic modifications are maintained *in vitro*.

Normandie University, UNIROUEN, EA 4308 'Gametogenesis and Gamete Quality', Rouen University Hospital, Department of Reproductive Biology-CECOS, Rouen F 76000, France
[†]These authors contributed equally to this work.

© 2019 Reproductive Healthcare Ltd. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
 *Corresponding author. E-mail address: christine.rondanino@univ-rouen.fr (C. Rondanino). <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2019.05.007> 1472-6483/© 2019 Reproductive Healthcare Ltd. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
 Declaration: The authors report no financial or commercial conflicts of interest.

KEYWORDS

Cryopreservation protocols
 DNA methylation
 Epigenetic modification
 Histone post-translational modifications
 In-vitro spermatogenesis
 Mouse prepubertal testis

INTRODUCTION

Survival rates for children with cancer have considerably increased over recent decades thanks to diagnostic and therapeutic progress. Chemotherapy and radiotherapy treatments can, however, have toxic effects on gonads (Jahnukainen et al., 2015; Picton et al., 2015; Wyns et al., 2010). In prepubertal boys, the actively dividing spermatogonial stem cells (SSC) are particularly sensitive to certain cytotoxic agents used in chemotherapy protocols (Goossens et al., 2013; Nurmio et al., 2009). At adulthood, cured patients can be diagnosed with a permanent infertility (oligozoospermia, azoospermia) with significant psychological consequences (Gies et al., 2015; Jahnukainen et al., 2015).

Because of the potential long-term sequelae of cancer treatment on reproductive functions, fertility preservation options have been developed and are proposed to patients prior to cancer therapy (Baert et al., 2012; Gies et al., 2015; Jahnukainen et al., 2015; Onofre et al., 2016; Picton et al., 2015; Wyns et al., 2015). For adolescents and adults, spermatozoa can be cryopreserved before the start of gonadotoxic treatments and later used for assisted reproductive techniques. For prepubertal boys, however, cryopreserving the testicular tissue that contains SSC is so far the only option. Cryopreservation (slow freezing or vitrification) and thawing-warming procedures have been optimized for immature testicular tissues in order to minimize ice crystal formation and cellular damage (Baert et al., 2012; Poels et al., 2013). The development of optimal controlled slow freezing (CSF) and solid surface vitrification (SSV) protocols that preserve not only the architecture of mouse prepubertal tissue but also its exocrine and endocrine functions have previously been described (Arkoun et al., 2016; Dumont et al., 2015; Milazzo et al., 2008).

In order to restore the fertility of cancer survivors who became sterile, thawed testicular tissues could theoretically be matured by in-vivo or in-vitro approaches to produce spermatozoa for assisted reproduction (de Michele et al., 2017; Gies et al., 2015; Ibtisham et al., 2017; Yokonishi and Ogawa,

2016). The in-vivo differentiation of SSC could be achieved after autologous transplantation or autograft or eventually after xenotransplantation or xenograft (Goossens et al., 2013; Milazzo et al., 2010; Poels et al., 2013). To avoid the potential reintroduction of malignant cells to surviving patients during autotransplantation of cryopreserved testicular tissue or cells, especially to those treated for lymphoblastic acute leukaemia, testicular tissues could be matured in vitro (Jahnukainen et al., 2015). Tridimensional and organotypic cultures are so far the only methods that have allowed the production of spermatozoa from prepubertal murine testes (Abu Elhija et al., 2012; Arkoun et al., 2016; Dumont et al., 2015; Sato et al., 2011; Yokonishi et al., 2014). Notably, a complete in-vitro spermatogenesis could be achieved in cryopreserved (slow freezing or vitrification) mouse prepubertal testicular tissues cultured at a gas-liquid interphase (Arkoun et al., 2016; Dumont et al., 2015; Yokonishi et al., 2014). Moreover, these data showed that supplementing the culture medium with 10^{-6} mol/l retinol promoted SSC differentiation and entry into meiosis as well as sperm production in fresh or cryopreserved testes (Arkoun et al., 2015; Dumont et al., 2016, 2017; Rondanino et al., 2017). A recent study confirmed that retinoic acid and retinol play crucial roles in the onset of spermatogonial differentiation and meiotic initiation under organ culture conditions (Sanjo et al., 2018). The addition of FSH, crucial for the initiation and progression of spermatogenesis, together with retinol in the medium, had no additive effect on the spermatogenic yield (Arkoun et al., 2015).

It was recently reported that most in-vitro generated spermatozoa were haploid, contained unfragmented DNA and normally condensed chromatin, like their in-vivo counterparts (Oblette et al., 2017). Although the microinjection of in-vitro produced spermatozoa into oocytes was capable of producing reproductively competent offspring (Sato et al., 2011; Yokonishi et al., 2014) with an almost normal state of methylation for 11 imprinted genes (Yokonishi et al., 2014), the epigenetic modifications of germ cells in cultured prepubertal testes have never been studied. However, epigenetic marks, including DNA methylation and histone post-translational modifications (PTM), are important during spermatogenesis

for the proper maturation of gametes, and after fertilization the inherited marks play an essential role during embryonic development and can later influence offspring health and behaviour (Boissonnas et al., 2013; Champroux et al., 2018; Jenkins et al., 2017; Stewart et al., 2016; Stuppia et al., 2015; Yao et al., 2015). DNA methylation is an epigenetic mechanism involving the covalent transfer of a methyl group onto the C5 position of cytosine to form the heritable mark 5-methylcytosine (5mC). This epigenetic modification, which is catalysed by DNA methyltransferases (DNMT), represses the expression of numerous genes. DNMT1 is responsible for the maintenance of DNA methylation profiles during cell divisions (Uysal et al., 2016). DNMT3a and DNMT3b catalyse de-novo DNA methylation in a heterodimer with the non-catalytic DNMT3L (Uysal et al., 2016). During mouse development, the genome of primordial germ cells undergoes a wave of demethylation between 8 and 13.5 days post-coitum (Boissonnas et al., 2013). De-novo methylation marks are then established in a sex-specific manner. In males, de-novo DNA methylation to establish paternally imprinted loci begins at around 15.5 days post-coitum and continues after birth in spermatogonia and spermatocytes. The process of de-novo DNA methylation appears to be complete at the pachytene spermatocyte stage (Boissonnas et al., 2013; Yao et al., 2015). Knocking out the mouse *Dnmt1* gene was shown to induce embryonic lethality, and disruption of *Dnmt3a* and *Dnmt3l* genes led to impaired spermatogenesis (Jenkins and Carrell, 2012; Uysal et al., 2016). In men, abnormal sperm DNA methylation patterns have been associated with infertility, poor embryo quality and congenital diseases in the offspring (Cui et al., 2016; Gunes et al., 2016; Kitamura et al., 2015; McSwiggin and O'Doherty, 2018; Santi et al., 2017; Stuppia et al., 2015). Histone PTM, such as methylation and acetylation, have been reported to be associated with chromatin remodelling during spermatogenesis, including histone-to-protamine replacement occurring within germ cells during spermiogenesis. Histone methylation corresponds to the addition of one or several methyl groups on lysine (K) or arginine (R) residues by histone methyltransferases (e.g. PRDM9) and can be reversed by histone demethylases (e.g. JARID1B). PRDM9, which catalyses the

trimethylation of lysine 4 of histone H3 (H3K4me3), is essential for progression through early meiotic prophase, including homologous chromosome pairing, DNA double-strand break repair and sex body formation (Hayashi *et al.*, 2005). This mark is associated with transcriptionally active genes and is also enriched at developmental gene promoters within spermatozoa (Hammoud *et al.*, 2011). The acetylation of histones on lysine residues, an epigenetic modification found in transcriptionally active chromatin regions, is catalysed by histone acetyltransferases (e.g. SRC1) and reversed by histone deacetylases (e.g. SIRT1, HDAC1). An increase in the acetylation of histones H3 and H4 is observed in spermatogonia and spermatids compared with spermatocytes (Boissonnas *et al.*, 2013; Luense *et al.*, 2016). The H3K9ac mark is essential for the progression of spermiogenesis: alterations in H3K9ac levels induce morphological abnormalities and apoptosis of round spermatids (Dai *et al.*, 2015). Mice with a specific deletion of *Sirt1* in male germ cells exhibit a defect in histone-to-protamine transition, altered chromatin condensation, defects in acrosome biogenesis and decreased fecundity (Bell *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2017). Moreover, a premature acetylation of histone H4 in spermatocytes or a decrease of histone acetylation in spermatids have been reported in infertile men exhibiting impaired spermatogenesis (Sonnack *et al.*, 2002). Alterations in the genomic distribution of the heritable marks H3K4me3, H3K9ac and H4K12ac have also been described in the spermatozoa of infertile men (Hammoud *et al.*, 2011; Steilmann *et al.*, 2011; Vieweg *et al.*, 2015).

It has been demonstrated that DNMT1 and DNMT3A expression levels, DNA methylation status of germ cells and several histone PTM (H3K4me3, H3K9ac, H4K12ac, H4K16ac) were unchanged after in-vivo maturation of SSC from prepubertal mouse testes by transplantation or graft (Goossens *et al.*, 2011). However, H4K5ac and H4K8ac marks were altered after SSC transplantation (Goossens *et al.*, 2011). It appears therefore imperative to ascertain that DNA methylation and histone PTM are not altered in the germline in organotypic cultures before applying in-vitro maturation procedures to cryopreserved testicular tissue from prepubescent boys. So far, the

maintenance of DNA methylation has only been shown in 2- to 4-day cultures of rat fetal testes (Rwigemera *et al.*, 2017) and in 7- to 21-day cultures of marmoset adult testes (Langenstroth-Röwer *et al.*, 2017). Histone PTM (H3K4me2, H3K4me3) were also maintained in short-term cultures (Rwigemera *et al.*, 2017).

In the present work, fresh, CSF or SSV mouse prepubertal testicular tissues were cultured for 30 days at a gas-liquid interphase in the presence of retinol alone or alternate retinol/FSH. The progression of in-vitro spermatogenesis was analysed. DNA methylation, active histone marks (H3K4me3, H3K9ac, H4K8ac) and the expression of catalytic DNMT and histone-modifying enzymes were studied in germ cells prior and following in-vitro maturation.

MATERIALS AND METHODS

Mice, testes collection and ethical approval

Prepubertal 6- to 7-day-old CD-1 male mice (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) were euthanized by decapitation. Testes were excised, rinsed and the tunica albuginea was removed in minimum essential medium alpha (α -MEM) at 4°C (Gibco™ by Life Technologies, Saint-Aubin, France). Testes were then divided into several batches and cultured either directly (culture of fresh tissues) or after CSF or SSV and thawing-warming (Supplementary Figure 1). In order to evaluate the impact of the cryopreservation procedures on the testicular tissues before culture, fresh, CSF and SSV testes from mice aged 6–7 dpp were analysed (Supplementary Figure 1). Moreover, mice aged 36–37 dpp were euthanized by CO₂ asphyxiation and their testes were used as in-vivo controls for testes cultured *in vitro* for 30 days (Supplementary Figure 1). In total, 42 testes (14 fresh, 14 CSF, 14 SSV) from 21 mice aged 6–7 dpp were used for the analyses performed before culture; 72 testes (24 fresh, 24 CSF, 24 SSV) from 39 mice aged 6–7 dpp were used for in-vitro maturation; and 20 testes from 13 mice aged 36–37 dpp were used as in-vivo controls. A total of 134 testes from 73 mice were therefore used in this study (Supplementary Figure 1).

This study was conducted in accordance with the 3Rs principle. All the experimental procedures were approved

by the Institutional Animal Care and Use Committee of Rouen University Hospital under the licence/protocol number N/23-11-12/46/11-15 on 29 November 2012.

CSF and thawing of testicular tissues

Freezing procedure

Testes were frozen as previously described (Arkoun *et al.*, 2016; Milazzo *et al.*, 2008). Briefly, testes were incubated in cryotubes containing 1.3 ml of freezing medium: Leibovitz L-15 medium (Eurobio, Courtabœuf, France) supplemented with 1.5 mol/l dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), 0.05 mol/l sucrose (Sigma-Aldrich) and 10% (v/v) fetal calf serum (FCS, Eurobio). CSF was performed in a programmable freezer (Nicol Freezal, Air Liquide, Marne-la-Vallée, France) with the following protocol: start at 5°C, then -2°C/min until reaching -9°C, stabilization at -9°C for 7 min, then -0.3°C/min until -40°C and -10°C/min down to -140°C. The samples were then stored in liquid nitrogen.

Thawing procedure

Cryotubes were thawed for 1 min at room temperature and then for 3 min at 30°C in a water bath. Testicular tissues were then successively incubated at 4°C in baths containing decreasing concentrations of cryoprotective agents for 5 min each (*bath 1*: 1 mol/l DMSO, 0.05 mol/l sucrose, 10% FCS, Leibovitz L15; *bath 2*: 0.5 mol/l DMSO, 0.05 mol/l sucrose, 10% FCS, Leibovitz L15; *bath 3*: 0.05 mol/l sucrose, 10% FCS, Leibovitz L15; *bath 4*: 10% FCS, Leibovitz L15).

SSV and warming of testicular tissues

Vitrification procedure

Testes were vitrified as previously described (Dumont *et al.*, 2015). Briefly, samples were incubated for 10 min at 4°C in Dulbecco's modified Eagle's medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12, Sigma-Aldrich) supplemented with 1.05 mol/l DMSO and 1.35 mol/l ethylene glycol (Sigma-Aldrich) and then for 5 min at 4°C in DMEM/F12 supplemented with 2.1 mol/l DMSO, 2.7 mol/l ethylene glycol, 0.5 mol/l sucrose and 20% FCS. Testis samples were then dropped onto a thin aluminium floater (VWR, Fontenay-sous-Bois, France) partially immersed in liquid nitrogen. Vitrified testes were stored in cryotubes in liquid nitrogen.

Warming procedure

Cryotubes were left at room temperature for 2 s. Testes were incubated in DMEM/F12 supplemented with 0.5 mol/l sucrose and 20% FCS for 2 min at 37°C, and then in DMEM/F12 supplemented with 20% FCS for 2 min at 37°C. They were then successively transferred into four baths of DMEM/F12 supplemented with 20% FCS for 5 min at 4°C.

Organotypic cultures

In-vitro tissue cultures were performed at a gas-liquid interphase as previously described (Arkoun *et al.*, 2016; Dumont *et al.*, 2015; Sato *et al.*, 2011; Yokonishi *et al.*, 2014). Briefly, fresh or frozen-thawed or vitrified-warmed testes were first cut into four fragments. They were placed on the top of two 1.5% (w/v) agarose Type I low EEO gels (Sigma-Aldrich) half-soaked in base medium containing α -MEM, 10% KnockOut™ Serum Replacement (KSR, Gibco™ by Life Technologies) and 5 μ g/ml gentamicin (Sigma-Aldrich). Testicular tissues were then cultured in six-well plates (Dominique Dutscher, Brumath, France) under 5% CO₂ at 34°C for 30 days (D30), which corresponds to the end of the first spermatogenic wave. In the Rol condition, testicular fragments were cultured with base medium supplemented with 10⁻⁶ mol/l retinol (Sigma-Aldrich). In the Rol/FSH condition, testicular samples were alternately cultured with base medium containing 10⁻⁶ mol/l retinol or 500 IU/l recombinant FSH (Gonal-f®, Merck Serono, Lyon, France), with retinol being added every 8 days to coincide with the entry of spermatogonia into meiosis. In total, 288 testicular fragments from 72 testes were in-vitro cultured and analysed. RT-qPCR analyses were repeated using three mice, with *Dnmt1* and *Dnmt3a* being analysed in one testis from each mouse and *Prdm9*, *Jarid1b*, *Src1*, *Sirt1* and *Hdac1* being analysed from the other testes of each mouse. Immunohistochemical analyses were repeated using four testes from two mice for DNMT1, DNMT3a and 5mC, and using four testes from two other mice for H3K4me3, H3K9ac and H4K8ac.

RNA extraction, reverse transcription and qPCR

RNA extraction

Total RNA was extracted from testicular samples (around 2 mg) using the RNeasy Micro Kit (QIAGEN, Courtabœuf, France) according to the manufacturer's instructions. To remove contamination

with genomic DNA, RNA was incubated with two units of TURBO DNase (Life Technologies) for 45 min at 37°C.

Reverse transcription

cDNA synthesis was performed using qScript™ cDNA SuperMix (Quanta Biosciences by VWR) according to the manufacturer's instructions using the following program: 5 min at 25°C, 30 min at 42°C and 5 min at 85°C.

qPCR

cDNA amplifications were carried out in a total volume of 20 μ l containing 2 μ l of cDNA templates diluted 1:10 (10 ng) in sterile water, 10 μ l of Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Saint-Aubin, France) and 300 nmol/l of each primer. Specific primers are listed in Supplementary Table 1. Reactions were performed in 96-well plates (Invitrogen by Life Technologies) in a StepOnePlus thermocycler (Applied Biosystems). Annealing temperatures were optimized for all primer sets (Supplementary Table 1) and the efficiency of the reactions was determined using serial dilutions of cDNA samples. The amplification condition was 20 s at 95°C followed by 40 cycles (3 s at 95°C, 30 s at the annealing temperature). Melting curves were also obtained to ensure the specificity of polymerase chain reaction (PCR) amplifications. The size of the amplicons was verified by agarose gel electrophoresis (E-gel 4%, Life Technologies). The relative expression level of each gene (*Dnmt1*, *Dnmt3a*, *Prdm9*, *Jarid1b*, *Src1*, *Sirt1* and *Hdac1*) was normalized to the housekeeping gene *Gapdh*. Data were analysed using the 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} method.

Histological analyses

Tissue fixation and processing

Testicular tissues were fixed with Bouin's solution (Sigma-Aldrich) for 2 h at room temperature. They were then dehydrated in ethanol in the Citadel 2000 tissue processor (Shandon, Cheshire, UK) and embedded in paraffin.

Tissue sectioning. Tissue sections (3 μ m thick) were performed with the JungRM 2035 microtome (Leica) and were mounted on Polysine slides (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Immunohistochemical staining

Tissue sections were deparaffinized in two baths of xylene for 5 min and rehydrated in decreasing concentrations

of ethanol. After a 5-min wash in Tris buffer containing 10% Tween-20 (TBST, Microm Microtech, Francheville, France), sections were incubated for 40 min at 96°C in 10 mmol/l citrate buffer (pH 6.0) and then cooled for 20 min at room temperature. Endogenous peroxidases were blocked with HP Block (Dako, Les Ulis, France) for 5 min at room temperature. Sections were washed for 5 min in distilled water and blocked with Ultra-V blocking solution (Thermo Fisher Scientific) for 10 min at room temperature. They were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies: rabbit polyclonal anti-DNMT1 IgGs (1:100 for 36–37 dpp in-vivo testes and 30-day cultures of testicular tissues, 1:200 for 6–7 dpp testes, ab19905, Abcam, Paris, France), rabbit polyclonal anti-DNMT3a IgGs (1:1250, SC-20703, SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), mouse monoclonal anti-5mC IgGs (1:50, 16233D3, Merck Millipore, Fontenay-sous-Bois, France), rabbit polyclonal anti-H3K4me3 IgGs (1:200 for 36–37 dpp in-vivo testes and 30-day cultures of testicular tissues, 1:500 for 6–7 dpp testes, ab8580, Abcam), rabbit polyclonal anti-H3K9ac IgGs (1:50, ab61231, Abcam) or rabbit polyclonal anti-H4K8ac IgGs (1:1500 for 36–37 dpp in-vivo testes and 30-day cultures of testicular tissues, 1:2000 for 6–7 dpp testes, ab15823, Abcam). After a 5-min wash in TBST, biotinylated goat anti-rabbit antibodies (1:200, Santa Cruz, 25 min for DNMT1, DNMT3a and H3K9ac; undiluted, Thermo Fisher Scientific, 5 min for H3K4me3 and H4K8ac) or anti-mouse antibodies (Thermo Fisher Scientific, for 5mC) were applied at room temperature. The immunoreaction was visualized after incubation with horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (Thermo Fisher Scientific) for 5 min at room temperature followed by the addition of 3,3'-diaminobenzidine (Thermo Fisher Scientific) for around 10 s (DNMT1 and H3K9ac), 20 s (DNMT3a), 30 s (H3K4me3) or 40 s (5mC and H4K8ac). Sections were finally counterstained with haematoxylin (Dako) for 15 s and mounted with Eukitt (CML, Nemours, France). Immunostaining with pre-immune rabbit IgGs (SC-2027, SantaCruz Biotechnology) or mouse IgGs (SC-2025, SantaCruz Biotechnology) was used as a negative control (Supplementary Figure 2). Images were acquired at a \times 500 magnification on a DM4000B light microscope

(Leica, Solms, Germany) equipped with the Leica Application Suite Core v2.4 software.

In each testicular sample analysed, the expression and localization of DNMT1 and DNMT3a, the presence of 5mC residues and modified histones (H3K4me3, H3K9ac and H4K8ac) and the number of each cell type (Sertoli cells: irregular nuclei, spermatogonia: smooth spherical nuclei close to the basal membrane, leptotene/zygotene spermatocytes: irregular spherical nuclei with condensed chromatin, pachytene spermatocytes: irregular spherical nuclei with highly condensed chromatin, round spermatids: small and regular round nuclei, elongated spermatids: elongated nuclei with highly condensed chromatin) per seminiferous tubule were analysed in 30 cross-sectioned seminiferous tubules from three different sections. For in-vivo controls, the 30 seminiferous tubules were examined in multiple microscopic fields chosen at random. However, almost all seminiferous tubules present in in-vitro matured testes were analysed because of the small size of the testicular fragments. The percentage of each germ cell type that stained positive for DNMT1, DNMT3a, 5mC, H3K4me3, H3K9ac and H4K8ac was calculated in each seminiferous tubule.

Sperm DNA methylation

Testicular sperm extraction

Testicular spermatozoa were extracted from a pool of six testes (from six different mice) for each condition. Briefly, tissues were placed in α -MEM pre-warmed at 37°C. After the careful removal of the central necrotic area using 27-gauge needles, tissues were mechanically dispersed. After a 10-min centrifugation at 300g, pellets containing testicular cells were recovered. Cells were fixed with methanol for 30 min at -20°C and then spread onto glass slides.

Immunofluorescent staining of 5mC

After 5 min in TBST at room temperature, cells were permeabilized in acetone for 2 min. Nuclei were decondensed with 1 mol/l NaOH for 4 min and in TBST containing 10 mmol/l dithiothreitol and 0.1% (v/v) Triton X-100 (Sigma-Aldrich) for 20 min at 4°C. Slides were washed twice in TBST for 5 min and non-specific binding sites were blocked with 5% (w/v) horse serum albumin in TBST (Sigma-Aldrich). They were

then incubated overnight at 4°C with mouse monoclonal anti-5mC IgGs (1:50, 16233D3, Merck Millipore). After two washes in TBST for 5 min, Alexa Fluor 488 conjugated-goat anti-mouse IgGs (1:200, ab150113, Abcam) were applied for 1 h at room temperature. After a 10-min wash, cells were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Counterstain I, 30-804931, Adgenix, Voisins-Le-Bretonneux, France). A negative control was carried out by omitting the primary antibody. Images were captured at a \times 900 magnification by a U-CMAD3 camera mounted on a BX61 epifluorescence microscope (Olympus), with a fixed acquisition and exposure for each condition. Image acquisitions were carried out using the Bioview 234 Duet v2.3 image analyser (Nes Ziona, Israël).

Fluorescence intensity quantification

For each experimental condition, 100 spermatozoa (from a pool of six different in-vitro cultured testes or from six in-vivo testes), identified by their hook-shaped heads, were examined. The border around the sperm nuclei was manually delineated according to DNA staining. After subtracting the background, 5mC and DAPI fluorescence intensities were calculated for each spermatozoon using the ImageJ v1.8 software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). For each sperm nucleus, the fluorescence of 5mC was divided by the fluorescence of DAPI to obtain normalized 5mC fluorescence.

Statistical analyses

Statistical analyses were carried out with the statistical GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). To evaluate the impact of the cryopreservation procedure on testicular tissue, data obtained from fresh 6–7 dpp testes were compared with those obtained from CSF or SSV 6–7 dpp testes using the non-parametric Kruskal–Wallis test followed by the Dunn *post hoc* test. Data from 36–37 dpp testes and from 30-day cultured tissues, as well as data from cultures of fresh, CSF and SSV testicular tissues were also compared using the non-parametric Kruskal–Wallis test followed by the Dunn *post hoc* test. Cultures performed under the Rol or Rol/FSH conditions were compared using the non-parametric Mann–Whitney test. Finally, the normalized 5mC fluorescence intensities were compared using the non-parametric Mann–Whitney test. Data are

expressed as mean \pm SD. For each test, a value of $P < 0.05$ (*) or $P < 0.01$ (**) was considered statistically significant.

RESULTS

DNA methylation and histone PTM in fresh or cryopreserved prepubertal mouse testicular tissue

To determine whether the transcripts encoding epigenetic modification enzymes are present in 6–7 dpp testes and whether their levels are altered by a freezing–thawing or a vitrification–warming cycle, qPCR analyses were performed on fresh, CSF or SSV testicular tissues. *Dnmt1* and *Dnmt3a* transcripts encoding catalytic DNMT, *Prdm9* and *Jarid1b* transcripts encoding a histone methyltransferase and demethylase, respectively, *Src1* transcripts encoding a histone acetyltransferase, and *Sirt1* and *Hdac1* transcripts encoding histone deacetylases were detected at 6–7 dpp (FIGURE 1A and B). Moreover, mRNA levels were not significantly different between fresh and cryopreserved testes, regardless of the cryopreservation protocol used, except for lower *Hdac1* mRNA levels in SSV versus fresh and CSF testes (both $P < 0.05$; FIGURE 1A and B).

The expression of the catalytic DNMT and the presence of the epigenetic marks 5mC, H3K4me3, H3K9ac and H4K8ac were then studied in prepubertal testes by immunohistochemistry (FIGURE 1C). At 6–7 dpp, seminiferous tubules only contained Sertoli cells and spermatogonia. DNMT1 and 5mC were detected in a majority of spermatogonia, and no significant difference was observed between fresh, CSF and SSV testes (FIGURE 1D). In contrast, spermatogonia did not express DNMT3a in fresh tissues while around 24% of spermatogonia expressed this enzyme in CSF tissues ($P < 0.05$, FIGURE 1D). The three modified histones were found in a minority of spermatogonia in both fresh and cryopreserved testes (FIGURE 1E).

Advancement of spermatogenesis in 30-day in-vitro cultures of 6–7 dpp testicular tissues

As previously described (Arkoun *et al.*, 2015, 2016; Dumont *et al.*, 2016, 2017; Rondanino *et al.*, 2017), a complete spermatogenesis can be achieved *in vitro* within fresh, CSF and SSV prepubertal testicular tissues after 30 days of culture in the presence of 10^{-6} mol/l retinol (Rol

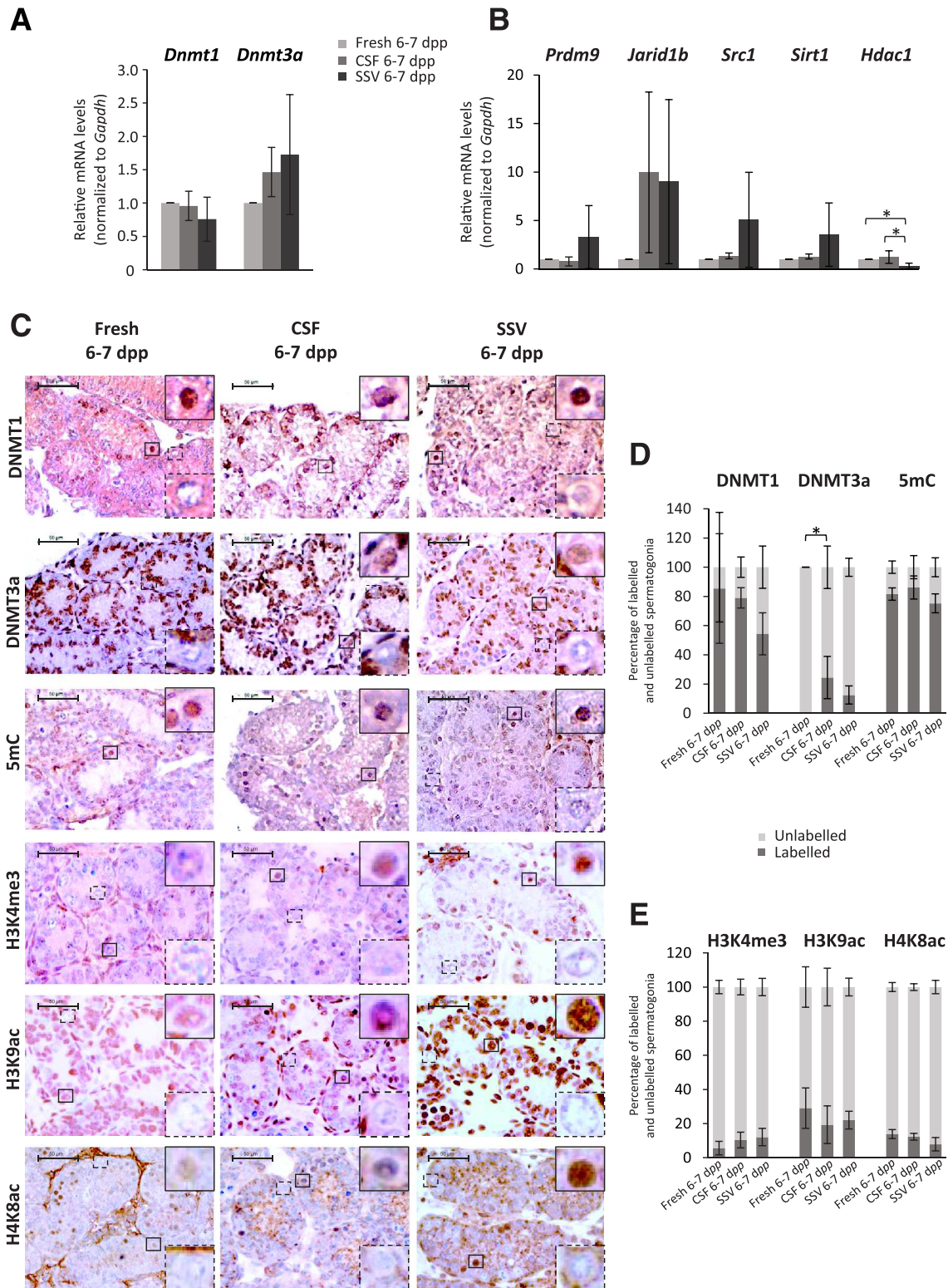


FIGURE 1 Expression of epigenetic modification enzymes, DNA methylation and histone post-translational modifications in fresh and cryopreserved prepubertal mouse testes. (A) Relative mRNA levels of the *Dnmt1* and *Dnmt3a* genes normalized to the housekeeping gene *Gapdh* in fresh, CSF and SSV 6–7 dpp testes ($n = 3$). Histograms are expressed as mean \pm SD. (B) Relative mRNA levels of the *Prdm9*, *Jarid1b*, *Src1*, *Sirt1* and *Hdac1* genes normalized to the housekeeping gene *Gapdh* in fresh, CSF and SSV 6–7 dpp testes ($n = 3$). Histograms are expressed as mean \pm SD. * $P < 0.05$. (C) Localization of DNMT1, DNMT3a and the 5mC, H3K4me3, H3K9ac and H4K8ac epigenetic marks in fresh, CSF and SSV 6–7 dpp testes ($n = 4$). Representative microscopy images of DNMT1, DNMT3a, 5mC, H3K4me3, H3K9ac and H4K8ac labelling are shown. Antibody binding was visualized using 3,3'-diaminobenzidine (brown staining) and tissue sections were counterstained with haematoxylin. Enlarged views of labelled and unlabelled spermatogonia are shown in the upper right corner and in the lower right corner, respectively. Bar: 50 μ m. (D) Proportion of DNMT1, DNMT3a and 5mC-positive spermatogonia in 30 cross-sectioned seminiferous tubules of fresh, CSF and SSV 6–7 dpp

TABLE 1 ASSESSMENT OF GERM CELL DIFFERENTIATION IN SEMINIFEROUS TUBULES

	% of cell types present in seminiferous tubule sections						
	36–37 dpp	Fresh + Rol D30	Fresh + Rol/FSH D30	CSF + Rol D30	CSF + Rol/FSH D30	SSV + Rol D30	SSV + Rol/FSH D30
Sertoli cells	9.11 (2.43)	33.13 (2.50) ^a	29.64 (5.96) ^a	39.17 (4.44) ^b	37.33 (4.78) ^c	33.59 (6.14) ^d	29.38 (5.90) ^e
Spermatogonia	7.89 (1.53)	14.78 (4.61) ^a	14.45 (3.31) ^a	20.12 (4.49) ^b	19.18 (1.92) ^c	15.94 (4.04)	15.65 (4.49) ^e
Leptotene/zygotene spermatocytes	3.24 (1.64)	4.91 (5.39)	11.91 (5.63) ^{a,b}	3.20 (1.53)	9.28 (4.28) ^d	3.34 (1.85)	5.69 (4.50) ^f
Pachytene spermatocytes	24.40 (2.97)	22.50 (6.12) ^a	21.63 (3.86) ^a	26.85 (5.60)	27.06 (6.25) ^c	27.42 (4.64)	32.90 (4.27) ^c
Round spermatids	37.70 (2.55)	15.15 (1.95) ^a	15.13 (5.34) ^a	7.31 (3.75) ^b	5.18 (2.60) ^c	13.83 (4.75) ^d	11.83 (3.70) ^e
Elongated spermatids	17.66 (4.32)	9.53 (3.06) ^a	7.24 (3.27) ^{a,b}	3.35 (1.05) ^b	1.97 (1.50) ^{c,d}	5.88 (2.20)	4.55 (2.53) ^e

Data are presented as the mean (SD) with $n = 4$ for 36–37 dpp, Fresh + Rol D30, Fresh + Rol/FSH D30, CSF + Rol D30, CSF + Rol/FSH D30, SSV + Rol D30, SSV + Rol/FSH D30.

CSF = controlled slow freezing; D30 = 30-day tissue culture; dpp = days post-partum; Rol = retinol; Rol/FSH = retinol/follicle stimulating hormone; SSV = solid surface vitrification.

^a Values significantly different with 36–37 dpp ($P < 0.05$).

^b Values significantly different with Fresh + Rol D30 ($P < 0.05$).

^c Values significantly different with Fresh + Rol/FSH D30 ($P < 0.05$).

^d Values significantly different with CSF + Rol D30 ($P < 0.05$).

^e Values significantly different with CSF + Rol/FSH D30 ($P < 0.05$).

^f Values significantly different with SSV + Rol D30 ($P < 0.05$).

culture condition). Indeed, germ cells at all stages of differentiation were found after organotypic cultures (TABLE 1). In an effort to further increase the yield of in-vitro produced spermatozoa, the supplementation of culture medium with FSH alternating with retinol (Rol/FSH culture condition) was tested in this study. The progression of spermatogenesis in cultures of fresh, CSF and SSV tissues cultured with Rol or Rol/FSH was evaluated and compared by determining the proportion of the different germ cell types per seminiferous tubule as well as the proportion of seminiferous tubules at the most advanced stage of differentiation.

First, the progression of spermatogenesis in 30-day cultures of fresh tissues and in the 36–37 dpp age-matched in-vivo controls was controlled. The proportion of pachytene spermatocytes and of round and elongated spermatids per tubule were lower in cultures of fresh tissues than *in vivo* (TABLE 1). The proportion of tubules having reached the pachytene spermatocyte and the round spermatid stages was higher in cultures of fresh tissues than in controls (TABLE 2). In contrast, the percentage of tubules

with elongated spermatids as the most advanced stage was significantly reduced in cultures of fresh tissues compared with *in vivo* ($P < 0.05$; TABLE 2).

The impact of the cryopreservation procedures on the advancement of spermatogenesis was then investigated. The different germ cell types were also present in CSF and SSV tissues following in-vitro maturation with Rol or Rol/FSH (TABLE 1). The proportion of pachytene spermatocytes per tubule was similar between cultures of fresh, CSF and SSV tissues in the presence of Rol. With Rol/FSH, however, the percentage of pachytene spermatocytes per tubule was higher in cultures of cryopreserved tissues than in fresh tissues (TABLE 1). The proportion of round and elongated spermatids per tubule was lower in cultures of CSF tissues than in fresh tissues, whatever the medium used (TABLE 1). This diminution was not observed in SSV tissues. The proportion of elongated spermatids per seminiferous tubule was even more elevated in cultures of SSV tissues with Rol/FSH than in cultures of CSF tissues (TABLE 1). The percentage of tubules with pachytene spermatocytes as the most

advanced type of germ cells was more elevated in CSF tissues matured in the presence of Rol or Rol/FSH and in SSV tissues matured in the presence of Rol/FSH than in fresh tissues (TABLE 2). The percentage of seminiferous tubules in which round spermatids are the most differentiated germ cells were almost similar in cultures of fresh, CSF and SSV tissues. Indeed, their proportion was only lower in cultures of SSV tissues with Rol/FSH (TABLE 2). Finally, fewer tubules reached the elongated spermatid stage in CSF tissues cultured with Rol or Rol/FSH and in SSV tissues cultured with Rol than in fresh tissues (TABLE 2).

Finally, the Rol and Rol/FSH culture conditions were compared. The proportion of Sertoli cells, spermatogonia, pachytene spermatocytes and round spermatids per tubule was not significantly different when FSH was added in cultures of fresh or cryopreserved tissues (TABLE 1). In addition, the proportion of elongated spermatids per tubule was reduced in cultures of fresh and CSF tissues with Rol/FSH (TABLE 1). The percentage of tubules in which pachytene spermatocytes are the most

FIGURE 1 (Continued) testes ($n = 4$). Histograms are expressed as mean \pm SD. * $P < 0.05$. (E) Proportion of H3K4me3, H3K9ac and H4K8ac-positive spermatogonia in 30 cross-sectioned seminiferous tubules of fresh, CSF and SSV 6–7 dpp testes ($n = 4$). Histograms are expressed as mean \pm SD. CSF = controlled slow freezing; *Dnmt*/DNMT = DNA methyltransferase; dpp = days post-partum; *Gapdh* = glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; H3K4me3 = trimethylated histone H3 on lysine 4; H3K9ac = acetylated histone H3 on lysine 9; H4K8ac = acetylated histone H4 on lysine 8; *Hdac1* = histone deacetylase 1; *Jarid1b* = Jumonji AT-rich interactive domain 1b; 5mC = 5-methylcytosine; *Prdm9* = PR domain-containing 9; *Sirt1* = sirtuin 1; *Src1* = steroid receptor coactivator 1; SSV = solid surface vitrification.

TABLE 2 PERCENTAGE OF SEMINIFEROUS TUBULES CONTAINING DIFFERENTIATED GERM CELLS AT THE MOST ADVANCED STAGE

	% of seminiferous tubules at the most advanced stage						
	36–37 dpp	Fresh + Rol D30	Fresh + Rol/FSH D30	CSF + Rol D30	CSF + Rol/FSH D30	SSV + Rol D30	SSV + Rol/FSH D30
Spermatogonia	0	0.28 (0.96)	2.05 (2.72) ^a	3.15 (5.90)	6.17 (8.03)	3.33 (5.50)	6.13 (7.85)
Leptotene/zygotene spermatocytes	0	0.28 (0.96)	5.13 (5.89) ^{a,b}	0	6.94 (6.12) ^d	1.94 (4.13)	2.73 (2.29)
Pachytene spermatocytes	0	16.75 (5.08) ^a	27.64 (8.59) ^{a,b}	50.88 (10.82) ^b	55.37 (11.87) ^c	30.56 (15.10) ^d	47.11 (15.46) ^{c,e}
Round spermatids	4.72 (3.76)	33.45 (11.76) ^a	29.07 (9.46) ^a	23.33 (9.64)	18.12 (10.61)	31.11 (9.57)	17.67 (3.43) ^{c,e}
Elongated spermatids	95.28 (3.61)	49.24 (10.86) ^a	36.11 (10.76) ^{a,b}	22.64 (5.92) ^b	13.40 (7.60) ^{c,d}	33.06 (11.41) ^b	26.36 (14.89)

Data are presented as the mean (SD) with $n = 4$ for 36–37 dpp, Fresh + Rol D30, Fresh + Rol/FSH D30, CSF + Rol D30, CSF + Rol/FSH D30, SSV + Rol D30, SSV + Rol/FSH D30.

CSF = controlled slow freezing; D30 = 30-day tissue culture; dpp = days post-partum; Rol = retinol; Rol/FSH = retinol/follicle stimulating hormone; SSV = solid surface vitrification.

^a Values significantly different with 36–37 dpp ($P < 0.05$).

^b Values significantly different with Fresh + Rol D30 ($P < 0.05$).

^c Values significantly different with Fresh + Rol/FSH D30 ($P < 0.05$).

^d Values significantly different with CSF + Rol D30 ($P < 0.05$).

^e Values significantly different with CSF + Rol/FSH D30 ($P < 0.05$).^f Values significantly different with SSV + Rol D30 ($P < 0.05$).

differentiated germ cells was more elevated in fresh or SSV tissues cultured with Rol/FSH than with Rol alone (TABLE 2). Moreover, the percentage of tubules reaching the round spermatid stage was diminished in SSV tissues cultured with Rol/FSH compared with SSV tissues cultured with Rol alone (TABLE 2). The proportion of tubules containing elongated spermatids was higher when fresh or CSF tissues were cultured with Rol than with Rol/FSH (TABLE 2). However this parameter was not influenced by the medium composition in cultures of SSV tissues.

DNA methylation and histone PTM in 30-day in-vitro cultures of fresh 6–7 dpp testicular tissues

Because the best spermatogenic progression was obtained in tissues cultured with Rol, this culture condition was selected for the rest of the study. The impact of organotypic culture and cryopreservation procedures on the expression of epigenetic modification enzymes, on DNA methylation and histone PTM was evaluated in in-vitro matured testicular tissues.

Transcript levels were quantified by qPCR in fresh 6–7 dpp testicular tissues cultured *in vitro* for 30 days and compared with those measured in control 36–37 dpp testes. No significant difference in *Dnmt1* and *Dnmt3a* mRNA levels was found in tissues matured *in vitro* with Rol and in-vivo controls (FIGURE 2A). While the levels of *Prdm9* and *Jarid1b*

transcripts were similar in cultures of fresh tissues and in controls, *Src1*, *Sirt1* and *Hdac1* mRNA levels were lower *in vitro* (FIGURE 2B).

The expression of the DNMT1 and DNMT3a proteins, DNA methylation onto the C5 position of cytosines and the presence of the three active histone marks were detected in a majority of spermatogonia and leptotene/zygotene spermatocytes in 36–37 dpp testes (FIGURES 3 AND 4). Moreover, more than half of round spermatids contained H3K4me3 and H3K9ac at 36–37 dpp while H4K8ac was found in a lower proportion of these cells (FIGURE 4).

The percentage of spermatogonia expressing DNMT1 and DNMT3a was similar in fresh tissues cultured with Rol and *in vivo* (FIGURE 3B). The proportion of leptotene/zygotene spermatocytes expressing DNMT1 in cultures of fresh tissues was also comparable to in-vivo controls (FIGURE 3B). In contrast, a lower percentage of spermatocytes expressing DNMT3a was noticed in tissues cultured with Rol (FIGURE 3B). The percentage of spermatogonia with methylated DNA was reduced in fresh tissues cultured with Rol compared with 36–37 dpp control testes (FIGURE 3B). However, the proportion of leptotene/zygotene spermatocytes with 5mC labelling was not significantly different in fresh tissue cultures and *in vivo* (FIGURE 3B). DNMT1, DNMT3a and 5mC labelling in pachytene spermatocytes, round and elongated spermatids were rarely observed in both

36–37 dpp controls and 30-day cultures of 6–7 dpp testicular tissues. A lower proportion of spermatogonia, round and elongated spermatids containing H3K4me3 was found in cultures of fresh tissues than *in vivo* ($P < 0.05$, FIGURE 4B). The percentage of spermatogonia ($P < 0.05$), round and elongated spermatids ($P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively) containing H3K9ac was also diminished in organotypic cultures compared with *in vivo* (FIGURE 4C). Finally, H4K8ac was found in fewer spermatogonia and leptotene/zygotene spermatocytes in in-vitro matured fresh tissues compared with *in vivo* ($P < 0.05$, FIGURE 4D).

Epigenetic modifications in 30-day in-vitro cultures of CSF or SSV 6–7 dpp testicular tissues

To determine whether cryopreservation of 6–7 dpp testicular tissues could influence the expression of genes encoding epigenetic modification enzymes in 30-day organotypic cultures, qPCR analyses were performed on in-vitro matured CSF or SSV tissues and compared with the data obtained from fresh tissue cultures. While 7.6-fold lower *Dnmt1* mRNA levels were seen in SSV tissues cultured with Rol ($P < 0.05$, FIGURE 2A), *Dnmt1* transcript levels did not vary in a significant manner in cultures of CSF tissues with Rol compared with cultures of fresh tissues (FIGURE 2A). Furthermore, no significant difference in *Dnmt3a* transcript levels was found after culture of fresh or cryopreserved testicular tissues

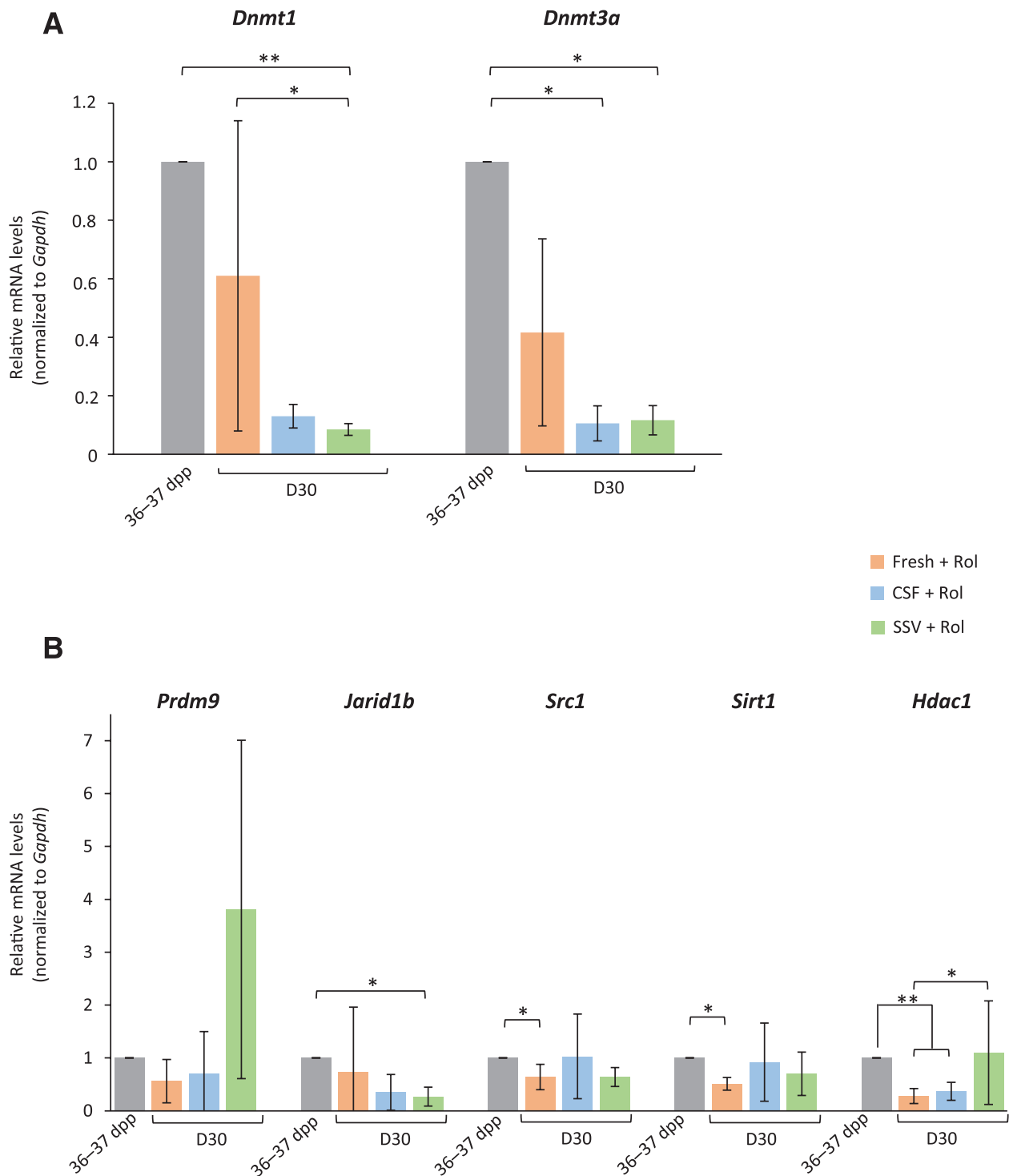


FIGURE 2 Expression of genes encoding epigenetic modification enzymes in cultured testicular tissues and in-vivo controls. Relative mRNA levels of the (A) *Dnmt* genes (*Dnmt1*, *Dnmt3a*) and (B) genes encoding histone-modifying enzymes (*Prdm9*, *Jarid1b*, *Src1*, *Sirt1*, *Hdac1*) normalized to the housekeeping gene *Gapdh* in 30-day cultures of fresh, CSF or SSV testicular fragments with retinol ($n = 3$) and in testes of mice aged 36-37 dpp ($n = 3$). Histograms are expressed as mean \pm SD. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. D30 = day 30; *Dnmt* = DNA methyltransferase; Rol = retinol.

(FIGURE 2A). Moreover, apart from 3.9-fold higher *Hdac1* mRNA levels in cultures of SSV tissues, the levels of the transcripts encoding histone-modifying enzymes were

not significantly different between cultures of fresh, CSF and SSV tissues (FIGURE 2B). However, lower *Dnmt3a* and *Hdac1* mRNA levels were found in cultures of

CSF tissues and lower *Dnmt1*, *Dnmt3a* and *Jarid1b* mRNA levels were found in cultures of SSV tissues compared with in-vivo controls (FIGURE 2).

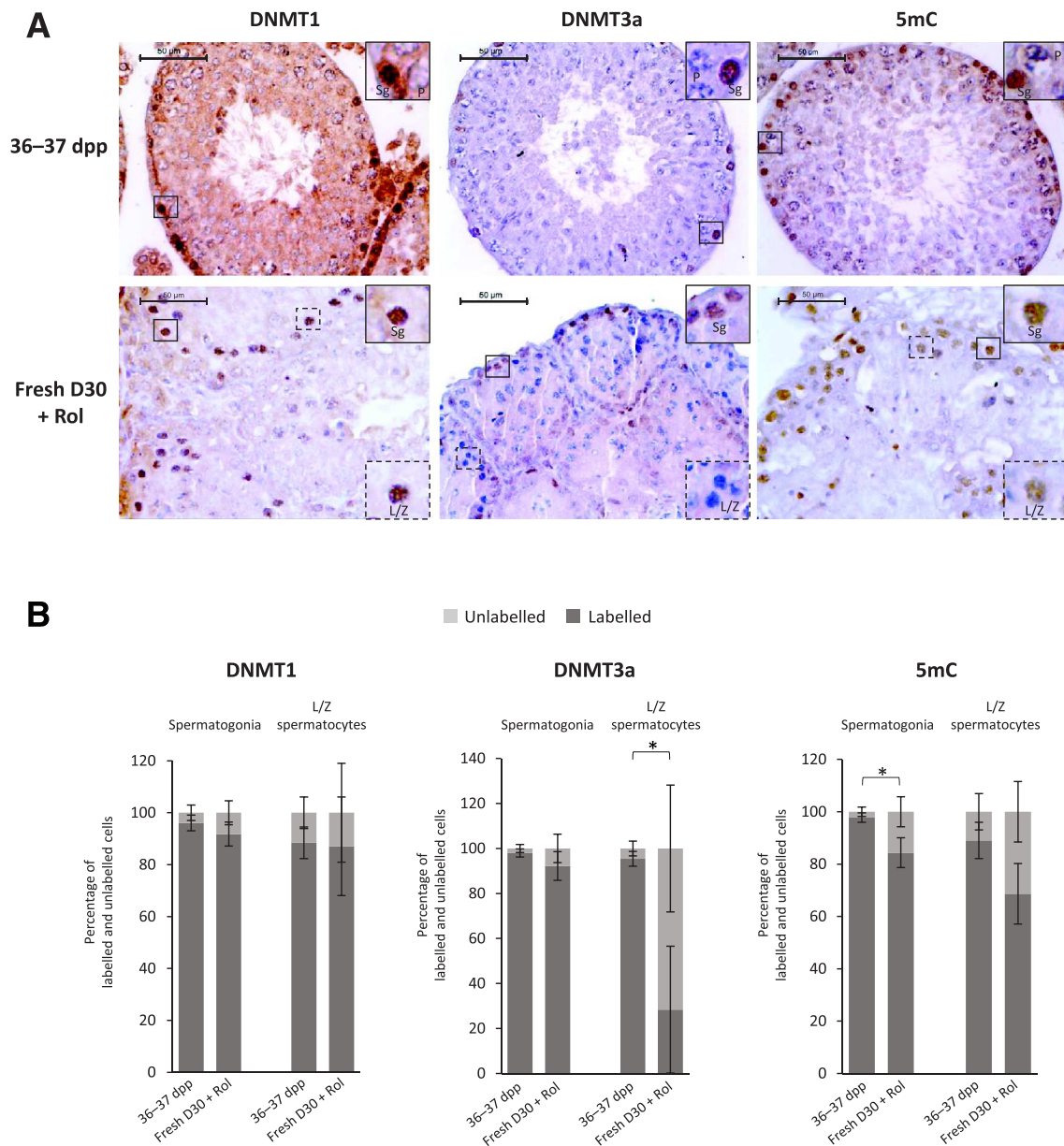


FIGURE 3 Immunolocalization of DNMT1, DNMT3a and 5mC in cultures of fresh prepubertal testes and *in vivo*. (A) Localization of DNMT1, DNMT3a and the 5mC epigenetic mark in fresh testicular fragments cultured for 30 days with retinol ($n = 4$) and in 36-37 dpp testes (*in vivo* controls, $n = 4$). Shown are representative microscopy images of DNMT1, DNMT3a and 5mC labelling. Antibody binding was visualized using 3,3'-diaminobenzidine (brown staining) and tissue sections were counterstained with haematoxylin. Enlarged views of spermatogonia and leptotene/zygotene spermatocytes are shown in the upper right corner and in the lower right corner, respectively. Bar: 50 μm . (B) Proportion of DNMT1, DNMT3a and 5mC-positive spermatogonia and leptotene/zygotene spermatocytes in 30-day cultures of fresh testicular fragments with retinol ($n = 4$) and in control 36-37 dpp testes ($n = 4$). The localization of DNMT1, DNMT3a and 5mC was analysed in 30 cross-sectioned seminiferous tubules from three sections. Histograms are expressed as mean \pm SD. * $P < 0.05$. L/Z = leptotene/zygotene spermatocyte; P = pachytene spermatocyte; Sg = spermatogonia.

DNMT1, DNMT3a, 5mC, H3K4me3, H3K9ac and H4K8ac labelling in CSF or SSV tissue cultures were compared with those observed in fresh tissue cultures (FIGURES 5 AND 6). DNMT1, DNMT3a and the 5mC epigenetic mark were found in a majority of spermatogonia in cultures of fresh, CSF or SSV tissues (FIGURE 5B). Most of the leptotene/

zygotene spermatocytes found in cultures of fresh or cryopreserved tissues expressed DNMT1 and contained 5mC residues (FIGURE 5B). The proportion of leptotene/zygotene spermatocytes expressing DNMT3a did not appear to be different among those under fresh, CSF or SSV conditions (FIGURE 5B). As in the case of fresh tissue cultures,

DNMT1, DNMT3a and 5mC were rarely detected in pachytene spermatocytes, round and elongated spermatids. The proportion of elongated spermatids containing H3K4me3 was higher in cultures of CSF and SSV tissues than in fresh tissues (FIGURE 6B). The proportion of spermatogonia and elongated spermatids containing H3K9ac were more elevated

in cultures of CSF tissues than in fresh tissues (FIGURE 6C). This epigenetic mark was also present in a higher proportion of spermatogonia, round and elongated spermatids in cultures of SSV tissues compared with fresh tissues (FIGURE 6C). Finally, a lower proportion of round spermatids contained H4K8ac in cultures of CSF tissues and the percentage of H4K8ac-positive pachytene spermatocytes was lower in cultures of CSF and SSV tissues than in fresh tissues (FIGURE 6D).

DNA methylation in spermatozoa extracted from 30-day in-vitro cultures of fresh, CSF or SSV 6–7 dpp testicular tissues

Despite attempts using various antigen retrieval procedures in this study, 5mC labelling was rarely detected in germ cells beyond the leptotene/zygotene stage in both in-vivo controls and in-vitro matured testicular tissues. In order to ascertain that the genome of in-vitro produced gametes was methylated, spermatozoa were extracted from cultures of fresh, CSF or SSV tissues, their nuclei were decondensed and the presence of the heritable 5mC epigenetic mark was investigated by immunofluorescence (FIGURE 7). The presence of methylated cytosines was detected in the nuclei of spermatozoa. The expression of 5mC between sperm nuclei was heterogeneous. Specifically, the normalized 5mC fluorescence intensity ranged from 0.01 to 0.85 (median 0.16) in spermatozoa extracted from 36–37 dpp testes (FIGURE 7B). Similar 5mC levels were found in spermatozoa produced in cultures of CSF or SSV tissues (median 0.14 and 0.10, respectively), but lower levels were noticed in spermatozoa generated in cultures of fresh tissues (median 0.10) (FIGURE 7B) compared with in-vivo controls. Because of the low spermatogenic yield in cultures, repeated attempts to analyse the methylation patterns of two imprinted genes (*H19* and *Igf2r*) in extracted spermatozoa by bisulfite pyrosequencing were unsuccessful.

DISCUSSION

In the present study, no major alterations in the expression of DNMT1 and DNMT3a, two essential catalytic DNA methyltransferases, and of DNA methylation, were found in germ cells after in-vitro maturation of fresh or cryopreserved mouse prepubertal testes,

when compared with those allowed to develop *in vivo*. However, differences in the levels of transcripts encoding histone-modifying enzymes and in the distribution of the H3K4me3, H3K9ac and H4K8ac marks were found between in-vitro and in-vivo matured testes.

The fertility of childhood cancer survivors could be restored by producing spermatozoa from SSC with in-vitro or in-vitro approaches (*de Michele et al., 2017; Gies et al., 2015; Ibtisham et al., 2017; Yokonishi and Ogawa, 2016*). It has been previously demonstrated that mouse germ cells from fresh prepubertal testes go through typical DNA methylation after SSC transplantation and testicular tissue grafting, and that germ cells present alteration in H4K5ac and H4K8ac marks after SSC transplantation but not after tissue grafting (*Goossens et al., 2011*). If the methylation status of 11 imprinted genes is almost normal in the offspring derived from in-vitro produced spermatozoa, the examination of DNA methylation in germ cells following organotypic culture is warranted, as previously highlighted (*Yokonishi et al., 2014*). Moreover, histone PTM have never been investigated in in-vitro matured prepubertal testicular tissues.

Fresh or cryopreserved (by CSF or SSV) 6–7 dpp testicular tissues were first analysed in this study. *Dnmt1* and *Dnmt3a* gene expression was detected in these testes, which is in accordance with previous data showing that transcripts were present postnatally (*La Salle et al., 2004; La Salle and Trasler, 2006; Mertineit et al., 1998*). Here, no significant differences in *Dnmt1* or *Dnmt3a* mRNA levels were observed among fresh, CSF and SSV tissues. As previously reported (*La Salle et al., 2004; Mertineit et al., 1998*), the DNMT1 protein was detected in spermatogonia in postnatal testes. In contrast, this enzyme was not found in the mouse prepubertal testis in another study (*Goossens et al., 2011*). Because the age of the mice was not specified, this discrepancy might come from the analysis of testes at different developmental stages. It was observed that spermatogonia present in fresh 6–7 dpp testes contained the 5mC epigenetic mark but did not express DNMT3a. This is consistent with a previous report showing that DNMT3a was only detected in Sertoli and myoid cells while 5mC was present in spermatogonia (*Goossens et al., 2011*).

The presence of methylated cytosines in spermatogonia indicates that methylation profiles were, at least in part, established at this stage. Indeed, following a demethylation wave during embryonic development, spermatogonial precursor cells and spermatogonia then undergo de-novo DNA methylation (*Boissonnas et al., 2013; Kubo et al., 2015; Yao et al., 2015*). While the presence of DNMT1 suggests that DNA methylation profiles are maintained during SSC division, the lack of DNMT3a may, however, mean that de-novo methylation is not occurring in spermatogonia at 6–7 dpp. In the present study, DNMT1 expression and 5mC marks were also observed in spermatogonia of CSF or SSV testes. For unknown reasons and contrary to fresh tissues, DNMT3a was found in spermatogonia in cryopreserved tissues, and may cause in these cells the appearance of abnormal DNA methylation profiles and the repression of gene expression. Moreover, it was shown that the *Prdm9*, *Jarid1b*, *Src1*, *Sirt1* and *Hdac1* genes encoding histone-modifying enzymes were expressed in fresh, CSF and SSV 6–7 dpp testes. In contrast to a previous study (*Goossens et al., 2011*), the H3K9ac mark was detected in a small fraction of spermatogonia. The H3K4me3 and H4K8ac marks were also present in this cell type, as previously described (*Goossens et al., 2011*).

Before analysing DNA methylation and histone PTM in in-vitro matured prepubertal testicular tissues, the advancement of spermatogenesis was examined. As previously shown (*Arkoun et al., 2015, 2016; Dumont et al., 2015, 2016; Sato et al., 2011; Yokonishi et al., 2014*), a successful differentiation of spermatogonia into spermatozoa was obtained in the present study after culture of fresh or cryopreserved prepubertal testicular tissues at a gas-liquid interphase. The proportion of elongated spermatids per seminiferous tubule and of tubules having reached the elongated spermatid stage were lower in 30-day cultures of fresh tissues compared with in-vivo controls. Moreover, these parameters were reduced in CSF tissues compared with fresh or SSV tissues. Data from this study therefore suggest that vitrification better preserves testicular tissues than slow freezing, and are in line with previous data reporting better spermatogenic yields in cultures of SSV than CSF tissues (*Dumont et al., 2015*). To promote germ

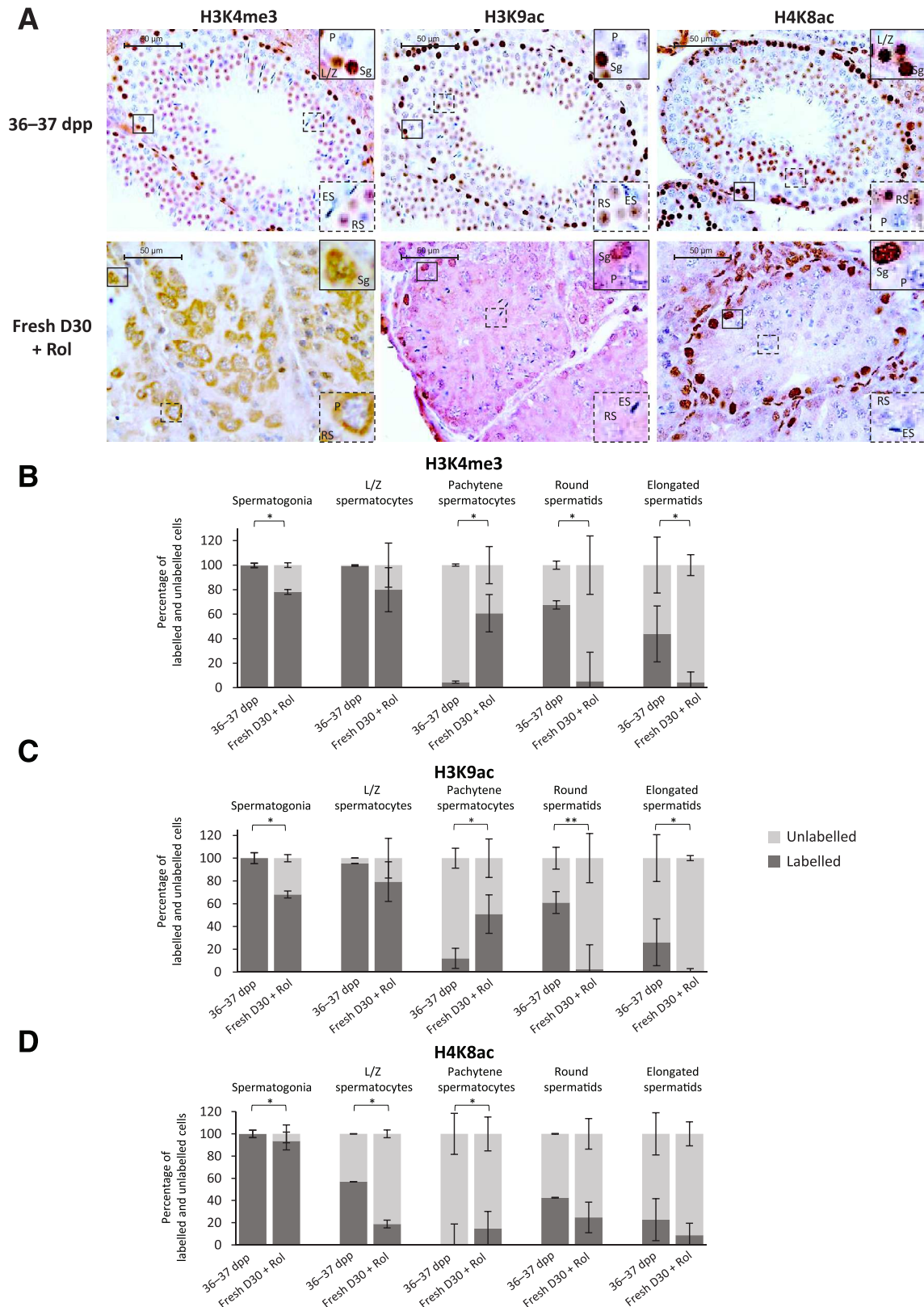


FIGURE 4 Immunolocalization of H3K4me3, H3K9ac and H4K8ac in cultures of fresh prepubertal testes and *in vivo*. (A) Localization of the epigenetic marks H3K4me3, H3K9ac and H4K8ac in fresh testicular fragments cultured for 30 days with retinol ($n = 4$) and in 36–37 dpp testes (*in-vivo* controls, $n = 4$). Shown are representative microscopy images of H3K4me3, H3K9ac and H4K8ac labelling. Antibody binding was visualized using 3,3'-diaminobenzidine (brown staining) and tissue sections were counterstained with haematoxylin. Enlarged views of spermatogonia, leptotene/zygotene and pachytene spermatocytes (upper right corner) and of round and elongated spermatids (lower right corner) are shown. Bar: 50 μ m. Proportion of (B) H3K4me3, (C) H3K9ac and (D) H4K8ac-positive spermatogonia, leptotene/zygotene and pachytene spermatocytes, round

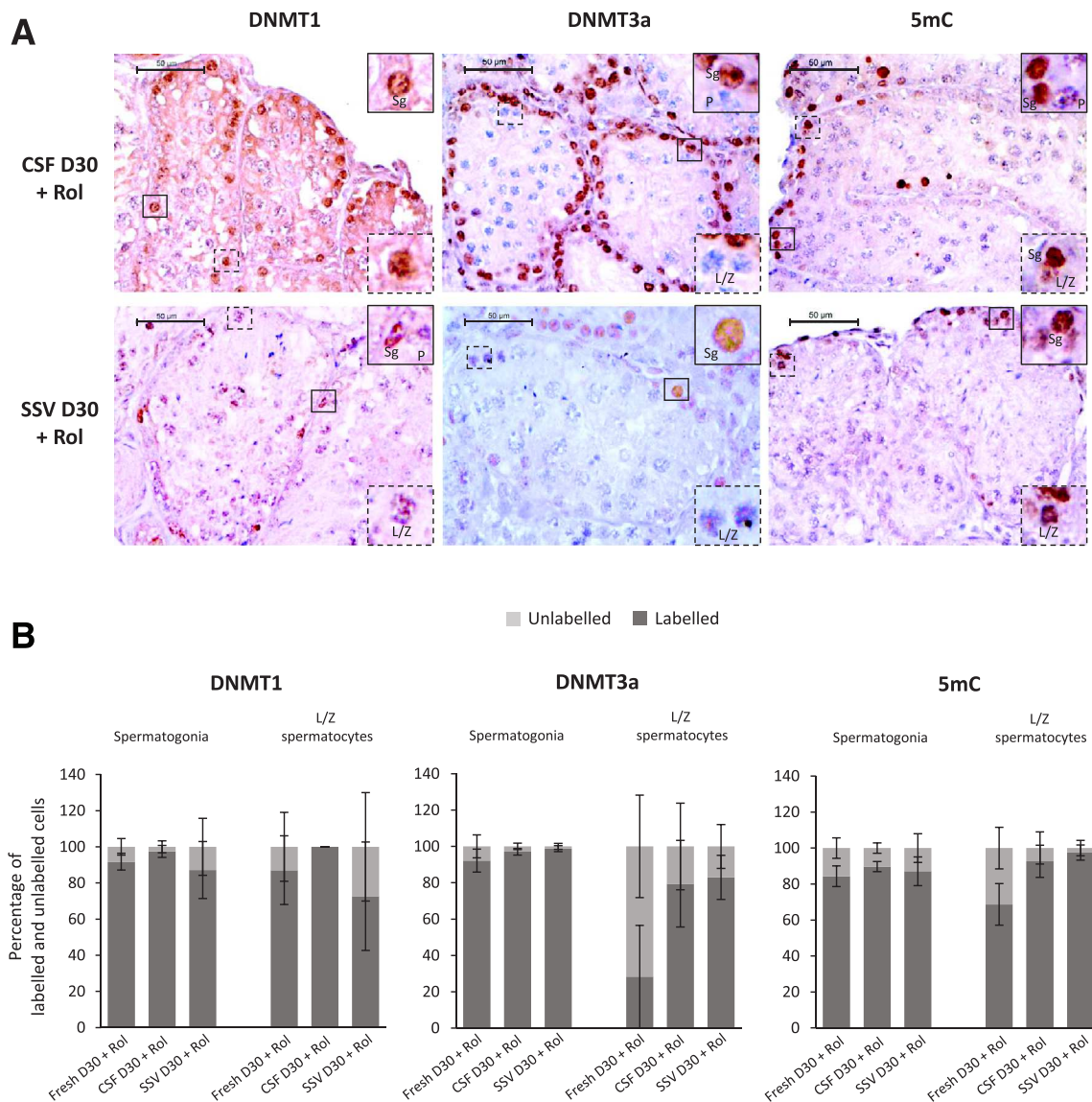


FIGURE 5 Immunolocalization of DNMT1, DNMT3a and 5mC in 30-day cultures of cryopreserved prepubertal testes. (A) Localization of DNMT1, DNMT3a and 5mC in CSF or SSV testicular fragments cultured for 30 days with retinol ($n = 4$). Shown are representative microscopy images of DNMT1, DNMT3a and 5mC labelling. Antibody binding was visualized using 3,3'-diaminobenzidine (brown staining) and tissue sections were counterstained with haematoxylin. Enlarged views of spermatogonia and leptotene/zygotene spermatocytes are shown in the upper right corner and in the lower right corner, respectively. Bar: 50 μm . (B) Proportion of DNMT1, DNMT3a and 5mC-positive spermatogonia and leptotene/zygotene spermatocytes in CSF or SSV testicular fragments cultured for 30 days with retinol ($n = 4$). The localization of DNMT1, DNMT3a and 5mC was analysed in 30 cross-sectioned seminiferous tubules from three sections. Histograms are expressed as mean \pm SD. * $P < 0.05$.

cell differentiation, tissues were cultured with retinol alone or with an alternation of retinol/FSH. Indeed, probably because of the complex interactions between retinoids and FSH (Livera *et al.*, 2002), no additive effect has been previously observed on in-vitro spermatogenesis when retinol and FSH were combined (Arkoun *et al.*, 2015). It was found that

the proportion of elongated spermatids per tubule and of tubules containing elongated spermatids was significantly reduced in fresh and CSF tissues cultured with retinol/FSH rather than retinol alone. In order to mimic in-vivo conditions as closely as possible, different concentrations of FSH (corresponding to the physiological variations of this

hormone) will have to be used during the course of in-vitro cultures in future studies. Moreover, the culture medium will have to be supplemented with other factors that positively influence spermatogenesis. Indeed, recently, the use of a chemically-defined medium containing retinoic acid, retinol and a combination of four hormones (FSH, LH,

FIGURE 4 (Continued) and elongated spermatids in 30-day cultures of fresh testicular fragments with retinol ($n = 4$) and in control 36–37 dpp testes ($n = 4$). The localization of H3K4me3, H3K9ac and H4K8ac was analysed in 30 cross-sectioned seminiferous tubules from three sections. Histograms are expressed as mean \pm SD. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. ES = elongated spermatid; H3K4me3 = trimethylated histone H3 on lysine 4; H4K8ac = acetylated histone H4 on lysine 8; RS = round spermatid.

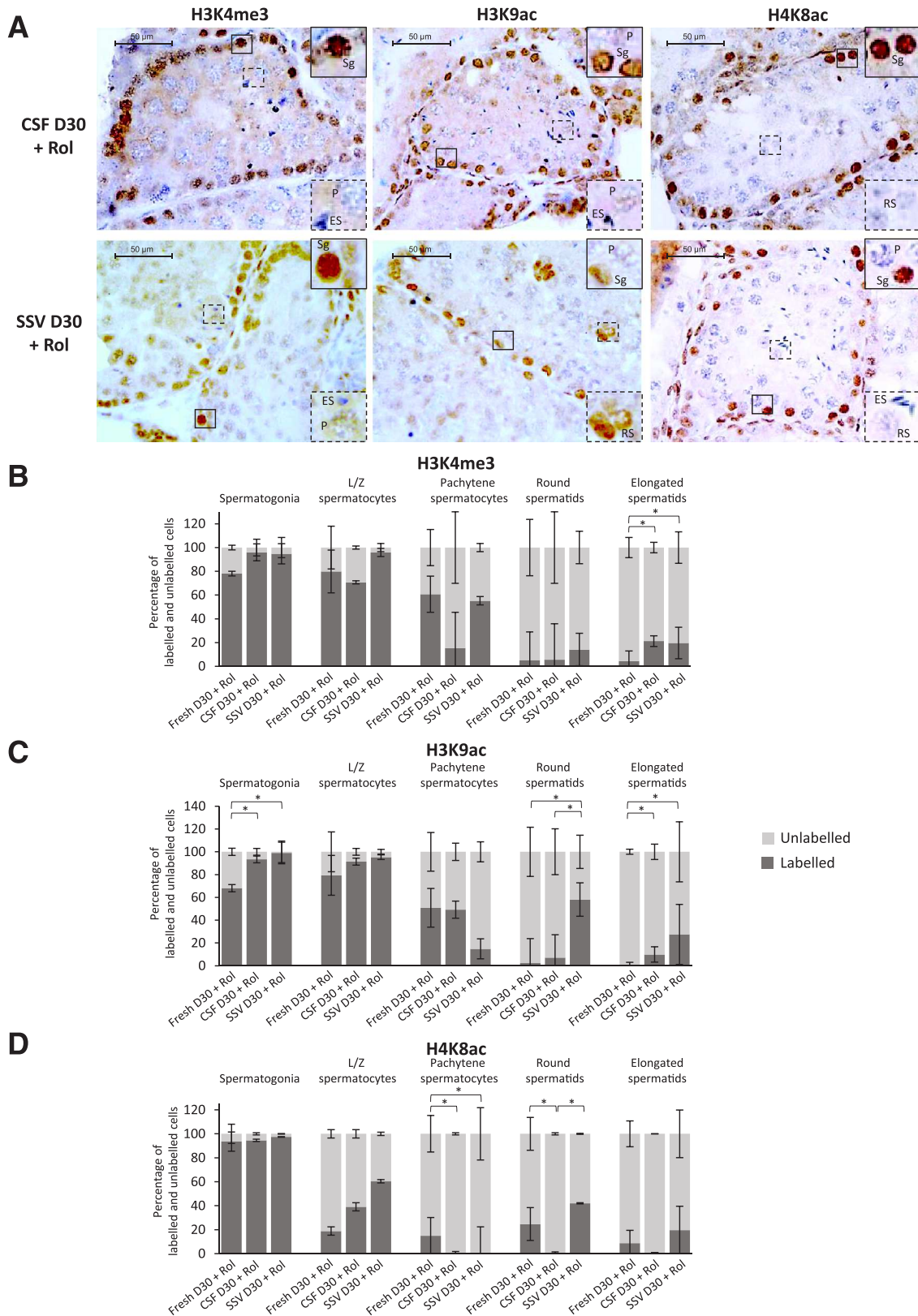


FIGURE 6 Immunolocalization of H3K4me3, H3K9ac and H4K8ac in cultures of cryopreserved prepubertal testes. (A) Localization of H3K4me3, H3K9ac and H4K8ac in CSF or SSV testicular fragments cultured for 30 days with retinol ($n = 4$). Shown are representative microscopy images of H3K4me3, H3K9ac and H4K8ac labelling. Antibody binding was visualized using 3,3'-diaminobenzidine (brown staining) and tissue sections were counterstained with haematoxylin. Enlarged views of spermatogonia, leptotene/zygotene and pachytene spermatocytes (upper right corner) and of round and elongated spermatids (lower right corner) are shown. Bar: 50 μ m. Proportion of (B) H3K4me3, (C) H3K9ac and (D) H4K8ac-positive spermatogonia, leptotene/zygotene and pachytene spermatocytes, round and elongated spermatids in CSF and SSV fragments cultured for 30 days with retinol ($n = 4$). The localization of H3K4me3, H3K9ac and H4K8ac was analysed in 30 cross-sectioned seminiferous tubules from three sections. Histograms are expressed as mean \pm SD. * $P < 0.05$.

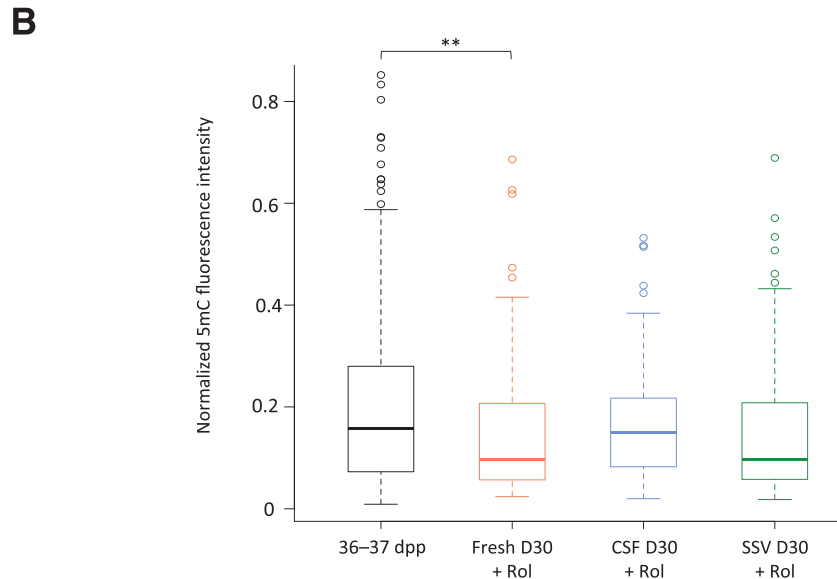
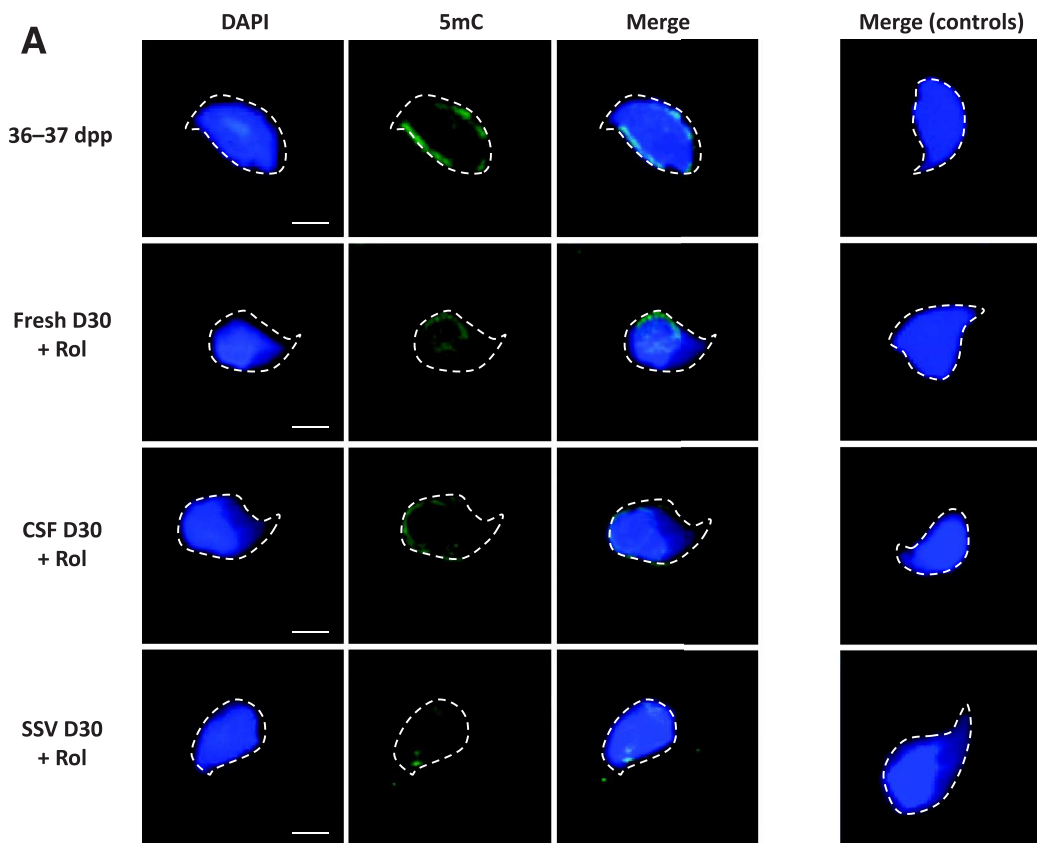


FIGURE 7 DNA methylation in in-vitro produced spermatozoa and in-vivo controls. (A) 5mC patterns in spermatozoa extracted from fresh, CSF or SSV testes after 30 days of culture in the presence of retinol, and from 36–37 dpp testes (in-vivo controls). A hundred spermatozoa (from a pool of six in-vitro matured testes or from six in-vivo testes) were examined. Shown are representative images of 5mC immunofluorescence staining (in green) in spermatozoa. Cell nuclei were stained with DAPI (in blue). Representative merged fluorescent images obtained when the primary antibody was omitted (negative controls) are also shown (right column). Magnification: $\times 900$, bar: 10 μm . (B) Box plot distributions of normalized 5mC fluorescence intensity in spermatozoa extracted from fresh, CSF or SSV testes after 30 days of culture in the presence of retinol, and from 36–37 dpp testes (in-vivo controls). The boxes stretch from the 25th to the 75th percentile. The median is shown as a line across the boxes. The horizontal lines outside the boxes display minimum and maximum. The circles represent outliers. $**P < 0.01$. DAPI = 4',6-diamidino-2-phenylindole.

testosterone, triiodothyronine) was found to promote spermatogenesis until round spermatid production (Sanjo *et al.*, 2018).

In this study, *Dnmt1* and *Dnmt3a* transcripts were detected *in vivo* at 36–37 dpp and in fresh, CSF and SSV tissues cultured for 30 days. Differences in their levels were observed between *in-vivo* controls and cultures of fresh or cryopreserved tissues. DNMT1, DNMT3a and 5mC residues were mostly localized in spermatogonia and leptotene/zygotene spermatocytes *in vivo* and in cultures of fresh or cryopreserved tissues. The presence of DNMT1 and DNMT3a specifically in spermatogonia and leptotene/zygotene spermatocytes during spermatogenesis is in agreement with previous studies (La Salle and Trasler, 2006; Mertineit *et al.*, 1998; Watanabe *et al.*, 2004). In adult testis, DNMT1 has also been detected in pachytene spermatocytes, diplotene spermatocytes, round spermatids and 5mC was also found in round spermatids (Goossens *et al.*, 2011). The expression of DNMT3a in 36–37 dpp testes and 30-day cultures suggests that de-novo methylation is occurring at this stage. Here, the epigenetic 5mC mark was not found in germ cells beyond the leptotene/zygotene spermatocyte stage *in vivo* and in organotypic cultures. As suggested previously (Goossens *et al.*, 2011), the lack of 5mC staining in pachytene spermatocytes could be due to the fact that the methylation pattern has not yet been set on the daughter DNA strand. The lack of labelling in spermatids may, however, be explained by a poor accessibility of antibodies to the condensed DNA. To ascertain that DNA methylation marks are indeed found in most differentiated germ cells, spermatozoa were extracted from the testicular tissues after culture and 5mC labelling was performed on decondensed DNA. The epigenetic mark 5mC was detected in the nuclei of spermatozoa generated in cultures of fresh or cryopreserved testicular tissues. The relative 5mC fluorescence intensity was similar in spermatozoa produced in cultures of cryopreserved tissues or *in vivo*, but was lower in spermatozoa extracted from cultures of fresh tissues. It has been shown that the DNA methylation patterns of a paternally methylated gene (*Igf2*) and a maternally expressed gene (*Peg1*) in epididymal spermatozoa obtained after SSC transplantation were no different

from controls (Goossens *et al.*, 2009). In this study, the analysis of the methylation status of the paternally imprinted gene *H19* and the maternally imprinted gene *Igf2r* in *in-vitro* produced spermatozoa could not be achieved. Indeed, a heterogeneous cell population, among which were few spermatozoa, was obtained after mechanical dissociation of *in-vitro* matured testes.

In addition, data from this study showed that *Prdm9*, *Jarid1b*, *Src1*, *Sirt1* and *Hdac1* transcripts were also present in 36–37 dpp testes and in fresh or cryopreserved tissues cultured for 30 days. The levels of *Src1*, *Sirt1* and *Hdac1* mRNA encoding histone acetyltransferase or deacetylase were lower in cultures of fresh tissues than *in vivo*. However, apart from lower mRNA levels of *Jarid1b* in cultures of SSV tissues and of *Hdac1* in cultures of CSF tissues, the levels of transcripts encoding the different histone-modifying enzymes were similar between cultures of cryopreserved tissues and *in vivo*. As previously reported (Godmann *et al.*, 2007; Goossens *et al.*, 2011; Hazzouri *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2014), it was found that H3K4me3, H3K9ac and H4K8ac were present in spermatogonia, leptotene/zygotene spermatocytes, round and elongated spermatids and in few pachytene spermatocytes *in vivo*. An altered distribution of these three active histone marks was observed in organotypic cultures. It was observed that the H3K4me3 and H3K9ac marks, which are involved in the progression of early meiosis and spermiogenesis, respectively (Bell *et al.*, 2014; Hayashi *et al.*, 2005), were present in a lower proportion of spermatogonia, round and elongated spermatids and in a higher proportion of pachytene spermatocytes in cultures of fresh tissues compared with *in-vivo* controls. It has been shown that a decrease in H3K4me3 or in H3K9ac could impair meiotic progression or induce morphological alterations and apoptosis in round spermatids, respectively (Dai *et al.*, 2015; Hayashi *et al.*, 2005). This could explain, at least in part, the alteration of meiotic and post-meiotic progression and the presence of degenerating round spermatids in *in-vitro* matured tissues as well as the low spermatogenic yield previously reported (Dumont *et al.*, 2016; Rondanino *et al.*, 2017; Yao *et al.*, 2017). The acetylation of histones, which precedes histone-to-protamine

replacement, was probably unaffected in the surviving spermatids because most *in-vitro* produced spermatozoa contain normally condensed chromatin (Oblette *et al.*, 2017). Finally, while H4K8ac was found in fewer spermatogonia and leptotene/zygotene spermatocytes in cultures of fresh tissues, the proportion of spermatids containing this mark was similar to *in-vivo* controls. The cryopreservation procedures used in this study also altered the distribution of the histone marks. A disturbed expression of histone-modifying enzymes (PRDM9, JARID1B, SRC1, SIRT1, HDAC1 or others) or of their activity in organotypic cultures, could explain these results.

Genome-wide single-cell methylome analysis and chromatin immunoprecipitation sequencing will be necessary to explore in more detail DNA methylation in *in-vitro* produced spermatozoa, and especially the methylation status of imprinted genes, as well as the genomic distribution of modified histones.

In conclusion, this study reports for the first time that germ cells go through DNA methylation and histone PTM when *in-vitro* matured. Importantly, in the context of fertility preservation, the present study was also performed on cryopreserved samples. DNA methylation was found in cultures of cryopreserved prepubertal testicular tissues and in spermatozoa generated in these tissues. Histone methylation and acetylation also occurred in germ cells in cultures of cryopreserved tissues. Before applying *in-vitro* maturation to cryopreserved prepubertal testicular tissues of paediatric cancer survivors, further studies will be necessary to investigate whether imprinted genes are properly methylated in *in-vitro* produced spermatozoa, whether histone marks localize to the correct regions of the genome, and whether first- and second-generation offspring are healthy, long-lived and do not present behavioural disorders.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Véronique Duchesne, Amandine Bironneau and Shirley Troche for their excellent technical assistance.

This work was supported by Rouen University Hospital, Ligue Contre le

Cancer (to NR and AO), Agence de la Biomédecine (to NR), Association Laurette Fugain (to NR and CR), France Lymphome Espoir (to NR), and co-supported by the European Union and Région Normandie (to AO). Europe gets involved in Normandie with European Régional Development Fund (ERDF). The funding sources had no role in the design of the study, collection, analysis and interpretation of data, and in writing the manuscript.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.rbmo.2019.05.007](https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2019.05.007).

REFERENCES

- Abu Elhija, M., Lunenfeld, E., Schlatt, S., Huleihel, M. **Differentiation of murine male germ cells to spermatozoa in a soft agar culture system.** *Asian J. Androl.* 2012; 14: 285–293. <https://doi.org/10.1038/aja.2011.112>
- Arkoun, B., Dumont, L., Milazzo, J.-P., Rondanino, C., Bironneau, A., Wils, J., Rives, N. **Does soaking temperature during controlled slow freezing of pre-pubertal mouse testes influence course of in vitro spermatogenesis?.** *Cell Tissue Res.* 2016; 364: 661–674. <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2341-2>
- Arkoun, B., Dumont, L., Milazzo, J.-P., Way, A., Bironneau, A., Wils, J., Macé, B., Rives, N. **Retinol improves in vitro differentiation of pre-pubertal mouse spermatogonial stem cells into sperm during the first wave of spermatogenesis.** *PLoS ONE* 2015; 10:e0116660. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116660>
- Baert, Y., Goossens, E., van Saen, D., Ning, L., in't Veld, P., Tournaye, H. **Orthotopic grafting of cryopreserved prepubertal testicular tissue: in search of a simple yet effective cryopreservation protocol.** *Fertil. Steril.* 2012; 97: 1152–1157. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.02.010>
- Bell, E.L., Nagamori, I., Williams, E.O., Del Rosario, A.M., Bryson, B.D., Watson, N., White, F.M., Sassone-Corsi, P., Guarente, L. **SirT1 is required in the male germ cell for differentiation and fecundity in mice.** *Development* 2014; 141: 3495–3504. <https://doi.org/10.1242/dev.110627>
- Boissonnas, C.C., Jouannet, P., Jammes, H. **Epigenetic disorders and male subfertility.** *Fertil. Steril.* 2013; 99: 624–631. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.01.124>
- Champroux, A., Cocquet, J., Henry-Berger, J., Drevet, J.R., Kocer, A. **A Decade of Exploring the Mammalian Sperm Epigenome: Paternal Epigenetic and Transgenerational Inheritance.** *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2018; 6. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00050>
- Cui, X., Jing, X., Wu, X., Yan, M., Li, Q., Shen, Y., Wang, Z. **DNA methylation in spermatogenesis and male infertility.** *Exp Ther Med* 2016; 12: 1973–1979. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3569>
- Dai, L., Endo, D., Akiyama, N., Yamamoto-Fukuda, T., Koji, T. **Aberrant levels of histone H3 acetylation induce spermatid anomaly in mouse testis.** *Histochemistry and Cell Biology* 2015; 143: 209–224. <https://doi.org/10.1007/s00418-014-1283-1>
- de Michele, F., Vermeulen, M., Wyns, C. **Fertility restoration with spermatogonial stem cells.** *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2017; 24: 424–431. <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000370>
- Dumont, L., Arkoun, B., Jumeau, F., Milazzo, J.-P., Bironneau, A., Liot, D., Wils, J., Rondanino, C., Rives, N. **Assessment of the optimal vitrification protocol for pre-pubertal mice testes leading to successful in vitro production of flagellated spermatozoa.** *Andrology* 2015; 3: 611–625. <https://doi.org/10.1111/andr.12042>
- Dumont, L., Chalmel, F., Oblette, A., Berby, B., Rives, A., Duchesne, V., Rondanino, C., Rives, N. **Evaluation of apoptotic- and autophagic-related protein expressions before and after IVM of fresh, slow-frozen and vitrified pre-pubertal mouse testicular tissue.** *Mol. Hum. Reprod.* 2017; 23: 738–754. <https://doi.org/10.1093/molehr/gax054>
- Dumont, L., Oblette, A., Rondanino, C., Jumeau, F., Bironneau, A., Liot, D., Duchesne, V., Wils, J., Rives, N. **Vitamin A prevents round spermatid nuclear damage and promotes the production of motile sperm during in vitro maturation of vitrified pre-pubertal mouse testicular tissue.** *Mol. Hum. Reprod.* 2016; 22: 819–832. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaw063>
- Gies, I., De Schepper, J., Tournaye, H. **Progress and prospects for fertility preservation in prepubertal boys with cancer.** *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2015; 22: 203–208. <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000162>
- Godmann, M., Auger, V., Ferraroni-Aguiar, V., Sauro, A.D., Sette, C., Behr, R., Kimmins, S. **Dynamic Regulation of Histone H3 Methylation at Lysine 4 in Mammalian Spermatogenesis1.** *Biology of Reproduction* 2007; 77: 754–764. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.062265>
- Goossens, E., Bilgec, T., Van Saen, D., Tournaye, H. **Mouse germ cells go through typical epigenetic modifications after intratesticular tissue grafting.** *Hum. Reprod.* 2011; 26: 3388–3400. <https://doi.org/10.1093/humrep/der334>
- Goossens, E., De Rycke, M., Haentjens, P., Tournaye, H. **DNA methylation patterns of spermatozoa and two generations of offspring obtained after murine spermatogonial stem cell transplantation.** *Hum. Reprod.* 2009; 24: 2255–2263. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep213>
- Goossens, E., Van Saen, D., Tournaye, H. **Spermatogonial stem cell preservation and transplantation: from research to clinic.** *Hum. Reprod.* 2013; 28: 897–907. <https://doi.org/10.1093/humrep/det039>
- Gunes, S., Arslan, M.A., Hekim, G.N.T., Asci, R. **The role of epigenetics in idiopathic male infertility.** *J. Assist. Reprod. Genet.* 2016; 33: 553–569. <https://doi.org/10.1007/s10815-016-0682-8>
- Hammoud, S.S., Nix, D.A., Hammoud, A.O., Gibson, M., Cairns, B.R., Carrell, D.T. **Genome-wide analysis identifies changes in histone retention and epigenetic modifications at developmental and imprinted gene loci in the sperm of infertile men.** *Human Reproduction* 2011; 26: 2558–2569. <https://doi.org/10.1093/humrep/der192>
- Hayashi, K., Yoshida, K., Matsui, Y. **A histone H3 methyltransferase controls epigenetic events required for meiotic prophase.** *Nature* 2005; 438: 374–378. <https://doi.org/10.1038/nature04112>
- Hazzouri, M., Pivot-Pajot, C., Faure, A.K., Usson, Y., Pelletier, R., Sèle, B., Khochbin, S., Rousseaux, S. **Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases.** *Eur. J. Cell Biol.* 2000; 79: 950–960. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00123>
- Ibtisham, F., Wu, J., Xiao, M., An, L., Banker, Z., Nawab, A., Zhao, Y., Li, G. **Progress and future prospect of in vitro spermatogenesis.** *Oncotarget* 2017; 8: 66709–66727. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19640>
- Jahnukainen, K., Mitchell, R.T., Stukenborg, J.-B. **Testicular function and fertility preservation**

- after treatment for haematological cancer. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2015; 22: 217–223. <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000156>
- Jenkins, T.G., Aston, K.I., James, E.R., Carrell, D.T. **Sperm epigenetics in the study of male fertility, offspring health, and potential clinical applications.** *Syst Biol Reprod Med* 2017; 63: 69–76. <https://doi.org/10.1080/19396368.2016.1274791>
- Jenkins, T.G., Carrell, D.T. **The sperm epigenome and potential implications for the developing embryo.** *Reproduction* 2012; 143: 727–734. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0450>
- Kitamura, A., Miyauchi, N., Hamada, H., Hiura, H., Chiba, H., Okae, H., Sato, A., John, R.M., Arima, T. **Epigenetic alterations in sperm associated with male infertility.** *Congenit Anom (Kyoto)* 2015; 55: 133–144. <https://doi.org/10.1111/cga.12113>
- Kubo, N., Toh, H., Shirane, K., Shirakawa, T., Kobayashi, H., Sato, T., Sone, H., Sato, Y., Tomizawa, S., Tsurusaki, Y., Shibata, H., Saitsu, H., Suzuki, Y., Matsumoto, N., Suyama, M., Kono, T., Ohbo, K., Sasaki, H. **DNA methylation and gene expression dynamics during spermatogonial stem cell differentiation in the early postnatal mouse testis.** *BMC Genomics* 2015; 16: 624. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1833-5>
- La Salle, S., Mertineit, C., Taketo, T., Moens, P.B., Bestor, T.H., Trasler, J.M. **Windows for sex-specific methylation marked by DNA methyltransferase expression profiles in mouse germ cells.** *Dev. Biol.* 2004; 268: 403–415. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2003.12.031>
- La Salle, S., Trasler, J.M. **Dynamic expression of DNMT3a and DNMT3b isoforms during male germ cell development in the mouse.** *Dev. Biol.* 2006; 296: 71–82. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.04.436>
- Langenstroth-Röwer, D., Gromoll, J., Wistuba, J., Tröndle, I., Laurentino, S., Schlatt, S., Neuhaus, N. **De novo methylation in male germ cells of the common marmoset monkey occurs during postnatal development and is maintained in vitro.** *Epigenetics* 2017; 12: 527–539. <https://doi.org/10.1080/15592294.2016.1248007>
- Liu, C., Song, Z., Wang, L., Yu, H., Liu, W., Shang, Y., Xu, Z., Zhao, H., Gao, Fengyi, Wen, J., Zhao, L., Gui, Y., Jiao, J., Gao, Fei, Li, W. **Sirt1 regulates acrosome biogenesis by modulating autophagic flux during spermiogenesis in mice.** *Development* 2017; 144: 441–451. <https://doi.org/10.1242/dev.147074>
- Livera, G., Rouiller-Fabre, V., Pairault, C., Levacher, C., Habert, R. **Regulation and perturbation of testicular functions by vitamin A.** *Reproduction* 2002; 124: 173–180
- Luense, L.J., Wang, X., Schon, S.B., Weller, A.H., Lin Shiao, E., Bryant, J.M., Bartolomei, M.S., Coutifaris, C., Garcia, B.A., Berger, S.L. **Comprehensive analysis of histone post-translational modifications in mouse and human male germ cells.** *Epigenetics and Chromatin* 2016; 9: <https://doi.org/10.1186/s13072-016-0072-6>
- McSwiggin, H.M., O'Doherty, A.M. **Epigenetic reprogramming during spermatogenesis and male factor infertility.** *Reproduction* 2018; 156: R9–R21. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0009>
- Mertineit, C., Yoder, J.A., Taketo, T., Laird, D.W., Trasler, J.M., Bestor, T.H. **Sex-specific exons control DNA methyltransferase in mammalian germ cells.** *Development* 1998; 125: 889–897
- Milazzo, J.P., Travers, A., Bironneau, A., Safsaf, A., Gruel, E., Arnoult, C., Mace, B., Boyer, O., Rives, N. **Rapid Screening of Cryopreservation Protocols for Murine Prepubertal Testicular Tissue by Histology and PCNA Immunostaining.** *Journal of Andrology* 2010; 31: 617–630. <https://doi.org/10.2164/jandrol.109.009324>
- Milazzo, J.P., Vaudreuil, L., Cauliez, B., Gruel, E., Massé, L., Mousset-Siméon, N., Macé, B., Rives, N. **Comparison of conditions for cryopreservation of testicular tissue from immature mice.** *Hum. Reprod.* 2008; 23: 17–28. <https://doi.org/10.1093/humrep/dem355>
- Nurmio, M., Keros, V., Lähteenmäki, P., Salmi, T., Kallajoki, M., Jahnukainen, K. **Effect of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Therapy on Spermatogenic Populations and Future Fertility.** *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 2119–2122. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-0060>
- Oblotte, A., Rives, N., Dumont, L., Rives, A., Verhaeghe, F., Jumeau, F., Rondonano, C. **Assessment of sperm nuclear quality after in vitro maturation of fresh or frozen/thawed mouse pre-pubertal testes.** *Mol. Hum. Reprod.* 2017; 23: 674–684. <https://doi.org/10.1093/molehr/gax048>
- Onofre, J., Baert, Y., Faes, K., Goossens, E. **Cryopreservation of testicular tissue or testicular cell suspensions: a pivotal step in fertility preservation.** *Hum. Reprod. Update* 2016; 22: 744–761. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw029>
- Picton, H.M., Wyns, C., Anderson, R.A., Goossens, E., Jahnukainen, K., Kliesch, S., Mitchell, R.T., Pennings, G., Rives, N., Tournaye, H., van Pelt, A.M.M., Eichenlaub-Ritter, U., Schlatt, S. **ESHRE Task Force On Fertility Preservation In Severe Diseases. A European perspective on testicular tissue cryopreservation for fertility preservation in prepubertal and adolescent boys.** *Hum. Reprod.* 2015; 30: 2463–2475. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev190>
- Poels, J., Van Langendonck, A., Many, M.-C., Wese, F.-X., Wyns, C. **Vitrification preserves proliferation capacity in human spermatogonia.** *Hum. Reprod.* 2013; 28: 578–589. <https://doi.org/10.1093/humrep/des455>
- Rondonano, C., Maouche, A., Dumont, L., Oblotte, A., Rives, N. **Establishment, maintenance and functional integrity of the blood-testis barrier in organotypic cultures of fresh and frozen/thawed prepubertal mouse testes.** *Mol. Hum. Reprod.* 2017; 23: 304–320. <https://doi.org/10.1093/molehr/gax017>
- Rwigemera, A., Joao, F., Delbes, G. **Fetal testis organ culture reproduces the dynamics of epigenetic reprogramming in rat gonocytes.** *Epigenetics Chromatin* 2017; 10: 19. <https://doi.org/10.1186/s13072-017-0127-3>
- Sanjo, H., Komeya, M., Sato, T., Abe, T., Katagiri, K., Yamanaka, H., Ino, Y., Arakawa, N., Hirano, H., Yao, T., Asayama, Y., Matsuhashi, A., Yao, M., Ogawa, T. **In vitro mouse spermatogenesis with an organ culture method in chemically defined medium.** *PLoS ONE* 2018; 13:e0192884. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192884>
- Santi, D., De Vincentis, S., Magnani, E., Spaggiari, G. **Impairment of sperm DNA methylation in male infertility: a meta-analytic study.** *Andrology* 2017; 5: 695–703. <https://doi.org/10.1111/andr.12379>
- Sato, T., Katagiri, K., Gohbara, A., Inoue, K., Ogonuki, N., Ogura, A., Kubota, Y., Ogawa, T. **In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes.** *Nature* 2011; 471: 504–507. <https://doi.org/10.1038/nature09850>
- Sonnack, V., Failing, K., Bergmann, M., Steger, K. **Expression of hyperacetylated histone H4 during normal and impaired human spermatogenesis.** *Andrologia* 2002; 34: 384–390
- Steilmann, C., Paradowska, A., Bartkuhn, M., Vieweg, M., Schuppe, H.-C., Bergmann, M., Kliesch, S., Weidner, W., Steger, K. **Presence of histone H3 acetylated at lysine 9 in male germ cells and its distribution pattern in the genome of human spermatozoa.** *Reproduction, Fertility and Development* 2011; 23: 997. <https://doi.org/10.1071/RD10197>
- Stewart, K.R., Veselovska, L., Kelsey, G. **Establishment and functions of DNA methylation in the germline.** *Epigenomics* 2016; 8: 1399–1413. <https://doi.org/10.2217/epi-2016-0056>
- Stuppia, L., Franzago, M., Ballerini, P., Gatta, V., Antonucci, I. **Epigenetics and male reproduction: the consequences of paternal lifestyle on fertility, embryo development, and children lifetime health.** *Clin Epigenetics* 2015; 7: 120. <https://doi.org/10.1186/s13148-015-0155-4>
- Uysal, F., Akkoyunlu, G., Ozturk, S. **DNA methyltransferases exhibit dynamic expression during spermatogenesis.** *Reprod. Biomed. Online* 2016; 33: 690–702. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2016.08.022>
- Vieweg, M., Dvorakova-Hortova, K., Dudkova, B., Waliszewski, P., Otte, M., Oels, B., Hajimohammad, A., Turley, H., Schorsch, M., Schuppe, H.-C., Weidner, W., Steger, K., Paradowska-Dogan, A. **Methylation analysis of histone H4K12ac-associated promoters in sperm of healthy donors and subfertile patients.** *Clinical Epigenetics* 2015; 7: 31. <https://doi.org/10.1186/s13148-015-0058-4>
- Watanabe, D., Suetake, I., Tajima, S., Hanaoka, K. **Expression of Dnmt3b in mouse hematopoietic progenitor cells and spermatogonia at specific stages.** *Gene Expr. Patterns* 2004; 5: 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.modexp.2004.06.008>
- Wyns, C., Collienne, C., Shenfield, F., Robert, A., Laurent, P., Roegiers, L., Brichard, B. **Fertility preservation in the male pediatric population: factors influencing the decision of parents and children.** *Hum. Reprod.* 2015; 30: 2022–2030. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev161>
- Wyns, C., Curaba, M., Vanabelle, B., Van Langendonck, A., Donnez, J. **Options for fertility preservation in prepubertal boys.** *Hum. Reprod. Update* 2010; 16: 312–328. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmp054>
- Yao, C., Liu, Y., Sun, M., Niu, M., Yuan, Q., Hai, Y., Guo, Y., Chen, Z., Hou, J., Liu, Y., He, Z. **MicroRNAs and DNA methylation as epigenetic regulators of mitosis, meiosis and spermiogenesis.** *Reproduction* 2015; 150: R25–R34. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0643>
- Yao, J., Zuo, H., Gao, J., Wang, M., Wang, D., Li, X. **The effects of IGF-1 on mouse spermatogenesis using an organ culture method.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.05.125>
- Yokonishi, T., Ogawa, T. **Cryopreservation of testis tissues and in vitro spermatogenesis.**

Reprod. Med. Biol. 2016; 15: 21–28. <https://doi.org/10.1007/s12522-015-0218-4>

Yokonishi, T., Sato, T., Komeya, M., Katagiri, K., Kubota, Y., Nakabayashi, K., Hata, K., Inoue, K., Ogonuki, N., Ogura, A., Ogawa, T. **Offspring production with sperm grown in vitro from cryopreserved testis tissues.** Nat Commun

2014; 5: 4320. <https://doi.org/10.1038/ncomms5320>

Zhang, L., Wang, J., Pan, Y., Jin, J., Sang, J., Huang, P., Shao, G. **Expression of histone H3 lysine 4 methylation and its demethylases in the developing mouse testis.** Cell and Tissue

Research 2014; 358: 875–883. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1991-9>

Received 30 November 2018; received in revised form 22 April 2019; accepted 9 May 2019.

Contrôle épigénétique de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse cardiaque induit par les cellules myéloïdes

La régulation épigénétique de la méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27) a été récemment mise en évidence comme une étape clé de la polarisation en macrophages alternatifs de type M2, essentiels pour la réparation cardiaque après un infarctus du myocarde (IDM).

Nous avons émis l'hypothèse que l'enzyme épigénétique EZH2, responsable de la méthylation de H3K27, pourrait agir comme un point de contrôle épigénétique au cours de ce processus. Nous démontrons pour la première fois une localisation cytoplasmique ectopique et potentiellement inactive de l'enzyme épigénétique EZH2, lors de la différenciation des monocytes en macrophages M2 *in vitro* ainsi que dans les macrophages M2 *in vivo* au cours d'une inflammation cardiaque post-IDM. De plus, nous montrons que l'inhibition pharmacologique d'EZH2, avec le GSK-343, résout la méthylation de H3K27 au niveau du promoteur des gènes bivalents, améliorant ainsi leur expression pour promouvoir les fonctions de réparation des monocytes humains. Conformément à cet effet protecteur, le traitement avec le GSK-343 accélère la résolution inflammatoire cardiaque empêchant l'expansion de la zone lésée et le dysfonctionnement cardiaque post-IDM *in vivo*.

En conclusion, notre étude révèle que la modulation épigénétique des cellules immunitaires infiltrant le cœur peut être prometteuse pour limiter le remodelage cardiaque indésirable post-IDM.

Mots clés: inflammation cardiaque, EZH2, monocytes, gènes bivalents, infarctus du myocarde, macrophages M2.

Epigenetic control of myeloid cells-induced cardiac angiogenesis and lymphangiogenesis

Epigenetic regulation of histone H3 lysine 27 (H3K27) methylation has recently emerged as a key step during alternative M2-like macrophage polarization, essential for cardiac repair after Myocardial Infarction (MI).

We hypothesized that the epigenetic enzyme EZH2, responsible for H3K27 methylation, could act as an epigenetic checkpoint regulator during this process. We demonstrate for the first-time that EZH2 ectopically localizes to the cytoplasm, where it may be inactive, during monocytes differentiation into M2 macrophages *in vitro* as well as in M2 polarized macrophages *in vivo* during cardiac inflammation post-MI. Moreover, we show that pharmacological EZH2 inhibition, with GSK-343, resolves H3K27 methylation at the promoter of bivalent genes, thus enhancing their expression to promote human monocyte repair functions. In line with this protective effect, GSK-343 treatment accelerated cardiac inflammatory resolution preventing infarct expansion and subsequent cardiac dysfunction post-MI *in vivo*.

In conclusion, our study reveals that epigenetic modulation of cardiac-infiltrating immune cells may hold promise to limit adverse cardiac remodeling post-MI.

Key words: cardiac inflammation, EZH2, monocytes, bivalent genes, myocardial infarction, M2 macrophages.