



HAL
open science

Utilisation de vésicules extracellulaires dérivées de cellules cardiaques progénitrices pour le traitement des cardiopathies induites par chimiothérapie

Manon Desgres-Dassonville

► **To cite this version:**

Manon Desgres-Dassonville. Utilisation de vésicules extracellulaires dérivées de cellules cardiaques progénitrices pour le traitement des cardiopathies induites par chimiothérapie. Biologie cellulaire. Université Paris Cité, 2022. Français. NNT : 2022UNIP5168 . tel-04624894

HAL Id: tel-04624894

<https://theses.hal.science/tel-04624894>

Submitted on 25 Jun 2024

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.

Université Paris Cité
École doctorale 562 Bio Sorbonne Paris Cité

Paris Centre de Recherche Cardiovasculaire
Équipe Thérapies Régénératives pour les pathologies cardiaques
et vasculaires

Utilisation de vésicules extracellulaires
dérivées de cellules cardiaques
progénitrices pour le traitement des
cardiopathies induites par chimiothérapie

Par Manon DESGRES-DASSONVILLE

Thèse de doctorat de Biologie Cellulaire et Moléculaire,
Physiologie et Physiopathologie

Dirigée par Pr Philippe MENASCHÉ

Présentée et soutenue publiquement le 25 Novembre 2022

Devant un jury composé de :

Catherine VERGELY, DR	Université de Dijon	Rapporteur
Vincent HYENNE, CR-HDR	Université de Strasbourg	Rapporteur
Jean-Thomas VILQUIN, DR	Sorbonne Université	Président du jury
Gilles SOULAT, MCU-PH	Université Paris Cité	Examineur
Maria Carmen MARTINEZ, DR	Université de Montpellier	Examineur
Jean-Sébastien SILVESTRE, DR	Université Paris Cité	Membre invité
Philippe MENASCHE, PU-PH, DR	Université Paris Cité	Directeur de thèse

*À mes proches,
Ma plus grande force,*

Remerciements

Mes premiers remerciements vont à Monsieur **Vincent Hyenne** et Madame **Catherine Vergely** pour avoir accepté d'évaluer le manuscrit de cette thèse ainsi que Monsieur **Gilles Soulat**, Madame **Maria Carmen Martinez** et Monsieur **Jean-Thomas Vilquin** pour avoir accepté de faire partie du jury lors de sa défense.

Je remercie le fonds **Marion Elizabeth Brancher** dont le soutien financier a permis la réalisation de mes travaux de recherche et plus particulièrement Madame **Florence Brancher** pour son intérêt scientifique profond et les moments d'échanges que nous avons pu partager en dehors des laboratoires.

Je remercie Monsieur **Alain Tedgui** et Madame **Chantal Boulanger** pour leur accueil au sein du PARCC, pour leur volonté de viser l'excellence pour le centre et de le faire grandir.

Je remercie les membres du **Laboratoire de Recherches Biochirurgicales de la fondation Alain Carpentier** et ses collaborateurs qui m'ont accueillie à mon arrivée au PARCC, pour les conversations amicales partagées avec vous depuis.

Mes remerciements vont particulièrement aux personnes qui m'ont fait avancer tout au long de mon parcours scolaire puis universitaire, le Docteur **Xavier Montagutelli**, pour m'avoir initiée au travail de laboratoire et guidée dans mes choix d'orientation ainsi que Mesdames **Raphaëlle Grifone**, **Audrey Saquet** et **Mafalda Loreti** pour leur soutien inconditionnel depuis notre rencontre. J'ai beaucoup grandi à vos côtés et je reste fidèle à l'idée que nous nous retrouverons pour des recherches collaboratives dans le futur.

Je souhaite remercier tous les **membres du PARCC, étudiants, ITA** et chercheurs, avec qui j'ai eu l'occasion de collaborer ou que j'ai eu l'occasion de côtoyer pendant mes presque 5 années dans l'unité, ainsi que Messieurs **Onnik Agbulut** et **Pierre Joanne** et les membres de l'**Association des jeunes chercheurs** dont j'ai été très fière de faire partie pendant ma dernière année de thèse. Merci pour votre support et les sourires partagés, ceux-ci ont contribué à rendre mon expérience au PARCC toujours agréable et amicale.

J'aimerais plus particulièrement dire merci à **Nicolas, Guillaume, Irmine, Corina** et **Rex** ainsi que toute l'équipe de l'**ERI** pour leurs enseignements formateurs et leur exigence de l'éthique qui a permis mon épanouissement dans mes recherches et a su m'accompagner dans des expériences qui étaient pour moi difficiles.

Je souhaite vivement remercier **Dominique Mace, Véronique Oberweis** et **Stéphanie Lamoureux** pour leur aide et leur réactivité sans faille qui ont permis de débloquer nombre de situations, souvent dans l'urgence, surtout lorsque la team 6B tournait à effectif réduit. Merci pour votre professionnalisme, le PARCC vous doit beaucoup.

Je souhaite aussi remercier **Jean-Sébastien Silvestre** dont la porte a toujours été ouverte et avec lequel les discussions scientifiques ont beaucoup enrichi ma connaissance et mes expériences. Un grand merci à

José Vilar (Alias José Solutions) pour ses réponses à toutes nos questions et son expérience qu'il partage avec bienveillance. Merci à toute l'**équipe 6A** pour nos échanges et votre bonne humeur qui ont fait de mes passages au 2ème des moments joyeux.

Mes remerciements vont maintenant vers mon équipe, la **DREAMTEAM**, un girlsband à toute épreuve. Je vous remercie de m'avoir fait grandir, d'avoir supporté mes anxiétés, de m'avoir encouragée et d'avoir fait de mon quotidien de thésarde des journées heureuses. Au cours de cette thèse il y a eu beaucoup de moments difficiles et de remises en questions mais j'ai toujours rejoint le laboratoire avec l'envie de me battre en sachant que je trouverai en vous l'appui, la considération et la joie pour rebondir et persévérer. Je garderai de mon expérience avec vous bien plus qu'une équipe de travail, mais une deuxième famille avec laquelle j'ai partagé mille moments de vie, où la différence fait la force et où la valeur de l'unité se transmet de générations en générations.

Valérie, je te remercie pour la simplicité et la joie de vivre qui sont tiennes, ton sens du partage et nos nombreux papotages sur la vie qui m'ont fait grandir,

Laetitia, je te remercie pour ton soutien technique et humain, ainsi que pour ces heures tardives de travail silencieux, les heures les plus efficaces!

Cloche, je te remercie pour ta formation et ton accompagnement ainsi que l'insouciance avec laquelle tu nous as souvent fait rire,

Keirththana, je te remercie pour l'aide que tu m'as apportée, ta douceur et ton sens de l'organisation à toute épreuve !

Eirini, je te remercie pour ton investissement scientifique et ta légèreté d'être de laquelle j'essaye de m'inspirer encore aujourd'hui,

Céline, je te remercie de m'avoir accompagnée avec autant d'investissement, de curiosité et de rigueur scientifique,

Rose, Axelle, Bradel, Marie, Anfel, Sara, Ashley, Line, et **Claire**, merci pour votre compagnie toujours conviviale et entraînant, merci pour vos coups de main et vos appuis, je vous souhaite autant de bonheur dans vos projets que j'en ai eu dans la 6B,

Aline, merci pour ta patience et ton accompagnement, j'ai beaucoup d'estime pour tout ce que tu as accompli et je te souhaite le meilleur,

Nadia, Bruna, Chloé, vous avez été les piliers de mon expérience au PARCC. Votre bienveillance, nos débats, nos échanges scientifiques et nos confrontations de pensées ont fait non seulement évoluer mon projet mais m'ont fait avancer en tant que personne.

Nadia, je te remercie pour tes enseignements et la confiance que tu m'as accordée dès les premiers instants,

Bruna, je te remercie de bousculer les codes sans compromis, merci pour ta bienveillance et ton humanité, merci pour tes rires à m'en décoller les tympanes,

Chloé, je te remercie d'avoir été mon binôme d'enfer au cours de cette dernière année, j'ai adoré travailler avec toi tant les choses étaient simples et notre communication facile. Je sais que ta force tranquille te mènera loin.

Merci la DREAMTEAM pour avoir illuminé mes journées, avoir élevé mon niveau de boomeuse en informatique, merci pour nos déjeuners pleins de rires, et les excès qui nous ont parfois habités. Merci pour ces années qui resteront gravées dans ma mémoire.

Monsieur Menasché, je souhaiterais en premier lieu vous remercier d'avoir accepté de me confier ce projet de thèse. Evoluer à vos côtés a été une expérience combien enrichissante et formatrice. La confiance que vous accordez à votre équipe, qui plus est à la jeune génération, et votre présence forte aux côtés de ses membres est rare et nous invite à donner le meilleur investissement possible. Après quelques années sous votre direction, je sors de mon expérience forte des enseignements multiples que vous nous avez appris : une exceptionnelle capacité de travail (que nous peinons à égaler !), une vision scientifique claire (« Qui embrasse trop mal étreint »), des compétences transversales nombreuses (« La chance n'existe pas, ce que vous appelez la chance c'est l'attention aux détails »), une persévérance à toute épreuve (« Le succès c'est d'aller d'échec en échec sans perdre son enthousiasme ») ainsi que l'humilité qui est la vôtre. Merci pour toutes ces qualités que vous nous transmettez chaque jour et pour lesquelles j'ai beaucoup d'estime. Je vous remercie d'avoir partagé ces nombreuses clefs scientifiques et professionnelles avec nous et m'attacherai à les entendre de nouveau pour la suite de mon parcours.

Pour finir, je souhaiterais remercier infiniment ma sœur **Marine** et **mes parents**, qui m'ont soutenue sans concession, depuis mes premiers pas scientifiques. Merci de m'avoir supportée toutes ces années, d'avoir été à côté de moi sans trop l'être, d'avoir regardé la télé sans le son, d'avoir toujours veillé à ce que mon bureau soit agréable, d'avoir encouragé mes tentatives et aidé à porter mes échecs. Merci pour les petits mots sous la porte, les cuillères porte-bonheur et chaque attention que vous avez portée vers moi pour me soutenir. Je vous remercie pour les sacrifices que vous avez faits pour que nous puissions nous construire, l'éducation que vous nous avez donnée, l'équilibre, le sens du travail, le respect et l'ouverture d'esprit sont des valeurs qui dictent qui je suis aujourd'hui et sur lesquelles je me repose quotidiennement pour avancer. Même si le chemin professionnel est encore long, je sais la solidité de la famille que nous formons et elle me donne confiance pour l'avenir.

Merci à **Pierre-Antoine** d'être l'homme qui partage ma vie. Merci pour ton soutien, ton humour et la légèreté que tu as su m'apporter lorsque mon quotidien était lourd, merci pour cet esprit brillant qui est le tien et que j'admire, merci pour nos confrontations (celles qui nous ont fait avancer !), merci de dessiner à mes côtés les notes d'une partition d'une vie que je vois heureuse.

Merci à **mes ami(e)s**, mon oxygène.

Merci à **mes proches**, pour votre amour.

Tables des matières

Remerciements	2
Tables des matières	5
Liste des principales abréviations	8
Introduction	9
I. Cardio-oncologie : Définition et susceptibilité	9
II. Thérapies anti-cancéreuses	10
1) Les traitements conventionnels.....	10
2) Les thérapies ciblées et immunothérapies	11
III. Anthracyclines	12
1) Structure	12
2) Mécanismes d'action anti-cancéreux	13
IV. Contraction musculaire cardiaque	14
V. Mécanismes cardiotoxiques	16
1) Principaux mécanismes cardiotoxiques.....	16
2) Mécanismes cardiotoxiques secondaires	18
3) Remodelage métabolique.....	20
4) Prédipositions et facteurs de risques	21
VI. Physiopathologie, incidence et recommandations	23
1) Physiopathologie et incidence	23
a. Moment d'apparition des effets cardiotoxiques.....	23
b. Nature des effets cardiotoxiques	23
2) Recommandations et surveillance	24
VII. Dysfonction ventriculaire gauche et modalités d'imagerie	27
1) Remodelage cardiaque physiologique	27
2) Remodelage cardiaque pathologique	29
3) Symptômes d'insuffisance cardiaque	31
4) Modalités d'imagerie	32
5) Manifestations cliniques	34
VIII. Modèles animaux	37
1) Modèles	37
2) Pertinence	38
3) Reproductibilité	40
IX. Potentiels traitements cardioprotecteurs	41
1) Réduction des doses et systèmes de délivrance.....	41
2) Médicaments contre l'insuffisance cardiaque	41
3) Statines	41
4) Modulateurs de mitochondries	42
X. Thérapie cellulaire	42
1) Cellules souches	43
2) Thérapie cellulaire cardiaque à partir de cellules souches de tissus adultes.....	46
3) Thérapie cellulaire cardiaque à partir de cellules souches pluripotentes.....	48
a. Choix du type cellulaire	49
b. Sécurité	50
c. Source allogénique ou autologue.....	50
d. Optimisation de la survie des cellules transplantées	51
e. Clarification du mécanisme d'action (thérapie de remplacement ou effet paracrine).....	51
XI. Thérapie cellulaire sans transplantation de cellules	52
1) Mécanisme paracrine	52

2)	Biogènes des VEs	53
3)	Contenu des VEs	54
4)	Classifications et caractérisation des VEs	55
5)	VEs dans essais cliniques.....	57
6)	Thérapies vésiculaires dans la réparation cardiaque.....	57
XII.	Rationnel et objectifs de recherche.....	59
1)	Rationnel.....	59
2)	Problématique et objectifs	60
	Matériels et Méthodes.....	62
I.	Production des sécrétomes.....	62
1)	Production des EV-CPC	62
2)	Production des GMP-EV.....	64
II.	Caractérisation de l'enrichissement en VEs des sécrétomes isolés	64
1)	Distribution de tailles et concentration protéique	65
2)	Morphologie	65
3)	Expression de marqueurs vésiculaires	67
a.	MACSPlex	67
b.	Elisa	67
c.	Analyses protéomiques.....	68
d.	Western Blot anti-HSC70.....	71
4)	Tests de fonctionnalité.....	72
a.	Test de cicatrisation	72
b.	Test de survie cellulaire.....	73
III.	Evaluation du métabolisme énergétique <i>in vitro</i>	74
1)	Caractérisation des cellules	74
2)	Evaluation de la fonction mitochondriale.....	75
IV.	Modèles animaux de cardiopathie à la chimiothérapie et administration des EV-CPC et GMP-EV	77
1)	Modèles animaux.....	77
2)	Évaluation fonctionnelle par IRM cardiaque chez la souris	80
3)	Évaluation fonctionnelle par échocardiographie chez le rat	82
V.	Analyse des mécanismes moléculaires de l'effet des EV-CPC dans les cœurs de souris.....	83
1)	Analyses transcriptomiques des cœurs de souris par qRT-PCR et histologie	83
2)	Analyses transcriptomiques des cœurs de souris par puces Affymetrix®	84
3)	Analyses protéomiques des cargos présents dans les EV-CPC	87
VI.	Statistiques	88
	Résultats	89
I.	Production et caractérisation des sécrétomes enrichis en vésicules extracellulaires issus de progéniteurs cardiaques	89
1)	Production adaptable avec une réalisation à large échelle	89
2)	Caractérisation du sécrétome issu de CPC.....	90
3)	Caractérisation du sécrétome issu d'un processus compatible avec les bonnes pratiques de fabrication	94
4)	Bio-activité des EV-CPC et GMP-EV.....	95
II.	Effet des EV-CPC sur le métabolisme énergétique de cardiomyocytes humains	96
1)	Rationnel.....	96
2)	Les EV-CPC restaurent une partie de la capacité de production d'énergie des cardiomyocytes traités à la DOX	97
III.	Mise en place d'un modèle chronique de cardiopathie aux anthracyclines chez la souris et évaluation du bénéfice fonctionnel du traitement par les EV-CPC	101
1)	Rationnel.....	101
2)	Validation du modèle.....	102
3)	Les EV-CPC améliorent la contractilité myocardique des cœurs de souris traités à la DOX.....	107

IV. Mise en place d'un modèle de cardiopathie aux anthracyclines chez le rat et évaluation du bénéfice fonctionnel du traitement par les GMP-EV	110
1) Validation du modèle.....	110
2) Les GMP-EV préservent les volumes ventriculaires gauches des cœurs de rats traités à la DOX....	111
V. Le traitement par EV-CPC est associé au maintien du métabolisme et de l'homéostasie chez les souris DOX	112
1) Analyse des cargos protéiques des EV-CPC	112
2) Etude de la signature moléculaire des EV-CPC dans les cœurs de souris DOX	114
<i>Discussions</i>	116
1) Nécessité de nouveaux traitements en cardio-oncologie.....	116
2) Choix de l'approche thérapeutique	117
3) Choix du mode d'administration et bio-distribution	118
4) Choix des modèles d'étude et des modalités de mesure	120
5) Limites des modèles expérimentaux <i>in vivo</i>	120
6) Limites du traitement	121
7) Cellules réceptrices et mécanismes d'action	123
8) Faisabilité d'une production clinique.....	125
<i>Conclusions</i>.....	127
<i>Contributions au projet et financements</i>	129
<i>Valorisation scientifique</i>	130
<i>Tables des illustrations</i>.....	132
<i>Liste des tableaux</i>	133
<i>Table des figures annexes</i>	134
<i>Liste des tableaux annexes</i>.....	135
<i>Bibliographie</i>	136
<i>Annexes</i>.....	151
<i>Résumés</i>	158
<i>Publication annexe</i>	160
<i>Liste des éléments sous droits</i>	173

Liste des principales abréviations

ADN/ARN : Acide Désoxyribonucléique / Acide Ribonucléique

ARB : Bloqueurs de Récepteurs à l'Angiotensine

ATP : Adénosine Triphosphate

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

CPC : Cellules Progénitrices Cardiaques

CryoMET : CryoMicroscopie Electronique à Transmission

CSE : Cellule Souche Embryonnaire

CSM : Cellules Stromales Mésoenchymateuses

CSPi : Cellules Souches Pluripotentes induites

CSPs : Cellules souches pluripotentes

CVD : Maladies Cardiovasculaires

ESC : Société Européenne de Cardiologie

EV-CPC : Vésicules Extracellulaires issues de Cellules Progéniteurs Cardiaques

FEVG : Fraction d'Ejection Ventriculaire Gauche

GMP-EV : Vésicules Extracellulaires issues de Cellules Progéniteurs Cardiaques produites à l'échelle et en respect des règles BPF

GTPase : classe d'enzymes couplée à la transduction du signal

IECA : Inhibiteurs de l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine

NAD⁺/NADH : couple de co-enzymes d'oxydo-reduction Nicotinamide Adénine Dinucleotide

NADP⁺/NADPH : couple de co-enzymes d'oxydo-reduction Nicotinamide Adénine Dinucleotide Phosphate

NTA : Analyse de Suivi de Nanoparticules

ROS : Espèces Réactives de l'Oxygène

SC : Strain (déformation) Circonférentiel

SHAM : animaux traités de façon fictive par une injection de tampon isotonique

SLG : Strain (déformation) Longitudinal Global

Top2 : Topoisomerase II

VEs : Vésicules Extracellulaires

VTD : Volume Télédiastolique

VTS : Volume Télésystolique

Introduction

I. Cardio-oncologie : Définition et susceptibilité

La première mention du terme cardio-oncologie est apparue dans PubMed en 1989. Depuis, le nombre de citations le mentionnant n'a fait que grandir de façon logarithmique tant cette discipline nouvelle, à l'intersection entre deux spécialités majeures de la médecine actuelle, s'est développée (Figure 1) jusqu'à atteindre 695 publications en 2021.

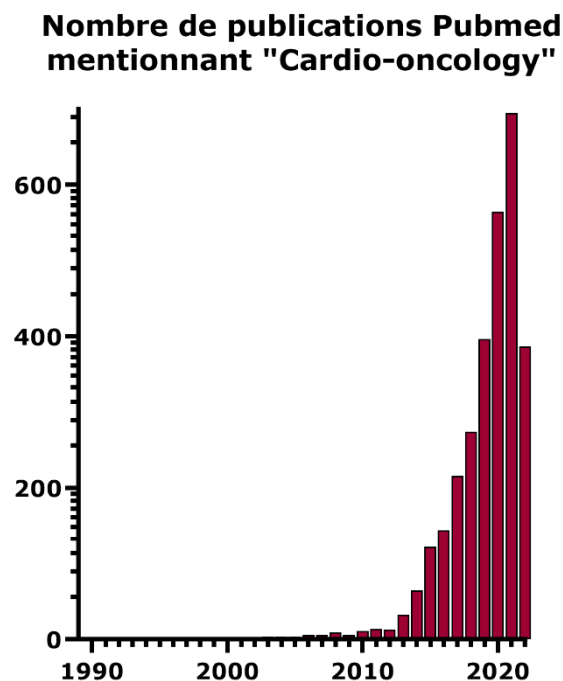


Figure 1: Graphique représentant le nombre de publications référencées dans PubMed portant la mention « cardio-oncology » depuis la naissance de cette discipline jusqu'à aujourd'hui.

La cardiologie et l'oncologie sont deux domaines intimement liés : ils partagent des facteurs de risque (prédispositions génétiques, diabète, hypertension artérielle, tabagisme, surpoids, hyperlipidémie, vieillissement, mode de vie sédentaire), des mécanismes physiopathologiques, ainsi que des traitements, donnant lieu à des susceptibilités réciproques. Du fait du vieillissement de la population ainsi que des avancées des thérapies anti-cancéreuses, nombre de patients traités en oncologie, sont aussi exposés à des complications cardiovasculaires, non seulement parce que certains traitements anti-cancéreux sont directement toxiques pour le cœur, mais

aussi parce que le cancer lui-même sensibilise au développement des maladies cardiovasculaires (CVD). La réciproque est aussi vraie puisque le terme « reverse cardio-oncology » (1) apparu en 2008 implique que les patients atteints d'insuffisance cardiaque sont plus susceptibles de développer des cancers et ont un pronostic de survie inférieur aux patients cancéreux sans insuffisance cardiaque.

Cancer et CVD sont les deux premières causes mondiales de mortalité avec une estimation à 18,56 millions de décès par CVD et 10,08 millions de décès par cancer dans le monde en 2019 d'après l'étude du « Global Burden of Disease »(2). Plus spécifiquement, les cardiopathies aux anthracyclines ont un risque relatif de décès plus élevé que la cardiomyopathie idiopathique et ischémique (3). La prévalence des CVD chez les patients ayant ou ayant eu un cancer est nettement augmentée et dépend de l'âge du patient au moment du cancer, du traitement anti-cancéreux choisi ainsi que de la définition de cardio-toxicité associée. Malgré une définition encore non standardisée la prévalence des cardiotoxicités aux anthracyclines a récemment fait l'objet d'une étude, le « CARDIOTOX registry » (4).

La cardio-oncologie est donc une discipline transversale dont le but est la facilitation des thérapies efficaces contre le cancer tout en minimisant leurs séquelles cardiovasculaires. Cela nécessite un examen attentif des risques et des avantages des stratégies envisagées ainsi qu'une surveillance poussée, régulière et reposant sur des indicateurs sensibles.

Les principales CVD développées à la suite d'un cancer traité sont l'hypertension artérielle, des accidents thrombotiques artériels ou veineux, les troubles du rythme, les myocardites et l'insuffisance cardiaque.

II. Thérapies anti-cancéreuses

Parmi l'arsenal thérapeutique anti-cancéreux, on trouve différentes classes de médicaments : les thérapies classiques et les thérapies ciblées.

1) Les traitements conventionnels

Les traitements conventionnels (isotopes radioactifs, antibiotiques, hormones, anti-métabolites, agents alkylants, anti-microtubules) sont des

cytotoxiques destinés à bloquer la mitose des cellules cancéreuses et sont donc qualifiés d'antineoplasiques. Ils ne sont pas cellule-spécifiques et provoquent des dommages de l'ADN ou bloquent le cycle cellulaire conduisant à la mort cellulaire.

2) Les thérapies ciblées et immunothérapies

Les thérapies ciblées (transfert de cellules T dont le récepteur antigénique a été modifié, anti HER2 (anti- Epidermal Growth Factor Receptor 2), anti-VEGF (anti Vascular Endothelial Growth Factor), inhibiteurs de tyrosine-kinase ou de protéasomes, agissent directement sur la cellule tumorale pour empêcher sa survie, sa migration, son adhérence ou encore sa prolifération (5-7).

A contrario, les immunothérapies spécifiques agissent indirectement sur la tumeur en stimulant le système immunitaire. Les inhibiteurs des points de contrôle immunitaire, par exemple, permettent de lever le frein immunitaire exprimé par les cellules tumorales en se liant soit à la protéine inhibitrice soit à son récepteur sur le lymphocyte et permettent donc d'activer la mort cellulaire tumorale. Les drogues immuno-modulatrices peuvent inhiber l'angiogenèse de l'environnement tumoral ou permettent le relargage de cytokines stimulant la réponse immunitaire anti-tumorale. Les anticorps monoclonaux peuvent agir de plusieurs manières : en aidant le système immunitaire à reconnaître la cible, en transportant des traitements ciblés au contact de la tumeur ou encore en empêchant directement la prolifération tumorale.

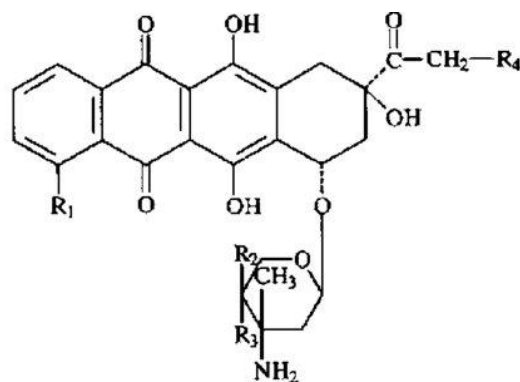
En fonction des biomarqueurs exprimés par les cellules tumorales, l'une ou l'autre, ou une combinaison de thérapies cytotoxique et ciblée sont préconisées.

La fragmentation des définitions de la toxicité cardiaque ainsi que le manque d'étude multicentriques limitent l'obtention de chiffres consensuels sur l'incidence des complications cardiaques de chaque traitement anti-cancéreux mais on ne saurait nier que leur première toxicité hors cible est cardiaque (6,8).

III. Anthracyclines

1) Structure

Parmi les antinéoplasiques les plus utilisés, les anthracyclines de la classe des antibiotiques tétracyclines ont été extraites de *Streptomyces peucetius var. caesius*. à partir de différentes souches de bactéries filamenteuses présentes en Italie, près de la mer Adriatique (préfixe adria-). Leurs structures moléculaires contiennent plusieurs cycles aromatiques fluorescents de couleur rubis (suffixe « -rubicine ») et de structure quinone et hydroquinone capables d'accepter ou de donner des électrons (Figure 2) (9).



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Doxorubicin	—OCH ₃	—H	—OH	—OH
Daunorubicin	—OCH ₃	—H	—OH	—H
Epirubicin	—OCH ₃	—OH	—H	—OH
Idarubicin	—H	—H	—OH	—H

Figure 2 : Formules topologiques des anthracyclines

La doxorubicine (DOX) (commercialisée sous le nom d'Adriamycine) et la daunorubicine sont naturellement produites et ont comme analogues l'idarubicine et l'épirubicine qui diffèrent dans leurs structures chimiques et ont des activités cliniques distinctes puisque la daunorubicine et l'idarubicine ont été principalement utilisées dans les leucémies aiguës, tandis que la DOX et l'épirubicine présentent une activité plus large contre les tumeurs solides.

Habituellement administrées en infusion veineuse ou par administration intra-vésicale, elles quittent rapidement le plasma sanguin (elles ont une demi-vie plasmatique de 36 heures) et sont rapidement captées par divers

organes (cœur, reins, poumons, foie et rate) pour se fixer sur les tissus sous forme active, non métabolisée. Elles sont éliminées principalement par voie hépatobiliaire sous forme de produit inchangé et de métabolites alcooliques (40 à 50% de la dose en 7 jours) ; l'excrétion urinaire est négligeable (environ 10% de la dose). Une fois fixées sur les tissus, les anthracyclines peuvent librement pénétrer les membranes des organelles grâce à leurs différentes régions hydrophiles et hydrophobes.

Les anthracyclines sont parmi les agents anti-cancéreux les plus efficaces et ceux dont le spectre d'activité reste à ce jour l'un des plus étendus. Les indications concernées par ce traitement sont donc nombreuses : carcinomes du sein, sarcomes des os et des parties molles, maladie de Hodgkin, lymphomes non hodgkiniens, tumeurs solides de l'enfant, cancers du poumon, leucémies aiguës et chroniques, cancers de la vessie, de l'ovaire, de l'estomac. Le dosage dépend de la surface corporelle et varie selon l'indication, le type d'anthracycline utilisé et la voie d'administration mais il est empiriquement recommandé de ne pas dépasser une dose cumulative de 550mg/m^2 , au-delà de laquelle le risque de cardiotoxicité augmente rapidement, voire de 450mg/m^2 pour les patients ayant d'autres facteurs de risque que le cancer ou ayant préalablement reçu une radiothérapie.

2) Mécanismes d'action anti-cancéreux

Une fois entrées dans la cellule cancéreuse, les anthracyclines s'accumulent principalement dans le noyau et la mitochondrie (10) et ont pour principaux mécanismes d'action :

- L'inhibition de la topoisomérase II (Top2). Les ADN topoisomérases sont des enzymes nucléaires multimériques qui réduisent la contrainte de torsion de l'ADN permettant à des régions sélectionnées d'ADN de se démêler pour permettre la réplication, la réparation ou la transcription. Spécifiquement, la topoisomérase II produit des cassures double brin au niveau du 3' phosphate de l'ADN permettant le passage du brin et le déroulement de l'ADN super-enroulé. Après le déroulement, l'enzyme religue les deux brins. Par ailleurs, les anthracyclines peuvent aussi s'intercaler entre des bases d'ADN via

des liaisons non covalentes, affectant directement la transcription et la réplication puisqu'elles forment un complexe hétérotrimérique avec la topoisomérase II et l'ADN, stabilisant le complexe de clivage et inhibant la religation des brins d'ADN rompus.

- Les anthracyclines ont également d'autres propriétés comme la capacité à interagir avec l'oxygène pour générer des radicaux libres qui oxydent l'ADN et induisent une peroxydation lipidique détruisant les membranes cellulaires (11). Cette peroxydation lipidique qui se produit lorsque des radicaux libres (comme le radical hydroxyl HO⁻) sont générés à proximité des membranes cellulaires conduit à des échanges d'électrons entre les radicaux libres et les chaînes d'acides gras, formant des hyperoxides lipidiques et augmentant la perméabilité membranaire. Ces hyperoxides lipidiques peuvent aussi former des aldéhydes cytotoxiques qui créent des dommages aux protéines membranaires et inactivent les récepteurs enzymatiques.

La génération des radicaux libres par les anthracyclines se fait principalement par deux mécanismes : un mécanisme non-enzymatique par lequel elles interagissent directement avec un ion ferrique Fe³⁺ (causant des radicaux libres) et un mécanisme enzymatique où l'anthracycline interagit avec la chaîne respiratoire mitochondriale ou d'autres enzymes contenant des cytochromes pour produire des espèces réactives de l'oxygène (ROS). L'ensemble de ces mécanismes conduisent à la mort cellulaire tumorale mais sont aussi spécifiquement responsables des effets hors cibles notamment cardiaques.

IV. Contraction musculaire cardiaque

Le muscle cardiaque apparaît strié en raison de l'organisation du tissu musculaire en sarcomères qui représentent un assemblage de CM contractiles en myofibrilles tubulaires. Chaque sarcomère est séparé par des disques intercalaires dont les jonctions GAP transmettent les potentiels d'action électriques au sarcomère adjacent et permettent la contraction coordonnée du myocarde. La cellule musculaire à son état de repos présente une membrane plasmique (appelée sarcolemme), chargée

négativement par rapport à l'espace extracellulaire, dont la polarisation est maintenue par une balance ionique d'ions sodium (Na^+) et potassium (K^+). Le processus de contraction du muscle cardiaque, appelé couplage excitation-contraction, est initié par les cellules pacemakers des nœuds sinoïdaux et auriculo-ventriculaires et, comporte 4 phases :

- Lorsque le potentiel d'action électrique arrive au CM, il déclenche la dépolarisation de la membrane du CM et l'ouverture des canaux Na^+ à ouverture rapide ;
- La phase de plateau est atteinte lorsque cette dépolarisation active des canaux calciques (Ca^{2+}) dépendants du voltage sur le sarcolemme et induit l'afflux de Ca^{2+} dans la cellule ce qui active la libération du Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique via les récepteurs à la ryanodine. Ce processus est appelé « libération de calcium induite par le calcium ». Ce Ca^{2+} intracellulaire diffuse dans le cytosol pour se lier à la troponine C ce qui déplace le complexe de troponines en dehors du site de liaison à l'actine et la libère pour qu'elle se lie à la myosine. L'hydrolyse d'une molécule d'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine diphosphate (ADP) et en phosphate inorganique par la tête de myosine permet le pivotement de celle-ci ce qui tire sur l'actine et la déplace, provoquant la contraction musculaire.
- La repolarisation se produit lorsque les canaux K^+ s'ouvrent et que celui-ci diffuse hors de la cellule. Dans le même temps, les canaux Ca^{2+} se ferment. Ces événements rétablissent la polarisation initiale de la membrane, sauf que les positions du K^+ et du Na^+ de chaque côté du sarcolemme sont inversées ;
- Il s'ensuit une période réfractaire, pendant laquelle les concentrations de K^+ et de Na^+ sont activement rétablies de chaque côté du sarcolemme par les pompes Na^+/K^+ . La cellule musculaire ne peut pas se contracter à nouveau tant que les ions Na^+ et K^+ ne sont pas ramenés à leur état de potentiel de repos. Le Ca^{2+} intracellulaire est ensuite stocké dans le réticulum sarcoplasmique ou extrudé hors de la cellule en échange d'un ion Na^+ , ce qui fait chuter la concentration de calcium intracellulaire. Une nouvelle molécule d'ATP se lie à la tête de myosine, ce qui la détache de l'actine, ramène le complexe

troponine à sa position inhibitrice sur le site actif de l'actine et met effectivement fin à la contraction, ce qui permet le relâchement musculaire.

La période réfractaire du muscle cardiaque est nettement plus longue que celle du muscle squelettique. Cela empêche la tétanie de se produire et garantit que chaque contraction est suivie d'un temps suffisant pour permettre à la chambre cardiaque de se remplir de sang avant la contraction suivante.

L'ATP joue un rôle essentiel dans le processus de contraction cardiaque, et son défaut induit nécessairement une diminution de la contraction myocardique. Par ailleurs, certains sous-types de troponines peuvent être utilisés comme marqueurs très spécifiques des lésions du muscle cardiaque, en particulier les troponines I et T.

V. Mécanismes cardiotoxiques

1) Principaux mécanismes cardiotoxiques

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la toxicité cardiaque sont les mêmes que ceux impliqués dans la lyse tumorale. Leur incidence particulièrement élevée dans le cœur peut s'expliquer par différentes raisons :

- Les anthracyclines inhibent les Top2 et notamment l'isoenzyme Top 2b spécifiquement exprimée par les cellules quiescentes du myocarde (contrairement à la Top2a qui est exprimée par les cellules hautement prolifératives que sont les cellules cancéreuses) (12-14).

Les dommages à l'ADN nucléaire ainsi provoqués induisent des effets à long terme sur l'expression génique et le maintien de son intégrité. Ceci est encore plus vrai pour l'ADN mitochondrial qui code principalement pour des enzymes de la phosphorylation oxydative, qui est proche de la chaîne de respiration mitochondriale et qui possède une capacité de réparation plus limitée que l'ADN nucléaire (15).

- La génération par les anthracyclines de radicaux libres par des mécanismes enzymatiques et non enzymatiques (16) touche le cœur principalement par ce qu'il est l'organe le plus actif métaboliquement.

En effet, le cœur possède le plus grand contenu en mitochondries, elles représentent 30% du poids des cardiomyocytes et sont responsables de la production de 90% de l'ATP utilisé par ces cellules, principalement via la phosphorylation oxydative qui résulte de réactions d'oxydo-réduction successives à travers la chaîne de respiration (17).

Les mitochondries cardiaques sont donc des cibles intracellulaires clés, à la fois en tant que sites de génération de ROS et comme cibles directes (18).

La cardiolipine, un phospholipide présent dans la membrane interne des mitochondries des cellules métaboliquement actives telles que les cellules cardiaques et musculaires, stabilise les complexes protéiques importants pour le transport des ions et de l'adénine et assure l'imperméabilité de la membrane interne aux protons. Les anthracyclines ayant une forte affinité pour la cardiolipine, une fois leur liaison effectuée, les enzymes des différents complexes (NADH déshydrogénase et NADPH cytochrome, p450, oxydoréductase) transportent les électrons des coenzymes réduits NADH (b) et NADPH (a) respectivement sur l'anthracycline plus qu'au travers de la chaîne, résultant en l'oxydation de la fonction quinone de l'anthracycline en semiquinone (Figure 3) (16).

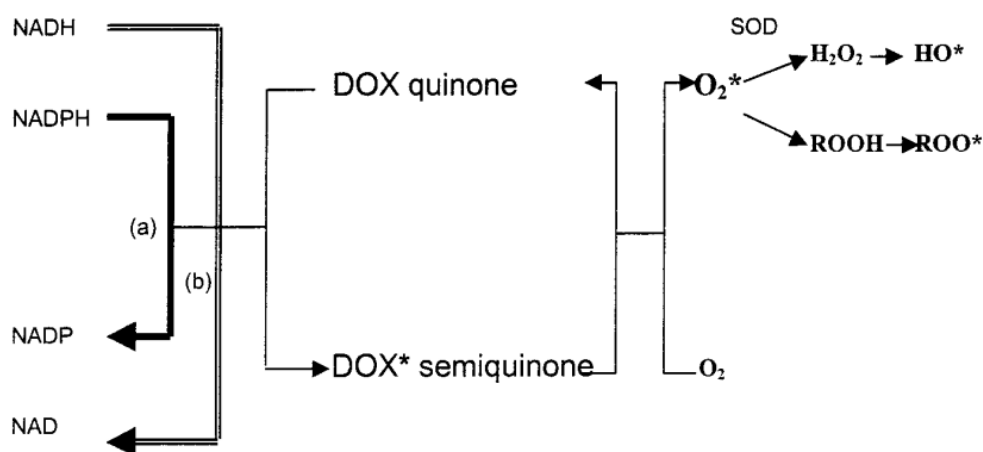


Figure 3 : Génération de radicaux libres à partir des anthracyclines via des réactions d'oxydo-réduction dans la membrane mitochondriale

Par la suite, la semiquinone se stabilise à l'état oxydé en transférant son électron à l'oxygène qui se trouve alors sous forme de radical superoxyde. Ce radical soit initie la peroxydation lipidique soit est converti en peroxyde d'hydrogène H₂O₂. Ces deux espèces se décomposent alors en radicaux libres hautement toxiques puisqu'ils entraînent une modification oxydative

des protéines mitochondriales, des lipides et de l'ADN mitochondrial, aboutissant à un dysfonctionnement mitochondrial et à la mort cellulaire. La défaillance bioénergétique mitochondriale joue donc un rôle critique dans la cardiotoxicité induite par la DOX. Comme la DOX s'accumule principalement dans les mitochondries, l'abondance de celles-ci dans le tissu cardiaque peut expliquer la toxicité cardio-sélective du médicament, également favorisée par un réseau antioxydant moins actif dans le cœur que dans d'autres tissus comme le foie par exemple.

2) Mécanismes cardiotoxiques secondaires

Par ailleurs, de nombreux autres mécanismes ont été décrits pour expliquer la cardiotoxicité des anthracyclines :

- l'ouverture des pores de perméabilité mitochondriale : les anthracyclines et notamment la DOX ont été décrits comme induisant la transition de perméabilité mitochondriale en favorisant l'ouverture des pores de perméabilité mitochondriale ; il en résulte la perte de la capacité de maintenir le gradient électrochimique de la membrane interne qui conduit à la mort cellulaire par apoptose (19,20)
- l'inhibition des membres de la famille des sirtuines (SIRT): ces enzymes catalysent la déacétylation des résidus lysines sur les histones, notamment SIRT3 responsable du maintien de la phosphorylation oxydative via l'utilisation préférentielle de l'oxydation des acides gras et SIRT1, protéine multifonctionnelle impliquée dans de nombreux processus biologiques comme le développement cardiaque, l'autophagie, le cycle circadien ou encore l'activité cardiaque électrique (21).
- l'accumulation excessive du fer dans les mitochondries via divers mécanismes : via la régulation de son entrée dans la mitochondrie ou de son stockage mais aussi par un effet sur la ferroptose (mort cellulaire caractérisée par une peroxydation lipidique induite par le fer) (22).
- La perturbation de l'homéostasie calcique : la DOX peut entraîner une sur-activation des canaux calciques responsables de l'entrée du

calcium dans la cellule ou des récepteurs à la ryanodine responsables du relargage intracellulaire du calcium depuis le réticulum endoplasmique, la phosphorylation des kinases calmoduline-dépendantes ayant les mêmes effets ou un stress du réticulum endoplasmique. Une homéostasie calcique perturbée endommage la fonction cardiaque de manière aiguë et chronique en induisant l'apoptose et l'hypertrophie : à une concentration élevée de calcium dans la matrice mitochondriale, les pores de transition de perméabilité mitochondriale s'ouvrent, entraînant une dissipation du gradient électrochimique, un gonflement de la matrice, une rupture de la membrane externe et la libération des facteurs apoptogènes (protéine Bcl-2-associated X (Bax) et cytochrome c) dans l'espace intermembranaire entraînant des lésions irréversibles. Des niveaux élevés de calcium intracellulaire peuvent également activer la calcineurine, une substance impliquée dans la régulation de nombreux processus comme l'hypertrophie cardiaque ou l'apoptose via l'activation du facteur nucléaire des lymphocytes T activés (NFAT).

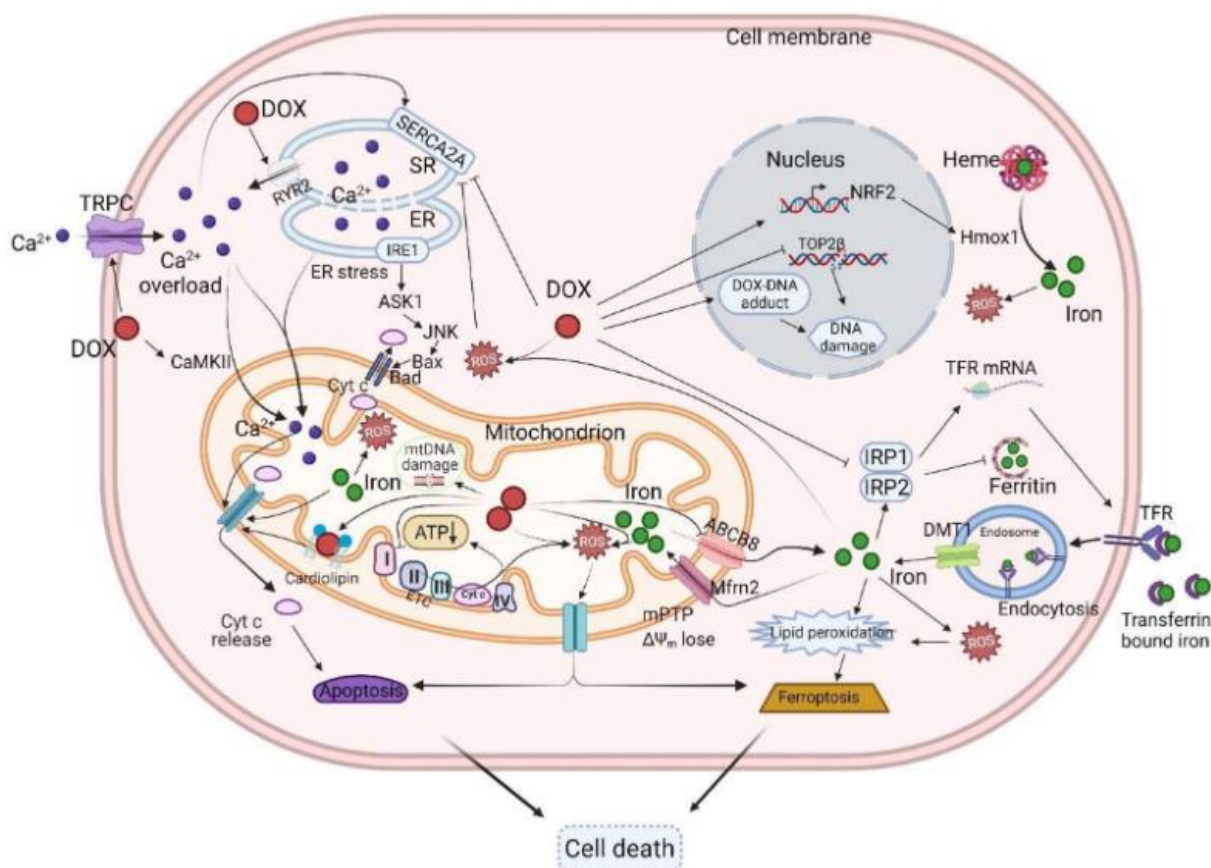


Figure 4 : Diagramme schématisé des mécanismes responsables de la toxicité cardiaque

Il résulte de toutes ces données que les mécanismes cardiotoxiques des anthracyclines sont complexes et multifactoriels (illustrés Figure 4) (23).

3) Remodelage métabolique

Pour soutenir ses performances contractiles, le cœur requiert de grandes quantités d'énergie généralement stockées sous forme d'ATP mais aussi de phosphocréatine (PC) lorsque ses besoins augmentent. Pour subvenir à son activité incessante, il est équipé d'une machinerie métabolique qui converge vers la phosphorylation oxydative mitochondriale, responsable de 90% de la demande en énergie et, dans des conditions normales est dépendante de 60% à 90% de l'oxydation des acides gras comme substrats. Le reste de la production d'ATP se fait pour 10% à 40% par oxydation du pyruvate produit en quantité égale par la glycolyse ou l'oxydation du lactate (24). La flexibilité métabolique du cœur (i.e. sa capacité à changer de substrat pour assurer une continuité de production d'énergie) est cruciale pour son métabolisme. Le choix entre les différents substrats se fait 1) en fonction de la disponibilité d'activité des principales enzymes limitantes (au regard de leur expression et de leur état d'activation), 2) de la « jauge de carburant » qu'est l'enzyme adénosine 5 protéine kinase monophosphate (AMPK). Activée lorsque le stress métabolique est élevé, elle déclenche des voies cataboliques qui génèrent de l'ATP tout en régulant à la baisse, par phosphorylation, les processus qui sont impliqués dans la survie cellulaire à court terme, comme le métabolisme biosynthétique qui consomme rapidement le pool d'ATP. Dans ce contexte, l'activation de facteurs de transcription régule l'expression des enzymes limitantes clés dont les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR) et leurs co-activateurs PGC1 α (Co-activateur Gamma 1-alpha du Récepteur Activé par les Proliférateurs de Peroxysomes), qui sont régulateurs essentiels de la biogenèse mitochondriale.

Dans des conditions de stress physiologique et notamment au cours de la dysfonction cardiaque, la glycolyse ou les substrats alternatifs comme les corps cétoniques ou les acides aminés peuvent devenir les principales sources d'énergie (25). Malgré ces événements compensatoires précoces

(Figure 5) (25), l'utilisation persistante de glucose finit par devenir inadaptée et conduit à une défaillance énergétique, où la glycolyse et la fonction mitochondriale altérée ne permettent plus aux cardiomyocytes de répondre à la demande énergétique. Des études sur des modèles animaux ont montré que la résistance à l'insuline et des modifications métaboliques telles que la réduction de l'oxydation mitochondriale du glucose, du lactate et des acides gras sont des marqueurs précoces présumés du stress cardiaque (26).

Par leur action directe sur la mitochondrie, les anthracyclines et notamment la DOX non seulement délitent le pool d'ATP (27) mais inhibent la flexibilité métabolique cardiaque via l'atteinte de l'expression génique de ses enzymes clés mais aussi des principaux senseurs qui la permettaient (28).

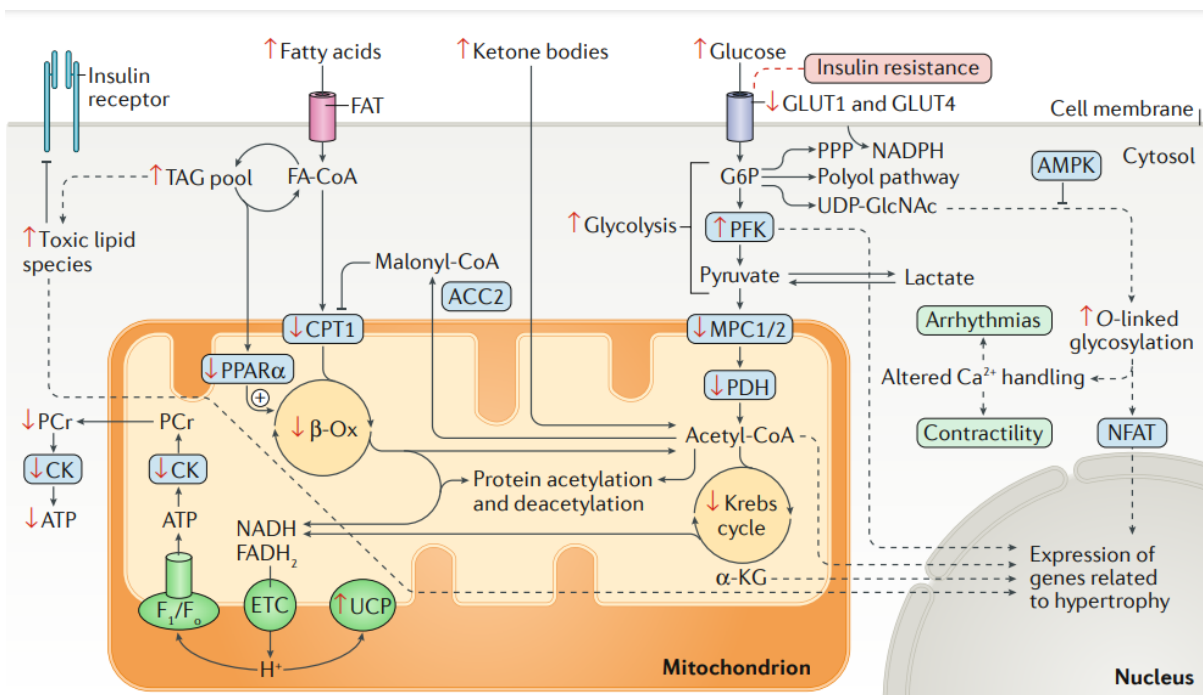


Figure 5 : Remodelage métabolique et transcriptionnel dans l'insuffisance cardiaque. Les flèches rouges indiquent des changements dans l'insuffisance cardiaque. Les lignes pointillées relient les intermédiaires métaboliques à la régulation de l'expression génique

4) Prédispositions et facteurs de risques

Des facteurs de risque (diabète, hypertension artérielle, tabagisme, surpoids, hyperlipidémie, âge précoce ou vieillissement au moment du cancer, mode de vie sédentaire) sont autant d'éléments prédisposant les

patients au développement de cardiotoxicités à la suite d'un traitement par chimiothérapie. De plus, des études ont démontré qu'il existe des variants génétiques souvent multigéniques conférant une sensibilité accrue aux formes graves de cardiotoxicité : chez l'Homme des mutations sur un seul nucléotide (SNP) dans les gènes *CYBA*, *RAC2*, *NCF4*, *MRP1* and *MRP2* ont été décrits comme associés au développement de cardiotoxicités (29). Ces gènes sont des composants des complexes NADPH oxydase et des protéines de résistance multi-drogues (qui aident notamment à baisser la concentration intracellulaire en anthracyclines) dont les mutations constituent des facteurs de risque de l'augmentation du stress oxydatif, du remodelage métabolique et donc de la survenue de cardiotoxicité. Par ailleurs des mutations dans des gènes codant pour des protéines clés d'intégrité et de fonctionnement des sarcomères cardiaques ont été aussi largement décrits comme favorisant l'apparition de formes graves de cardiotoxicité. Pour n'en citer que quelques-unes : la protéine géante TITIN, en première ligne, qui fournit une force passive et régule la contraction du sarcomère (30); la lamine A (LMNA) impliquée dans de nombreux mécanismes cellulaires allant de la régulation de l'expression génique et de la réplication au transport nucléaire et cytoplasmique et à la mécano-détection; le phospholamban (PLN) composant majeur du couplage excitation/contraction musculaire via son activité régulatrice de la pompe SERCA (réticulum sarcoplasmique Ca^{2+} /ATPase); les protéines de liaison à l'ARN (RNA binding Motif protein RBM20, RMB24), importantes pour la myogénèse et dont la fonction d'épissage alternatif permet le développement musculaire normal et l'adaptation aux états pathologiques; et les protéines associées au cytosquelette d'actine (dystrophine, filamine, myosine) dont les mutations déstabilisent le sarcomère et mènent à un défaut de contractilité cardiaque (31).

Toutes ces mutations sont autant de prédispositions génétiques qui constituent des facteurs de risque élevés.

VI. Physiopathologie, incidence et recommandations

1) Physiopathologie et incidence

L'incidence des atteintes cardiaques (qui varient selon la population considérée, le schéma anticancéreux, la durée du suivi, la stratégie utilisée pour détecter la cardiotoxicité et la définition utilisée pour la classer) va de 5% pour des doses cumulées de 400mg/m² de DOX à 48% pour des doses de 700 mg/m² (5). Les sociétés savantes ont usuellement classé les effets cardiotoxiques selon deux critères :

a. Moment d'apparition des effets cardiotoxiques

- Aigu, survenant pendant ou immédiatement après la perfusion : les effets cardiotoxiques se traduisent par des perturbations de la conduction électrique (allongement du QT et arythmies) ;
- Précoce chronique survenant dans l'année qui suit l'exposition : la lésion des myocytes entraîne un déclin progressif de la fonction ventriculaire le plus souvent sans symptômes. Une étude portant sur 2625 patients (suivi moyen de 5.2 ans), a montré que 98% des cas de cardiotoxicité après traitement par anthracyclines sont détectés au cours de la première année (32) ;
- Tardif chronique, survenant 1 à 20 ans après l'exposition initiale avec des manifestations cliniques tardives et dans un contexte de présence d'autres facteurs de risque faisant penser que les anthracyclines affectent négativement les mécanismes de compensation (33).

b. Nature des effets cardiotoxiques

Décrits comme étant de type I, les dysfonctionnements générés par la chimiothérapie se produisent de manière dose-dépendante et cumulative. Les mécanismes cardiotoxiques décrits plus haut induisent des dommages liés aux facteurs de risque préexistants, à l'état de réserve cardiaque au moment de l'administration et à la variabilité individuelle (y compris la variabilité génétique décrite plus haut). Les biopsies myocardiques montrent que les lésions des cardiomyocytes sont graduelles par dégénérescence vacuolaire du réticulum sarcoplasmique, gonflement des

mitochondries puis désorganisation des myofibrilles aboutissant à la mort cellulaire (34). Compte-tenu de la capacité de régénération extrêmement limitée du cœur adulte (35), ces dommages sont irréversibles car le remodelage cardiaque, un temps bénéfique, ne suffit pas à compenser la perte de contractilité et conduit à la dysfonction ventriculaire. Le terme cardiotoxique de type I opposait autrefois la cardiotoxicité des anthracyclines aux autres cardiotoxicités non dose-dépendantes comme celle engendrée par le Trastuzumab, ne créant pas d'anormalités structurales visibles dans les cardiomyocytes exposés (36).

2) Recommandations et surveillance

Il n'existe pas actuellement de définition consensuelle de la cardiotoxicité dans le monde. En fonction des essais cliniques en oncologie et des positions des sociétés savantes, les définitions diffèrent et évoluent (Figure 6) (37). La diversité des mécanismes cardiotoxiques ajoute une complexité à ces classements.

	ESC	EACVI/ASE	ESMO/CREC	ASCO	CTCAE	FDA*
Cut-off for ejection fraction	<50%	<53%	<55%	<55%	<50%	–
Change in EF (absolute reduction)	>10% decline from baseline	>10% decline from baseline	Decline \geq 5% to less than 55% with symptoms, or decline \geq 10% to below 55% without symptoms	–	Grade 2 (resting EF 40–50%; 10–19% drop from baseline); Grade 3 (resting EF 20–39%; >20% drop from baseline); Grade 4 (resting EF <20%)	>20% decrease if EF remained normal, or >10% decrease if EF is less than normal
GLS	Relative reduction in GLS >15% from baseline	Relative reduction in GLS >15% from baseline	–	Relative reduction in GLS >15% from baseline	–	–

ASCO, American Society of Clinical Oncology; ASE, American Society of Echocardiography; CREC, Cardiac Review and Evaluation Committee; CTCAE, Common Terminology Criteria for Adverse Events (US Departments of Health and Human Services); EACVI, European Association of Cardiovascular Imaging; EF, ejection fraction; ESC, European Society of Cardiology; ESMO, European Society of Medical Oncology; FDA, US Food and Drug Administration; GLS, global longitudinal strain.

*For anthracyclines.

Figure 6 : Différences dans les définitions de cardiotoxicité

La définition actuelle de l'ESC suggère qu'il y a cardiotoxicité lorsque la fraction d'éjection ventriculaire gauche (FEVG) tombe au-dessous de 50 % ou baisse de 10% par rapport à sa valeur basale. Une diminution de 15 % par rapport à la valeur basale de la déformation globale longitudinale (strain longitudinal global [SLG]) normalement comprise entre 0% et -17,9 % est aussi considéré comme anormale (5,38).

Les anciennes classifications (aigu/précoce/tardif ou type I/II) laissent progressivement place à des définitions plus exhaustives dont celle proposée par le Royal Brompton Hospital (39) qui incorpore des altérations des biomarqueurs et/ou du SLG comme preuve d'une cardiotoxicité biochimique, fonctionnelle ou mixte (Figure 7) (39) et sur laquelle d'ailleurs s'appuie le CARDIOTOX registry précédemment mentionné.

Cardiotoxicity group	Classification	Definition	Management strategies	
			Oncology therapy	Cardiology therapy
1	Early biochemical cardiotoxicity	New BNP or troponin I rise but with normal cardiac imaging. (If normal at baseline, then any increase above the upper limit of normal. If abnormal at baseline, then 20% rise).	Continue	Cardio-oncology review. Consider closer monitoring, or start low-dose ACEI or BB cardioprotection.
2	Early functional cardiotoxicity	New reduction in GLS or grade III–IV diastolic dysfunction and normal biomarkers.	Continue	Cardio-oncology review. Consider closer monitoring, or start low-dose ACEI or BB cardioprotection.
3	Early mixed cardiotoxicity	Normal LVEF with abnormal biomarkers and GLS/diastolic dysfunction.	Continue	Cardio-oncology review. Start low-dose ACEI or BB cardioprotection.
4	Symptomatic HFpEF	Symptomatic HFpEF.	Interrupt and review risk/benefit*	Cardio-oncology review. Diuretic for fluid congestion. ACEI or BB cardioprotection if continuing cancer therapy.
5	Asymptomatic LVSD	New LVEF reduction to <50%, or a reduction in LVEF >10% to a LVEF <55% [†] .	Review and balance risk/benefit*	Cardio-oncology review. Start ACEI and/or BB and up-titrate to 50–100% target dose for HF as tolerated.
6	Symptomatic LVSD	Symptomatic reduction in LVEF <50%, or a reduction in LVEF >10% to a LVEF <55% [†] .	Interrupt and review risk/benefit*	Cardio-oncology review. Start ACEI and/or BB and up-titrate to 100% target dose for HF as tolerated [‡] .

ACEI, angiotensin-converting enzyme inhibitor; BB, beta-blocker; BNP, brain natriuretic peptide; GLS, global longitudinal strain; HF, heart failure; HFpEF, heart failure with preserved ejection fraction; LVEF, left ventricular ejection fraction; LVSD, left ventricular systolic dysfunction.
[†]Continuing cardiotoxic cancer therapy may be suitable in selected cases depending on the risk/benefit ratio, severity of left ventricular impairment, symptoms, cancer stage and response.
[‡]If LVEF fall is to >50%, then incorporate either biomarker elevation or GLS reduction (<–18% if normal at baseline, or <15% relative reduction of GLS if reduced at baseline).¹¹
[§]If ACEI or BB are not tolerated, or the patient is already taking these agents when cardiotoxicity is diagnosed, consider adding aldosterone antagonist.
[¶]If LVEF <35% follow the European Society of Cardiology HF guidelines regarding eligibility for cardiac resynchronisation therapy, sacubitril/valsartan and ivabradine.

Figure 7 : Stratégies de prise en charge selon la classe de toxicité myocardique du Royal Brompton Hospital

La pertinence de ces classifications est donc aujourd'hui remise en question car les phénomènes toxiques sont continus, commençant au niveau des cellules myocardiques et évoluant progressivement vers une altération fonctionnelle (40) puis une insuffisance cardiaque manifeste (41). Les atteintes cardiaques par la chimiothérapie sont donc aujourd'hui définies comme dose-dépendantes, cumulatives et progressives.

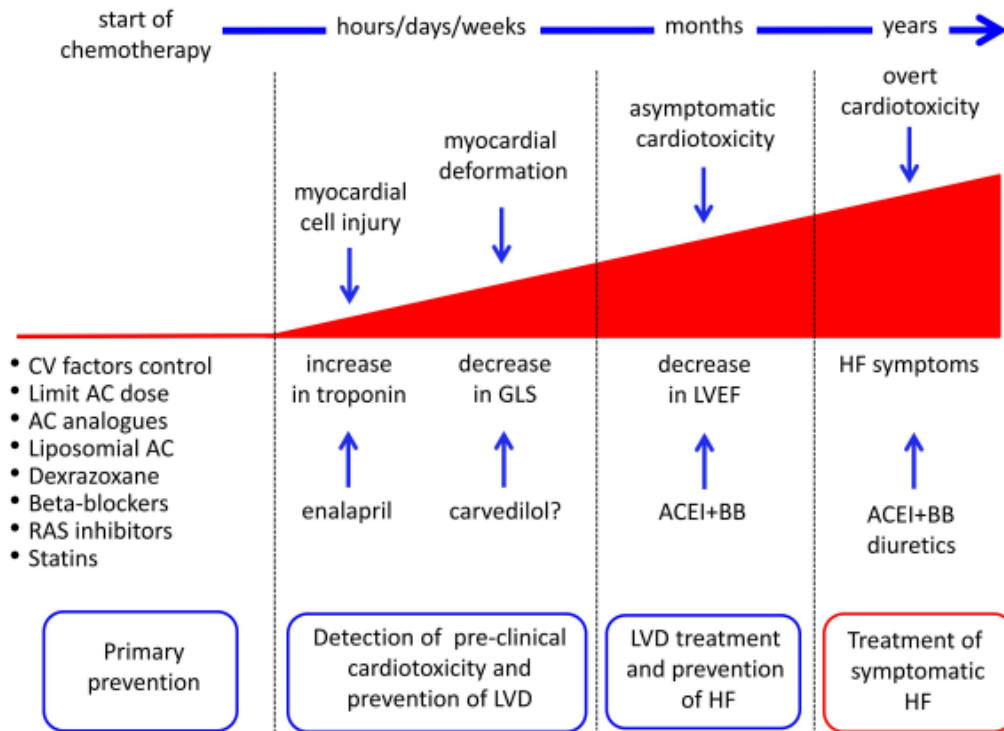


FIGURE 2 | Possible strategies for cancer drug-induced cardiotoxicity detection, prevention, and treatment. AC, anthracyclines; ACEI, angiotensin-converting enzyme inhibitors; BB, beta-blockers; CV, cardiovascular; GLS, global longitudinal strain; HF, heart failure; LVD, left ventricular dysfunction; RAS, renin-angiotensin system.

Figure 8 : Stratégies de prévention et de traitement en fonction de la progression des altérations fonctionnelles cardiaques

Plus la toxicité cardiaque sera détectée tôt, plus le pronostic sera bon ; inversement les patients identifiés tard seront plus difficiles à traiter (42). Le cœur en développement est également particulièrement vulnérable et les patients pédiatriques traités par anthracyclines présentent un risque extrêmement élevé de cardiotoxicité (43,44). L'utilisation de biomarqueurs plasmatiques comme l'élévation de la troponine plasmatique ou des facteurs natriurétiques (45), en combinaison avec une imagerie cardiaque sensible (37), semble être le meilleur moyen de dépister précocement dégradation (Figure 8) (41).

En effet, les biomarqueurs sont des protéines circulantes dont la quantification reflète la dynamique de la pathophysiologie cardiovasculaire (45): le peptide natriurétique B, marqueur de l'insuffisance cardiaque décompensée, peut avoir un rôle dans la surveillance au long cours (46) et la troponine I cardiaque, un indicateur de lésion musculaire, s'est avérée prometteuse pour l'évaluation des risques cardiovasculaires et l'identification des patients devant bénéficier de stratégies de prévention (47).

Les recommandations actuelles sont donc à un suivi cardiaque régulier des patients en consultation clinique d'oncologie (7) via :

- L'analyse de l'ECG ;
- La mesure de la glycémie, du profil lipidique, et le calcul du taux de filtration glomérulaire ;
- La mesure des biomarqueurs plasmatiques (peptides natriurétiques et troponine I cardiaque) ;
- Les mesures de la fraction d'éjection ventriculaire gauche (idéalement en 3 dimensions mais au moins en 2 dimensions par la méthode du biplan de Simpson) et du SLG par échocardiographie ou imagerie par résonance magnétique cardiaque si la qualité de l'échographie n'est pas optimale (cette partie sera détaillée plus loin).

VII. Dysfonction ventriculaire gauche et modalités d'imagerie

A la suite des lésions cardiomyocytaires décrites précédemment, le cœur met en action une série de modifications moléculaires, cellulaires et tissulaires architecturales regroupées sous le terme de remodelage. Si ces processus adaptatifs sont initialement compensatoires, leur développement excessif conduit à terme à un dysfonctionnement.

1) Remodelage cardiaque physiologique

Le volume d'éjection ventriculaire est déterminé par 3 facteurs : La pré-charge est reflétée par la pression télédiastolique ventriculaire ; la contractilité (inotropisme), dépendante des propriétés intrinsèques de la fibre myocardique et la post-charge qui représente la résistance à l'éjection et est représentée par les résistances vasculaires (périphériques ou pulmonaires). Lorsque la capacité d'éjection est altérée, il s'en suit en amont une augmentation des pressions de remplissage et en aval, une baisse de débit avec hypoperfusion des organes. Des mécanismes d'adaptation se mettent alors en place, dictés par le système nerveux sympathique, le système rénine-angiotensine ou le système arginine-

vasopressine. Au niveau cardiaque, ils induisent une dilatation du ventricule (Loi de Starling), une hypertrophie musculaire (Loi de Laplace) et une tachycardie toutes destinées à augmenter le débit cardiaque. Au niveau périphérique, une vasoconstriction et une rétention hydrosodée participent aussi à cette adaptation destinée à augmenter le débit cardiaque.

En conditions physiologiques, l'hypertrophie cardiaque en réponse à la croissance, à l'exercice ou à la grossesse est associée au maintien d'une fonction cardiaque normale et est décrite comme une hypertrophie physiologique. Ce processus d'adaptation bénéfique, finement réglé, se traduit par une diminution du stress de la paroi ventriculaire appelée contrainte pariétale, l'augmentation de la fonction pompe et l'amélioration de la vascularisation. Au niveau moléculaire, le remodelage cardiaque est déclenché par des médiateurs endocrines ou des mécanosenseurs, et est associé à des voies de signalisation bien caractérisées impliquant le facteur de croissance endothéliale vasculaire B (VEGF-B), l'insuline, l'hormone de croissance (GH), le facteur de croissance analogue à l'insuline 1 (IGF1) et l'hormone thyroïdienne triiodothyronine (T3). Ces stimuli conduisent à l'adaptation du programme génétique et de la synthèse protéique qui contrôlent la contractilité des cardiomyocytes, le remodelage des sarcomères, la production d'énergie, le remodelage électrique et l'angiogenèse (48). Les cascades de signalisations décrites comprennent les voies des kinases 3 phosphoinositide (PI3K/AKT), la voie de rapamycine (mTOR), les kinases régulées par des signaux extracellulaires (ERK1/2) et les kinases activées par l'adénosine monophosphate (AMPK).

Pendant la grossesse par exemple, le cœur grossit pour compenser l'augmentation du débit cardiaque et la surcharge volumique induit un élargissement du ventricule et une modification proportionnelle de l'épaisseur de la paroi. Cette hypertrophie est réversible avec une fonction cardiaque normale sans aucun changement d'expression de marqueurs connus d'hypertrophie pathologique tels que le peptide natriurétique auriculaire (NPPA), le peptide natriurétique de type B (BNP), la chaîne lourde de myosine β (β -MHC) et la pompe Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarcoendoplasmique (SERCA2 α) (49). Ce remodelage physiologique dans le cadre de la grossesse est principalement contrôlé hormonalement.

2) Remodelage cardiaque pathologique

Dans les maladies par surcharge de pression, telles que la sténose aortique ou l'hypertension, le cœur développe une hypertrophie concentrique (Figure 9) avec des cardiomyocytes qui augmentent généralement en épaisseur plus qu'en longueur et l'addition des myofibrilles en parallèle, ce qui réduit le stress de la paroi ventriculaire et augmente l'épaisseur de la paroi libre et du septum (50).

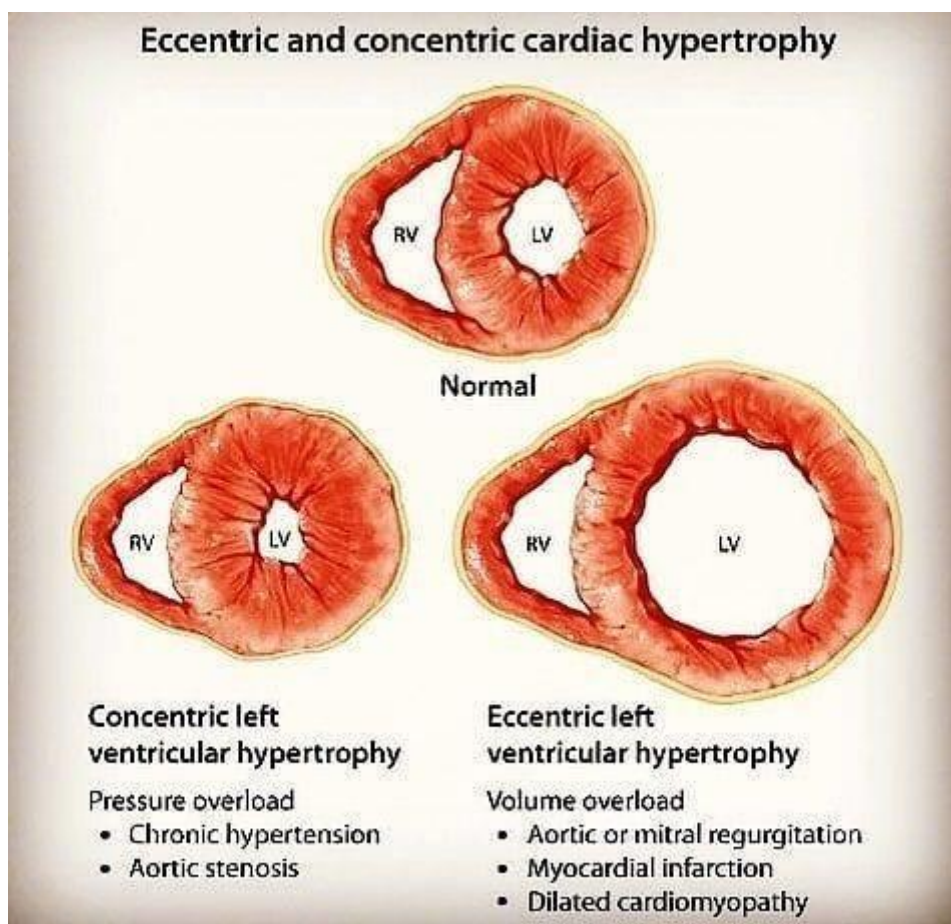


Figure 9 : Représentation schématique des remodelages ventriculaires concentrique ou excentrique

Les maladies de surcharge volémique telles que les séquelles d'un infarctus du myocarde ou la cardiomyopathie dilatée sont dues à des atteintes de la contractilité segmentaire et globale, respectivement. La diminution du nombre des cardiomyocytes et leur réarrangement répond à une charge de travail augmentée menant à l'hypertrophie excentrique (Figure 9) (51): un allongement préférentiel des cardiomyocytes induit l'ajout en série de sarcomères pour s'adapter aux volumes ventriculaires plus importants et à la dilatation ventriculaire subséquente (48). Bien que ces réponses se développent initialement comme une adaptation pour réduire la contrainte

pariétale et la consommation d'oxygène, elles entraînent une altération de la transcription des gènes ainsi que de nombreuses modifications structurales et fonctionnelles :

- Les cardiomyocytes s'hypertrophient,
- La matrice extracellulaire se modifie via une activation et une prolifération des fibroblastes et une synthèse excessive de collagène. La paroi devient donc rigide, entraînant une altération de la contractilité des cardiomyocytes, très sensibles au degré d'élasticité de leur substrat (52) et le couplage mécanique entre les cardiomyocytes est altéré, ce qui provoque des anomalies de la conduction,
- L'apoptose et l'autophagie s'accélèrent,
- Les performances musculaires sont diminuées par réintroduction du phénotype fœtal et notamment des chaînes lourdes de myosine β dont les fonctions ATPasiques sont plus lentes,
- La disruption du cycle du calcium modifie le couplage excitation-contraction,
- La stimulation β -adrénergique, responsable de l'adaptation à l'effort, est également altérée.

Le remodelage cardiaque pathologique est donc initialement induit pour réduire la contrainte pariétale et préserver temporairement la fonction de la pompe cardiaque. A long terme, il évolue pourtant vers une spirale dévastatrice d'altérations inadaptées qui aboutissent à la dysfonction ventriculaire gauche et à l'incapacité du cœur à assurer un débit suffisant pour répondre aux besoins des différents organes en oxygène

Lorsque ces dégradations sont associées à des signes cliniques, on parle d'insuffisance cardiaque (IC).

3) Symptômes d'insuffisance cardiaque

L'association cardiaque de New York (NYHA) a proposé une classification pour évaluer la gravité des symptômes de l'IC en fonction du degré de limitation de l'activité physique.

<u>Classe</u>	<u>Symptômes</u>
I	Aucune limitation de l'activité physique. L'activité physique ordinaire ne cause pas de fatigue, de palpitations, de dyspnée.
II	Légère limitation de l'activité physique. À l'aise au repos. L'activité physique ordinaire entraîne fatigue, palpitations, dyspnée.
III	Limitation prononcée de l'activité physique. À l'aise au repos. Une activité plus faible que d'ordinaire cause fatigue, palpitations ou dyspnée.
IV	Activité physique impossible sans inconfort. Symptômes de l'insuffisance cardiaque au repos. Toute activité physique augmente l'inconfort.

Tableau 1 : Classification de l'insuffisance cardiaque selon la NYHA

Le diagnostic d'IC est donc évoqué lorsqu'il est observé :

- Des symptômes évocateurs : essoufflement au repos ou à l'effort, orthopnée (difficulté à dormir à plat), toux nocturne, fatigue, difficulté à réaliser les activités quotidiennes,
- Des symptômes non spécifiques chez la personne très âgée : asthénie (fatigue), confusion, troubles du comportement, désorientation, troubles du sommeil, chutes, perte d'autonomie, prise de poids rapide,
- Des signes évocateurs d'IC : tachycardie, 3e bruit cardiaque, polypnée (augmentation de la fréquence respiratoire), râles crépitants pulmonaires, turgescence jugulaire, œdèmes périphériques (dus à la rétention hydrosodée), hépatomégalie,

- Des signes constatés à la radiographie thoracique (cardiomégalie, épanchement pleural).

Selon le bilan publié en 2021 par l'ESC, dans les pays développés, l'incidence de l'IC ajustée sur l'âge est en baisse, reflétant vraisemblablement une meilleure prise en charge des CVD, mais en raison du vieillissement, l'incidence globale augmente. Actuellement, l'incidence de l'IC en Europe est d'environ 5 / 1 000 années-personnes chez les adultes. La prévalence de l'IC semble donc représenter 12 % des adultes mais tous ne sont pas diagnostiqués (53). Cette prévalence augmente avec l'âge : d'environ 1 % chez les personnes âgées de moins de 55 ans à plus de 10 % chez les personnes de 70 ans ou plus. Selon l'ESC, parmi les personnes atteintes d'IC vues en ambulatoire, 60% ont une fraction d'éjection réduite, 24% moyennement réduite et 16% ont une fraction d'éjection préservée (53).

4) Modalités d'imagerie

Pour évaluer la fonction cardiaque ventriculaire gauche, l'échocardiographie et l'imagerie par résonance magnétique (IRM) sont les deux techniques qui prévalent. L'échographie est une technique non invasive d'exploration morphologique et dynamique du cœur par les ultrasons. La sonde dont les cristaux sont des matériaux piézoélectriques émet une onde acoustique qui est transformée en électricité. La sonde reçoit ensuite l'écho des tissus, qu'elle traduit en impulsions électriques. L'image, en nuances de gris, indique les différents niveaux de réflexion de l'onde par les différents tissus : les tissus durs en blanc, les tissus mous en gris et les liquides en noir. Il existe plusieurs techniques d'enregistrement : le mode TM (temps-mouvement) permet l'étude des mouvements, des dimensions des cavités cardiaques et de l'épaisseur des parois ; le mode BD (bidimensionnel) analyse en temps réel les structures cardiaques en deux dimensions en fournissant une coupe anatomique du cœur dans un plan donné ; le doppler de flux mesure les vitesses des flux sanguins à travers les valves, permet l'étude des fonctions systolique et diastolique des deux ventricules, la quantification des valvulopathies, la mesure du débit cardiaque, la mesure des pressions artérielles pulmonaires et la détection de shunts

intracardiaques ; le doppler tissulaire complète ces informations par l'étude des vitesses pariétales (vitesse de mouvement des parois) intramyocardiques reflétant le travail mécanique du cœur.

L'IRM est aussi une imagerie non ionisante qui met en interaction une onde de radiofréquence, c'est-à-dire un champ magnétique oscillant à une fréquence donnée, avec les noyaux en précession du corps excité par ce champ. Lors de la phase de relaxation, alors que les spins électroniques reviennent à leur état d'équilibre, les informations sont enregistrées. Des bobines de gradients apportent une variation au champ magnétique précédemment induit et permettent d'obtenir un codage spatial tridimensionnel (en coupe, vertical puis horizontal). Cette combinaison de gradients et d'ondes de radiofréquence organisée de manière précise est appelée séquence. Une fois la séquence réalisée, le signal est stocké dans un plan de Fourier (image intermédiaire) puis traité mathématiquement via une transformée de Fourier afin d'obtenir une image.

Les séquences les plus souvent utilisées sont les séquences en écho de gradient balancé dite SSFP (steady state free precession) pour l'imagerie en mode ciné-IRM ; l'imagerie morphologique en sang noir pondérée T1 pour l'étude de la graisse intramyocardique ou T2 pour celle de l'œdème intramyocardique ; l'imagerie dynamique de perfusion myocardique permet de suivre le bolus d'un agent de contraste (le gadolinium, notamment) de manière rapide au cours du temps et d'analyser sa distribution intramyocardique à la recherche d'obstructions ; l'imagerie de rehaussement tardif réalisée 10 minutes après injection de gadolinium permet de mettre en évidence la nécrose ou la fibrose intramyocardique ; l'imagerie en contraste de phase, sensible aux mouvements, permet de quantifier les flux ; et enfin l'angiographie aortique tridimensionnelle de l'aorte thoracique apporte des informations hémodynamiques mais aussi volumiques tridimensionnelles de la lumière, la paroi et l'environnement de l'aorte.

5) Manifestations cliniques

La prise de décision concernant la poursuite ou l'interruption d'une thérapie anti-cancéreuse potentiellement vitale ne peut pas reposer uniquement sur le seul paramètre échocardiographique de la fraction d'éjection qui ne suffit pas pour détecter une dysfonction myocardique. D'autre part, cette mesure est limitée par une variabilité inter-opérateurs et est dépendante de la charge hémodynamique. La méthode 2D de Simpson (qui consiste à acquérir des images en coupes transversales à différents niveaux le long de l'axe apico-basal) est elle aussi limitée par cette variabilité intra- et inter-opérateurs évaluée à environ 10%. L'échographie 3D semble sujette à moins de variations (54) et est de plus en plus acceptée en routine ; cependant il y a de nombreux cas où l'échographie transthoracique n'est simplement pas possible ou reste difficile d'interprétation, notamment en cas d'obésité morbide, après chirurgie du sein gauche ou du thorax gauche, pose de prothèse ou radiothérapie. Si 88 % des patients sont analysables au début de leur suivi, seulement 66% le seront au cours de leur suivi après traitement par les anthracyclines. Bien que plus coûteuse et moins facilement disponible, l'IRM, dont le coefficient de variation est plus faible, aux alentours de 4% (55), devient alors la méthode de choix.

Aujourd'hui, de nombreuses études ont reporté que la réduction du strain et notamment du SLG n'est pas un indicateur inférieur et est même plus fiable que la fraction d'éjection en termes de reproductibilité, sensibilité et prédictibilité d'une future dégradation de la FEVG et d'une cardiotoxicité significative (56–58). Un essai récent, l'essai SUCCOUR, a étudié 307 patients en cours de traitement anti-cancéreux et a montré que bien que la FE dans les deux groupes ne soit pas différente, lorsque la thérapie cardioprotectrice a été guidée par l'évolution du strain, ces patients avaient à un an de suivi une moindre réduction de la FEVG qui ne passait pas sous le seuil fixé pour les valeurs anormales (59).

Même s'il requiert encore des validations par des études de plus larges échantillons, le strain circonférentiel peut aussi servir de marqueur additionnel de la dysfonction myocardique (60–62).

La connaissance de la structure anatomique et de la mécanique du myocarde ventriculaire gauche est essentielle pour comprendre la pratique du strain en clinique. Dans le myocarde, les fibres sont orientées selon une hélice droite dans le sous-endocarde et une hélice gauche dans le sous-épicaire, avec les fibres circonférentielles entre les deux (Figure10).

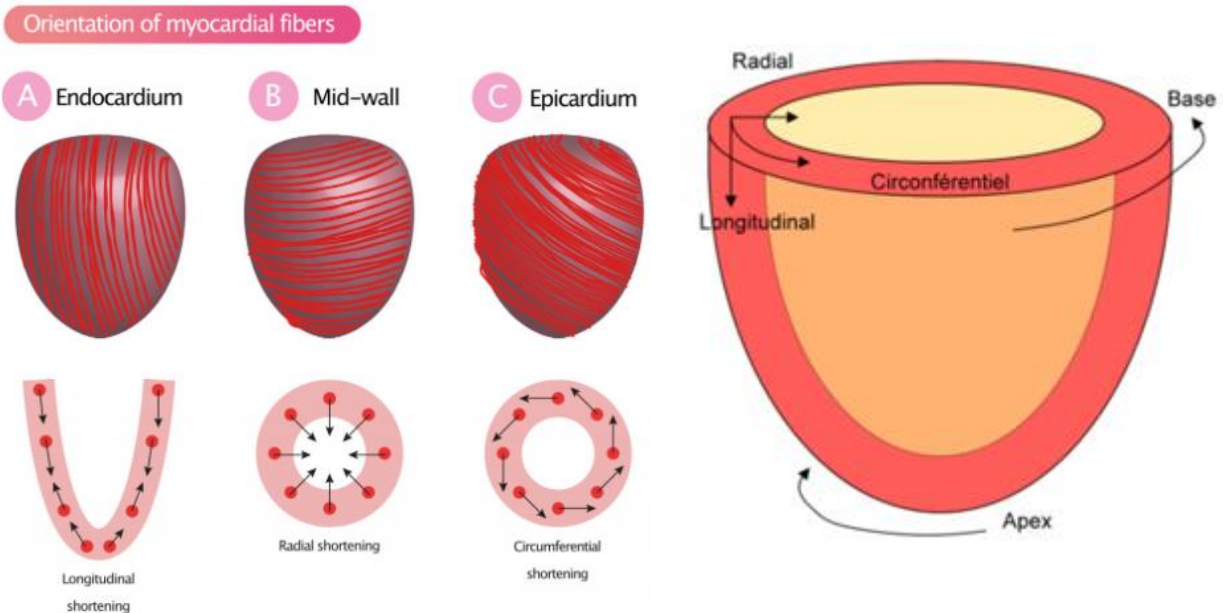


Figure 10 : Organisation des fibres myocardiques et mouvements cardiaques (de ecgwave.com)

Ces structures anatomiques permettent la mise en place de modèles de déformations mécaniques : lors de la systole, le ventricule gauche se raccourcit dans les dimensions longitudinale et circonférentielle et se tord selon son long axe alors que la paroi s'épaissit radialement.

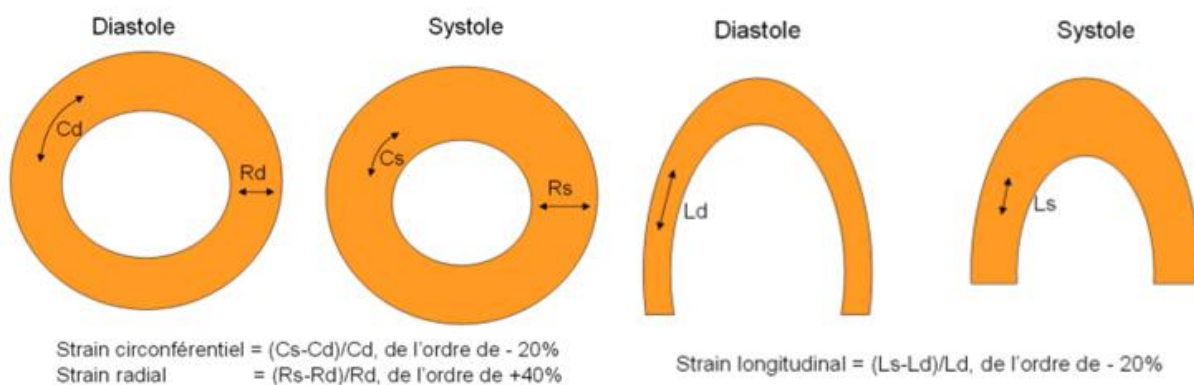


Figure 11 : Déformations myocardiques mesurées par les indices de déformabilité appelés strain (de irmcardiaque.com)

Le strain est donc la mesure de ces déformations de segments par rapport à leurs dimensions d'origine. De cette manière, plus le cœur est capable de se déformer pour se contracter, plus les valeurs de strain longitudinal et circonférentiel seront négatives, à l'opposé, plus les valeurs de strain radial seront positives (Figure 11). Le strain peut aussi être exprimé en terme de strain rate qui correspond à la vitesse à laquelle le myocarde se déforme. La mécanique des torsions cardiaques étant régie par des mouvements séquentiels connus, il est aussi possible d'évaluer l'ampleur des rotations, twists et torsions cardiaques. Les paramètres de déformation du strain s'expriment le plus couramment en deux dimensions sur différentes vues du ventricule gauche et à différents temps, mais ils peuvent aussi se faire en 3 dimensions en combinant les strains longitudinaux et circonférentiels, donnant alors une valeur d'aire de déformation. La validité de ces mesures a été faite par sonomicrométrie (mesure invasive du temps de transit d'un signal ultrasonique entre deux quartz piézoélectriques) avec de très bons coefficients de corrélation pour les strains longitudinal et circonférentiel mais pauvre pour le radial, raison pour laquelle cette mesure est moins fiable. De plus, une segmentation du cœur peut être faite afin de déterminer les variations locorégionales de ces déformations entre les segments endocardique et épicaudique longitudinaux mais aussi le long de l'axe apico-basal pour le strain circonférentiel (en 3 régions : apical, mi-ventriculaire, basal).

Les évènements cardiaques étant à 98% détectables au cours de la première année (32), les recommandations sont une personnalisation de la surveillance par imagerie (FEVG et strain) à la fois en fonction du traitement mais aussi des risques liés au patient avec une évaluation avant traitement puis une adaptation du suivi en fonction des scores jusqu'à un an après la fin de la chimiothérapie (Figure 8) (37). Les manifestations précliniques guidant la mise en route d'un traitement cardioprotecteur sont donc l'élévation des biomarqueurs plasmatiques (comme détaillé précédemment) ainsi qu'une réduction de la masse et de la fonction ventriculaire gauche (40).

VIII. Modèles animaux

1) Modèles

Les modèles de petits animaux, y compris les souris, les rats et les cobayes, améliorent notre compréhension des différents aspects et étiologies des maladies cardiovasculaires et aident à développer de nouvelles stratégies de traitement. Les souris et les rats sont les modèles animaux les plus couramment utilisés et partagent un degré élevé d'homologie avec le génome humain, avec 30 000 gènes codant pour des protéines chacun. Les principaux avantages des modèles de rongeurs sont des cycles de reproduction relativement courts et de faibles coûts d'hébergement. Ces modèles utilisent généralement des modifications génétiques, des approches pharmacologiques et chirurgicales, ou plusieurs combinées (Figure 12) (63).

La pathogenèse des CVD est multifactorielle, il est donc souvent impossible de discerner les mécanismes sous-jacents, qui peuvent se chevaucher et s'interconnecter. Cela constitue un défi pour étudier les facteurs de risque coexistants du développement des CVD dans un seul organisme modèle. Cependant, les petits modèles animaux permettent l'étude de risques spécifiques sans l'effet confondant des comorbidités.

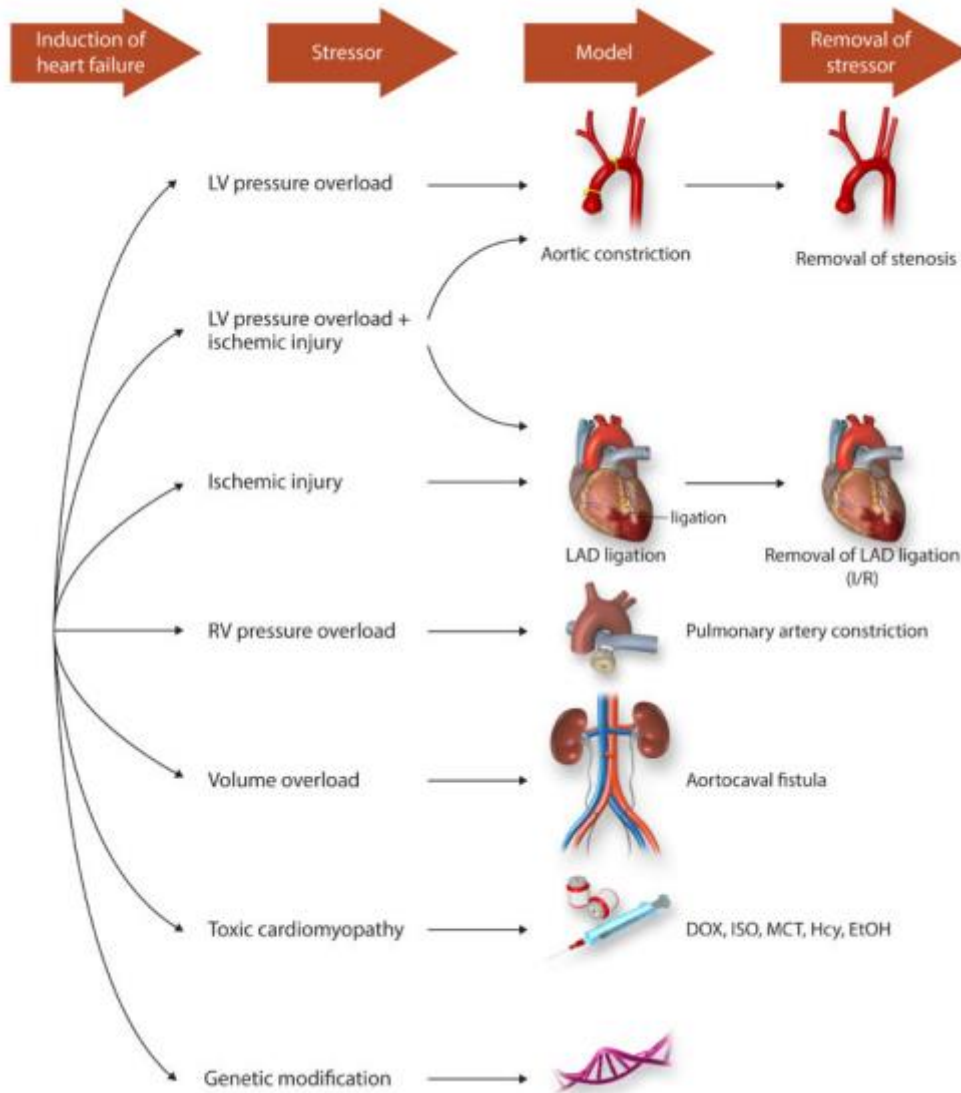


Figure 12 : Schéma représentant les facteurs de stress sélectionnés pour induire une dysfonction ventriculaire gauche des modèles de petits animaux

2) Pertinence

Les progrès récents de l'IRM et de l'échographie trans-thoracique à haute résolution permettent une évaluation détaillée de la fonction contractile, même chez les petits rongeurs. Les modèles de souris transgéniques facilitent également l'étude de modifications génétiques spécifiques dans le contexte de facteurs de stress superposés, par exemple à l'aide d'un modèle chirurgical ou d'un traitement diététique.

Cependant, certaines limitations sont intrinsèques à l'utilisation des petits modèles animaux :

- Les rongeurs qui partagent entre eux le même patrimoine génétique, ne reflètent pas l'hétérogénéité génétique des populations de patients.
- Les modèles chirurgicaux induisent un stress rapide, ce qui est contraire à la progression généralement lente de la maladie chez les patients.
- Bien que le statut énergétique myocardique et la contraction soient globalement relativement similaires entre petits rongeurs et humains, il existe plusieurs différences entre les cœur murin et humain : d'abord, la fréquence cardiaque qui est en général inversement corrélée à la taille de l'espèce, avec environ 500 à 600 battements par minute (b.p.m.) chez la souris, 350 b.p.m. chez le rat et 60–80 b.p.m. chez l'homme ; les myocytes ventriculaires humains expriment principalement la chaîne lourde de la myosine β (MHC). Les cardiomyocytes murins adultes expriment principalement l' α -MHC avec une activité ATPase rapide, ce qui facilite leur tachycardie ; les potentiels d'action des cardiomyocytes murins présentent une phase de repolarisation rapide, manquent d'une phase de plateau et ont une durée totale plus courte que chez l'homme. Cela facilite une contraction/relaxation plus rapide par rapport aux grands mammifères, laquelle est nécessaire pour maintenir le débit cardiaque à des fréquences cardiaques élevées.
- Sur la base de ces cinétiques contractiles, la capacité d'augmenter la fréquence cardiaque chez les petits animaux modèles est altérée par rapport aux humains.
- Chez l'homme, la dysfonction ventriculaire est généralement observée chez les patients âgés qui cumulent des facteurs de risque, alors que dans la plupart des modèles de rongeurs, elle est généralement induite à un jeune âge pour réduire les coûts expérimentaux.

En conséquence, les résultats des modèles de petits animaux doivent être interprétés avec prudence et validés chez le gros animal avant les essais de phase I chez l'homme.

Malgré les limites et les différences spécifiques décrites ci-dessus, les modèles de petits rongeurs sont des outils pour le moment incontournables pour mener rapidement des études de preuve de principe à grande échelle et tester différentes cibles médicamenteuses (63).

3) Reproductibilité

La condition sine qua non à l'avancée des recherches précliniques est la reproductibilité inter-études. Sur 1576 chercheurs interrogés, 52 % d'entre eux pensent que nous assistons à une crise significative de la reproductibilité des résultats scientifiques et 38 % à une crise légère (64). Des études récentes ont montré que 50% à 90 % des études publiées ne sont pas reproductibles (65). Basée sur les coûts de 2012, cette étude a estimé que 28 milliards de dollars US/an sont dépensés aux Etats-Unis pour une recherche qui ne peut pas être reproduite.

Les principales causes de cette non reproductibilité sont le manque de références des matériels utilisés, des analyses statistiques non appropriées ainsi qu'une description insuffisamment détaillée des protocoles.

L'absence d'évaluations faites en aveugle, la petite taille fréquente des effectifs et la non publication des résultats négatifs cloisonnant les recherches sont autant de limites fortes à la reproductibilité des résultats.

Pour ce qui est de l'expérimentation animale, aux facteurs déjà mentionnés s'ajoutent des variations inhérentes à l'expérimentateur (influence du sexe et du stress de l'expérimentateur sur l'angoisse de l'animal) et aux conditions d'expériences dont parfois nous n'avons pas connaissance (cycle circadien, modalités d'hébergement) qui ajoutent des biais incontrôlables. Cette non reproductibilité est contraire aux règles des 3R et presse les chercheurs à standardiser leurs protocoles expérimentaux et à les décrire avec précision, parfois en donnant au lecteur l'accès aux données brutes plus qu'à leur interprétation.

IX. Potentiels traitements cardioprotecteurs

1) Réduction des doses et systèmes de délivrance

Puisque les toxicités sont cumulatives et dose-dépendantes, la première recommandation est la limitation des doses de chimiothérapie surtout si le schéma thérapeutique comprend d'autres anti-cancéreux (7).

Les recherches actuelles se concentrent aussi sur l'amélioration de l'index thérapeutique des anthracyclines (défini par le rapport entre la dose maximale tolérée avant toxicité et la dose minimale efficace) via leur encapsulation dans des liposomes (66) ou une modification chimique par pegylation (des résidus méthoxypolyéthylène glycol sont liés à leur surface) (67) car ces agents pénètrent préférentiellement dans la microvascularisation perméable des tumeurs mais ont une extravasation limitée dans les cardiomyocytes.

2) Médicaments contre l'insuffisance cardiaque

Bien qu'ils n'aient pas été spécifiquement développés pour les cardiopathies aux anthracyclines, les médicaments de l'insuffisance cardiaque (inhibiteurs de l'enzyme de conversion- IECA, bloqueurs du récepteur à l'angiotensine-BRA, β -bloquants) sont aussi administrés aux patients de cardio-oncologie. Les IECA et BRA provoquent une vasodilatation qui diminue les résistances périphériques totales et donc la pression artérielle moyenne. Le retour veineux s'en trouve abaissé ce qui allège la charge du travail cardiaque et donc la demande en oxygène et minimise ainsi les dommages cardiaques. Les β -bloquants sont des antagonistes compétitifs des catécholamines sur les récepteurs β -adrénergiques cardiaques : ils ont des effets chronotropes et inotropes négatifs. Le travail cardiaque est ainsi diminué ainsi que les altérations fonctionnelles.

Même si des études sur des modèles animaux ont montré des résultats encourageants, la protection apportée par ces molécules aux patients reste encore controversée dans le cadre des anomalies chimio-induites (68–70).

3) Statines

Les statines sont des médicaments anti-inflammatoires et antioxydants qui présentent des propriétés bénéfiques pléiotropes, probablement par

inhibition indirecte de petites GTPases homologues de Ras (Rho). Il a été démontré que la Rho GTPase Rac1 est un facteur majeur de la régulation de la NADPH oxydase ainsi que de la topoisomérase de type II, deux protéines qui jouent un rôle essentiel dans les mécanismes cardiotoxiques des anthracyclines discutés plus haut. Des études prospectives randomisées sont nécessaires pour comprendre si les statines seules ou prescrites de façon concomitante avec d'autres médicaments cardio-protecteurs (notamment les β -bloquants et les IECA) sont réellement efficaces.

4) Modulateurs de mitochondries

Au cours de ces dernières années, un large éventail de stratégies de protection contre le dysfonctionnement mitochondrial a été proposé (revues dans Wu et al (23)). Afin de palier à la dépression énergétique ou à la production de ROS, nombre de petites molécules, antioxydants, microARN (miR) mimétiques et antagomirs ont été testés dans des modèles cellulaires et animaux. Ces recherches restent précliniques pour le moment mais leurs résultats encourageants laissent espérer que certaines de ces molécules pourront bientôt être testés cliniquement. A ce jour, un seul composé a montré une efficacité suffisante dans les essais cliniques pour être approuvé pour une utilisation chez les patients cancéreux, le dexrazoxane. Cette molécule se lie à l'enzyme Top IIb et produit un changement de configuration qui empêche la liaison de l'antracycline à l'ADN. De plus, c'est un chélateur d'ions métalliques qui empêche le complexe nocif Fe^{3+} /antracycline de former des radicaux réactifs par oxydo-réduction et réduit ainsi fortement la cardiotoxicité.

Une mise en garde a cependant été exprimée car ce médicament a soulevé des inquiétudes concernant une myélotoxicité limitant la dose et un risque potentiel accru de favoriser d'autres tumeurs malignes primaires (71).

X. Thérapie cellulaire

Au vu du bénéfice variable des traitements actuels sur la prévention de la dégradation de la fonction cardiaque, les experts des centres cardio-oncologiques actuels reconnaissent que de nouvelles options

thérapeutiques sont urgemment attendues. La thérapie cellulaire émerge comme l'une d'entre elles.

1) Cellules souches

Le terme cellule souche vient du terme « stammzellen » décrit pour la première fois dans les années 1890 par des chercheurs étudiant les potentiels de régénération des vers Planaires capables de reconstituer un individu entier à partir de morceaux de vers coupés (72). Presque un siècle plus tard, l'expérience pionnière réalisée par James Till et Ernest McCulloch a montré que des cellules de moelle osseuse injectées dans des souris irradiées de façon létale pouvaient former des nodules qui avaient une origine clonale par rapport aux cellules injectées, contenaient des cellules de divers types hématopoïétiques et étaient capables de se diviser (73). Ces cellules sont désormais connues sous le nom de cellules souches hématopoïétiques.

Le terme souche ne peut être attribué qu'à une cellule capable à la fois d'auto-renouvellement (capacité qu'a une cellule mère à se diviser pour donner naissance à deux cellules filles) et de différenciation (capacité qu'a une cellule immature d'acquérir des caractéristiques morphologiques, moléculaires et fonctionnelles d'un lignage cellulaire particulier) (Figure 13a) (74). Ces deux conditions peuvent être satisfaites de deux manières : soit par division asymétrique où une cellule mère donne naissance à une cellule identique et une cellule commise vers un lignage spécifique (mécanisme du lignage) (Figure 13b) soit par division symétrique (Figure 13c) qui aboutit à deux cellules filles identiques pendant qu'une autre cellule souche donnera naissance à deux cellules filles commises vers un lignage spécifique (mécanisme de la population – Figure 13d) (75).

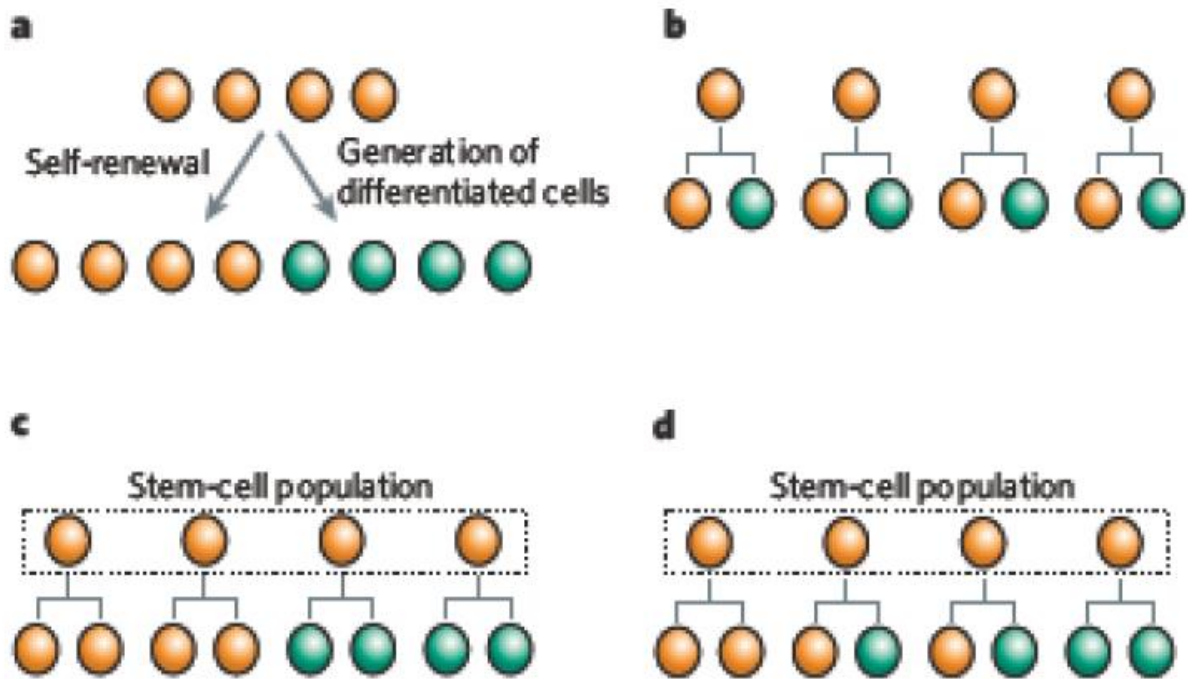


Figure 13 : Stratégies de cellules souches possibles qui maintiennent un équilibre des cellules souches et descendance différenciée.

a, auto-renouvellement (orange) et différenciation (vert) ; b, division asymétrique ; c, division symétrique d, combinaison de divisions cellulaires : chaque cellule souche peut se diviser symétriquement ou asymétriquement

Influencée par leur niche, ces deux mécanismes sont utilisés par la population de cellules souches pour maintenir leur pool et répondre aux besoins environnants. Dans les mécanismes de la population, l'état souche est défini par le potentiel des cellules à générer à la fois des cellules souches et des cellules filles différenciées, plutôt que leur production réelle d'une cellule souche et d'une cellule différenciée à chaque division.

Les cellules souches doivent cependant être différenciées par leur origine et leurs potentialités : les cellules souches totipotentes (ovule fécondé et cellules résultant des deux-trois premières divisions) sont capables de donner naissance à l'embryon entier ainsi qu'aux annexes embryonnaires. Les cellules souches embryonnaires (CSE) dérivées de la masse cellulaire interne d'un embryon au stade blastocyste sont pluripotentes : elles peuvent donner naissance à toutes les cellules de l'embryon y compris à la lignée germinale. La pluripotence peut être aussi acquise par reprogrammation de cellules somatiques après l'expression ectopique de facteurs de reprogrammation connus sous le nom de facteurs de Takahashi

et Yamanaka (Sox2, Oct4, Klf, c-Myc) (76) qui donne naissance à des cellules souches dites pluripotentes induites (CSPi).

Les cellules souches de tissus adultes résident quant à elles dans de nombreux tissus. Elles sont rares et leur capacité d'auto-renouvellement dépend de celui de l'organe hôte (permanent pour le sang, la peau et les intestins ; discontinu et en fonction du développement ou du stress pour les organes tels que le muscle, le cerveau ou les os). On les qualifie de multi-, bi- ou unipotentes selon leur capacité à se différencier en plusieurs, deux ou un seul lignage cellulaire, respectivement.

In vivo, le maintien de la niche de cellules souches ainsi que les processus gouvernant la différenciation ne sont pas encore consensuels et la régénération qui s'y produit naturellement se fait soit par différenciation des cellules souches, soit par reprogrammation via des facteurs trophiques, ou encore via la plasticité cellulaire qui permet la trans-différenciation ou la dé-différenciation (77).

La thérapie cellulaire vise exploiter ces propriétés et à utiliser divers types de cellules souches en vue de la réparation des tissus lésés. Pour ce faire, l'utilisation de cellules souches issues de tissus adultes est limitée au vu de leur faible nombre dans certains organes et des difficultés à les amplifier *in vivo* ou *in vitro* ce qui n'est pas le cas pour les cellules souches pluripotentes (CSPs) dont la différenciation peut être obtenue *in vitro* par la reproduction des processus complexes qui la gouvernent au cours du développement embryonnaire (Figure 14-(78)) (facteurs de croissance, morphogènes, hormones, co-culture avec des composants de la matrice extracellulaire mais aussi paramètres physiques comme le niveau d'oxygène, la rigidité, la culture en 3 dimensions, l'exposition à des stimuli mécaniques ou électriques).

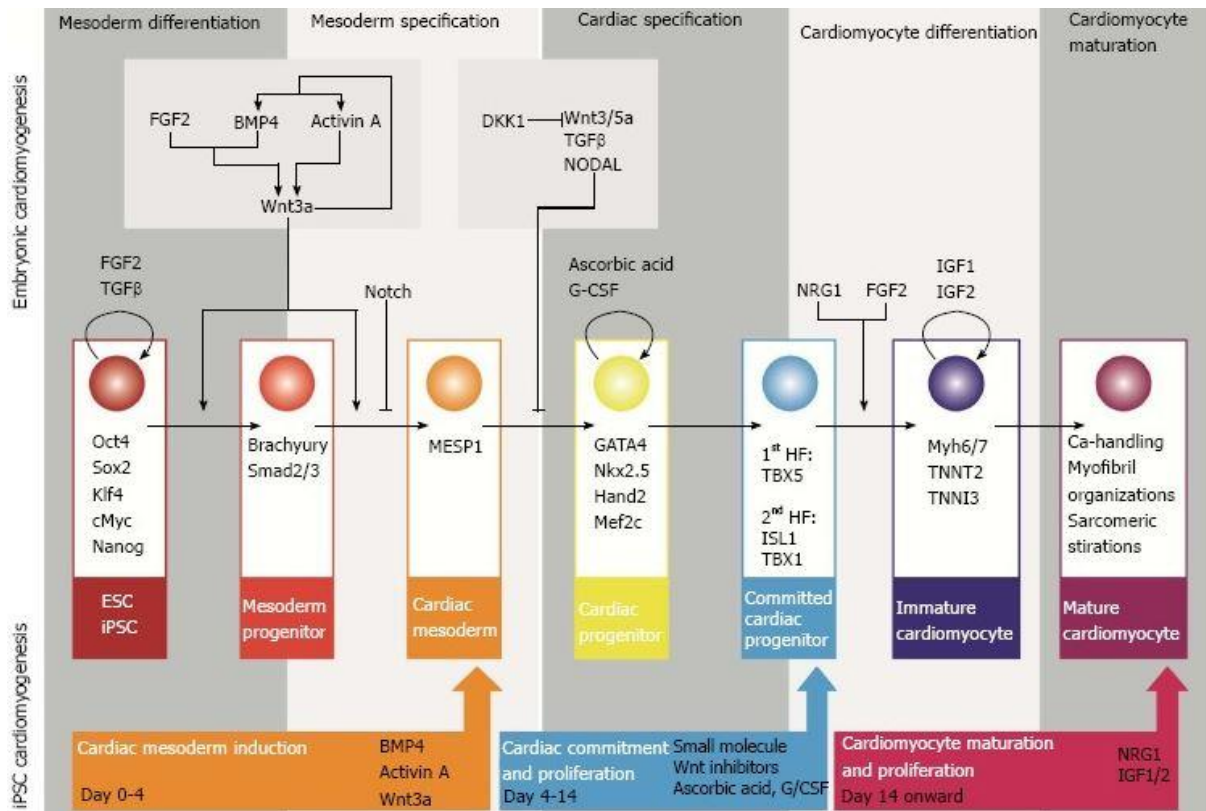


Figure 14 : Cardiogénèse *in vivo* et *in vitro*. Facteurs qui influencent la progression à travers les cinq étapes de la différenciation et de la maturation des cardiomyocytes : différenciation du mésoderme, spécification du mésoderme, spécification cardiaque, différenciation des cardiomyocytes et maturation des cardiomyocytes.

2) Thérapie cellulaire cardiaque à partir de cellules souches de tissus adultes

Depuis la fin des années 1990 la thérapie cellulaire des dysfonctions ventriculaires gauches a été l'objet de nombreuses études précliniques et cliniques. Son objectif initial était de générer un nouveau tissu myocardique fonctionnel par remplacement physique des cellules mortes mais le concept a aujourd'hui évolué et il semble acquis que le principal mode d'action des cellules est l'activation paracrine de mécanismes de réparation endogènes qui seront discutés plus loin.

Plusieurs phases se sont succédées, avec d'abord l'utilisation de cellules autologues non cardiaques comme les myoblastes, précurseurs myogéniques réactivés au cours des processus de réparation musculaire, mais dont la robuste capacité à s'implanter n'a pas suffi à améliorer la capacité d'éjection ventriculaire gauche des patients en ayant bénéficié (79). Des considérations pratiques (disponibilité et coûts faibles) ont ensuite justifié l'utilisation de cellules mononuclées de la moelle osseuse

bien que leur potentiel cardio-protecteur n'ait jamais été efficacement prouvé, sans doute à cause de la grande hétérogénéité des populations cellulaires qui la composent. Parmi elles, les cellules souches hématopoïétiques sélectionnées et purifiées n'ont pas été fonctionnellement plus efficaces (80). Une méta-analyse de 38 essais cliniques ayant testé des cellules médullaires a ensuite démontré que même si leur implantation ne posait pas de problème de sécurité, un impact sur la mortalité ne pouvait pas être statistiquement démontré (81).

Le seul type cellulaire non cardiaque ayant donné des résultats initialement encourageants est représenté par les cellules stromales mésenchymateuses (CSM). Dérivées le plus souvent de la moelle osseuse mais parfois aussi du cordon ombilical ou du tissu adipeux, les CSM ont des propriétés anti-fibrotiques, anti-inflammatoires et immunomodulatrices (82). L'essai (de phase 3) le plus récent, DREAM-HF, a testé l'injection trans-endocardique de cellules précurseurs mésenchymateuses chez des patients présentant une dysfonction ventriculaire gauche sévère, ischémique ou non. Un large échantillon a été étudié (565 patients) et bien que l'étude n'ait pas atteint son critère principal de jugement (décompensation récurrente de l'insuffisance cardiaque ou arythmies de haut grade), elle rapporte quelques signaux positifs (diminution des infarctus et des accidents vasculaires cérébraux non mortels) surtout chez les patients appartenant aux classes de symptômes NYHA modérées et présentant initialement un état inflammatoire reflété par une augmentation du taux sanguin de la protéine C réactive. Les effets protecteurs des CSM ont aussi été étudiés dans la cardiomyopathie post-DOX et bien que l'essai SENECA récemment achevé, qui comportait une seule injection endomyocardique par cathéter de CSM allogéniques n'ait pas atteint son objectif principal, il a aussi rapporté des signaux d'efficacité encourageants (83).

La deuxième génération de thérapie cellulaire a consisté en l'utilisation de cellules commises vers un lignage cardiaque, le rationnel de cette approche étant que l'amélioration de la fonction cardiaque serait plus efficacement obtenue par l'utilisation de cellules phénotypiquement proches de celles du tissu lésé (84). Dans ce cadre, il y a eu deux essais utilisant des cellules cardiaques issues de tissus adultes. SCIPIO a testé les injections intra-

coronaires de cellules *c-kit* positives cultivées à partir d'une biopsie peropératoire de l'oreillette droite. En dépit des premières affirmations enthousiastes des auteurs, les doutes entourant le protocole (petit échantillon de patients [16 versus 7 contrôles] et faible dose de cellules injectées) ont finalement conduit au discrédit de l'étude quand il a été révélé que Harvard Medical School procédait à la rétraction de 31 articles entachés de fraude et qui avaient globalement rationalisé l'utilisation de ces cellules, aujourd'hui largement reconnues incapables de donner naissance à des cardiomyocytes (85–87). L'essai ALLSTAR a testé des cellules dérivées de cardiosphères, agglomérats composés de plusieurs types cellulaires principalement des CSM, récoltés lors de biopsies endomyocardiques mais il a été interrompu pour futilité (88). Enfin, l'étude CHART-1 est un peu à part car elle a utilisé des cellules non pas issues véritablement d'un tissu cardiaque mais prélevées dans la moelle sanguine autologue puis traitées *ex vivo* pour exprimer des facteurs de transcription cardiaque (d'où leur nom de CSM « cardiopoïétiques »). Bien qu'une étude précédente de phase 1 ait montré des résultats encourageants, l'étude randomisée consécutive qui a inclus 157 patients a également manqué son critère principal de jugement (89). Partant de l'hypothèse que les CSM et les cellules *c-kit* positives cardiaques pourraient agir de façon synergique sur le remodelage cardiaque délétère, l'essai CONCERT-HF a été le premier à tester l'addition de ces deux types cellulaires dont des résultats positifs ont été démontrés sur la moindre occurrence d'évènements cardiaques et la qualité de vie plus que sur la fonction ou la structure ventriculaire gauches (90).

3) Thérapie cellulaire cardiaque à partir de cellules souches pluripotentes

Les avantages des CSPs sont nombreux : disponibilité, adaptabilité à des productions à large échelle grâce à leur taux de croissance élevé, possibilité de contrôle du stade de différenciation. Leur potentiel a été testé initialement dans un essai clinique de phase I (ESCORT) qui a utilisé des CSE différenciées en progéniteurs cardiovasculaires (porteurs du marqueur de lignage cardiaque *Islet 1* et dont la perte de pluripotence était attestée par leur expression de SSEA1). L'étude a permis d'écarter les craintes initiales concernant la sécurité de ce type cellulaire : aucune tumeur

cardiaque ou hors cible ni arythmies ni allo-immunisations significatives n'ont été mises en évidence (91). Ces résultats ont encouragé la mise en place d'autres essais utilisant des CSP différenciées d'origine embryonnaire ou dérivées de cellules adultes reprogrammées (CSPi) et au moins 3 sont actuellement recensés. D'autre part, des essais sur des primates non humains de transplantation de précurseurs ou de cardiomyocytes dérivés de CSP ont permis de confirmer l'intérêt thérapeutique de ces cellules (92,93) mais ont aussi clarifié les défis auxquels la thérapie cellulaire doit faire face quand son objectif premier reste la remuscularisation cardiaque:

a. Choix du type cellulaire

La réplication *in vitro* des voies de signalisation déterminant le destin cellulaire au cours de l'embryogenèse a permis la génération de cellules engagées dans un lignage précis, proche du tissu cible, mais pose également la question, à ce jour non résolue, du stade optimal de différenciation auquel les cellules doivent être transplantées. Les progéniteurs cardiaques (CPC) ont plusieurs avantages : ils tolèrent relativement mieux l'hypoxie (condition habituelle des zones dans lesquelles ils sont greffés) ; ils ont une plasticité leur permettant une plus grande flexibilité de différenciation à la fois cardiaque et vasculaire ; enfin, ils présentent un haut profil de sécrétion qui optimise leur signalisation paracrine (94). A l'inverse, les cardiomyocytes matures peuvent sans doute développer une plus grande force contractile mais sont associés expérimentalement à un risque élevé d'arythmies, vraisemblablement favorisées par un phénotype encore immature par rapport aux cardiomyocytes natifs, d'où un mauvais couplage électrique à l'interface du greffon avec le myocarde hôte (92). La recherche se concentre donc sur les moyens d'optimiser la différenciation des cellules avant de les greffer par des moyens physiques (stimulation électrique, contrainte mécanique), chimiques (hormones et petites molécules), génétiques ou des changements des conditions de culture (cultures tridimensionnelles, modulation de chimie/topographie/rigidité du substrat, co-cultures avec d'autres types de cellules).

b. Sécurité

Bien que cela soit moins pertinent lorsque la différenciation des CSP est poussée jusqu'à la phase terminale, une petite fraction résiduelle de ces dernières n'ayant pas répondu aux signaux instructifs de différenciation peut « contaminer » la population de cellules greffées et ainsi faire courir le risque du développement subséquent en tératomes jusqu'à subir une transformation maligne. Le risque tumorigène est possiblement majoré avec les CSPi si les cellules somatiques dont elles dérivent sont déjà porteuses de mutations auxquelles peuvent se surajouter les aberrations chromosomiques et épigénétiques induites par la reprogrammation (95). Un contrôle strict de la culture des CSP, une recherche des mutations cancérogènes et des méthodes de sélection stringentes (par tri cellulaire, ou gènes suicides inductibles) sont donc des prérequis absolus à toute utilisation clinique (96). Une fois la population « purifiée », celle-ci doit encore être testée pour son potentiel tumorigène à la fois *in vitro* et *in vivo* dans les modèles précliniques.

c. Source allogénique ou autologue

Pour de nombreuses raisons (facilité d'approvisionnement, possibilité de personnalisation du traitement, absence de problèmes éthiques et surtout de risque de rejet) les premières cellules testées étaient autologues. Aujourd'hui, l'utilisation de cellules allogéniques semble plus réaliste. En effet, la grande variabilité (en termes de fonction, prolifération, différenciation, dose) entre les patients, la complexité de la logistique et le coût d'une production individualisée sont autant de limitations à l'utilisation des cellules autologues. La possibilité d'une production de banques de cellules allogéniques standardisées, qualifiées et immédiatement disponibles ainsi que des essais cliniques comme POSEIDON (97) qui a montré l'équivalence fonctionnelle de cellules autologues et allogéniques, expliquent aujourd'hui leur utilisation préférentielle.

Le problème principal posé par les cellules allogéniques est naturellement celui de leur rejet et donc de la prise en charge d'une inévitable allo-immunisation. Pour atténuer le rejet, la recherche se concentre sur le raffinement des traitements immunosuppresseurs pharmacologiques,

l'induction d'une tolérance chez l'hôte ou la génération de cellules souches appariées à l'hôte sur les antigènes des leucocytes humains (HLA) (96). Toutefois, la prévention du rejet reste un défi majeur et les réponses qui y seront apportées conditionneront en bonne partie le succès et l'adoption clinique des thérapies cellulaires allogéniques.

d. Optimisation de la survie des cellules transplantées

Une autre condition à la réussite des thérapies cellulaires est d'optimiser la survie des cellules dont de nombreux facteurs (hypoxie/inflammation des zones greffées, perte des connexions avec une matrice extra-cellulaire, rejet) expliquent la disparition rapide. Plusieurs pistes ont été, et continuent, d'être explorées pour optimiser la survie du greffon : injection de cellules de support pour améliorer la vascularisation ; perfectionnement technologique des méthodes de transfert afin de réduire leurs effets délétères sur les cellules tout en améliorant la précision du ciblage ; incorporation dans des biomatériaux permettant une libération prolongée et optimisation de l'immunosuppression (choix des drogues, doses, chronologie d'administration) pour en réduire les effets secondaires.

e. Clarification du mécanisme d'action (thérapie de remplacement ou effet paracrine)

Le premier objectif de la thérapie cellulaire qui visait à remplacer le tissu lésé par remuscularisation, est, comme on vient de le voir, confronté à de nombreux défis au vu du nombre considérable de cellules qu'il faudrait réussir à maintenir fonctionnelles pour l'atteindre. Par ailleurs, la discordance entre la clairance rapide des cellules transplantées (98), leur faible taux d'intégration et les bénéfiques fonctionnels pourtant décrits ont conduit de nombreuses équipes de recherche, dont la nôtre, à considérer que le principal mécanisme d'action de ces cellules résidait dans leur action paracrine, c'est-à-dire leur capacité à déclencher dans le tissu hôte des mécanismes de réparation endogènes (35,99). Dès lors, l'objectif principal devient de maintenir les cellules thérapeutiques viables suffisamment longtemps pour qu'elles puissent exercer leurs effets paracrines sans pour autant attendre leur intégration et leur synchronisation avec le myocarde hôte ; le problème du rejet est aussi largement résolu puisqu'il ne s'agit

plus de le prévenir complètement mais seulement de le différer, ce qui devient compatible avec une immunosuppression de courte durée, et donc à *priori* dénuée d'effets secondaires graves (91).

XI. Thérapie cellulaire sans transplantation de cellules

1) Mécanisme paracrine

La description des très nombreuses biomolécules sécrétées par les cellules et responsables de leurs effets paracrines reflète leur large spectre d'action (100). Cependant, une compréhension précise des mécanismes par lesquels elles agissent sur les voies de signalisation endogènes contribuant à la réparation du tissu cardiaque reste à clarifier. Par ailleurs, pour que ce mécanisme d'action soit efficace, les cellules sources doivent présenter un fort profil sécrétoire, ce qui ne qualifie pas tout type cellulaire.

Les biomolécules à l'origine des effets paracrines sont principalement encapsulées dans des nanoparticules délimitées par une double membrane lipidique appelées vésicules extracellulaires (VEs). Ces VEs sont sécrétées dans les fluides de l'organisme (sang, urine, larmes, salive, lait maternel, lymphes, sécrétions nasales, liquide amniotique, liquide céphalo-rachidien, bile, liquide séminal) ou dans les milieux de culture cellulaires et composent, en association avec d'autres macromolécules, le sécrétome cellulaire. Les VEs sont anucléés et donc incapables de se répliquer mais elles contiennent du matériel cellulaire. La diversité de leur biogenèse a justifié leur ancienne classification basée sur des critères de taille et de compartiment de formation (101): les corps apoptotiques sont de grosses vésicules de 1 à 5 μm formées au cours des phases tardives de l'apoptose. Les microvésicules sont de plus petite taille entre 100nm et 1 μm et conservent des constituants de la membrane plasmique au cours de leur formation. Enfin, les plus petites particules sont qualifiées d'exosomes ; d'un diamètre inférieur à 100nm, elles sont formées par un processus actif impliquant la fusion de corps multivésiculaires avec la membrane plasmique (Figure 15) (102).

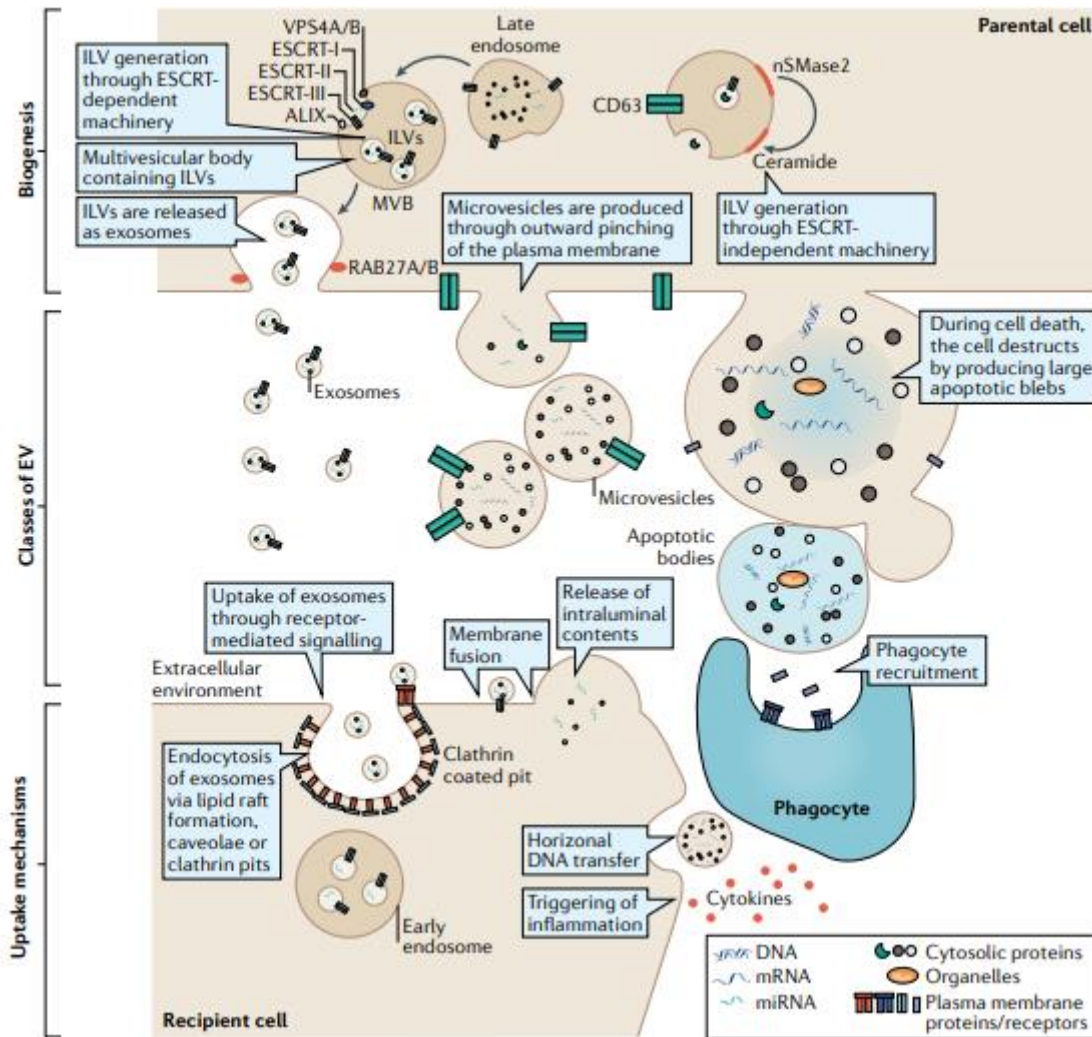


Figure 15 : Diversité de classes de vésicules, de biogenèse et de d'interactions avec les cellules cibles

2) Biogénèses des VEs

Les corps apoptotiques sont générés lors de la mort cellulaire programmée, au cours de laquelle la cellule s'auto-déconstruit (condensation de la chromatine nucléaire, bourgeonnement membranaire et désintégration du contenu cellulaire en vésicules distinctes appelées corps apoptotiques), ce qui conduit à leur contenu aléatoire en constituants cellulaires. Les microvésicules sont produites par le pincement vers l'extérieur de la membrane plasmique et sont de ce fait porteuses des protéines et acides nucléiques présents sur cette membrane à proximité de sa zone de bourgeonnement. Une combinaison de facteurs comme la redistribution des phospholipides et la contraction de la machinerie actine-myosine permettent ce bourgeonnement. D'autre part, des mécanismes en

communs avec la biogenèse des exosomes sont aussi décrits pour la formation des microvésicules.

Les exosomes sont principalement produits par la voie endosomale : le contenu spécifiquement choisi des endosomes est destiné à la dégradation, au recyclage ou à la libération par exocytose. Les endosomes précoces peuvent donc prendre 3 chemins différents : la conversion en endosome de recyclage, la fusion avec un lysosome pour dégradation ou encore la fusion avec la membrane plasmique conduisant au relargage des exosomes. Cette dernière implique la machinerie ESCRT (complexe de tri endosomaux) qui aide au transport et à l'invagination des vésicules intraluminales (ILV) dans les corps multivésiculaires (MVB) de l'endosome. Lors de cette réorganisation membranaire, les tétraspanines CD9 et CD63 sont enrichies au site de formation des ILV. Des GTPases de la famille Rab permettent ensuite la fusion des MVB avec la membrane plasmique ce qui libère les exosomes dans l'environnement extracellulaire. Le bourgeonnement des vésicules dans la lumière de l'endosome est associé aux protéines Alix (ALG-2 Interacting Protein X) et TSG101 (anti-tumor susceptibility gene 101 protein) dont la présence dans les VEs témoigne de leur processus de formation. Les exosomes peuvent aussi être formés par une voie secondaire impliquant une céramide sphingolipidique (Figure 15).

De par leur biogenèse, les VEs contiennent des cargos communs à tous les types cellulaires mais leur contenu biologiquement actif dépend de l'identité de la cellule qui les produit et de son état d'activation ou de stress. Des bases de données récentes comme Exocarta, Vesiclepedia et EVpedia constituent des répertoires du contenu des VEs en fonction de leur méthodes d'isolation.

3) Contenu des VEs

Le contenu des VEs est constitué principalement de protéines, lipides, ADN et ARN (103). Leur contenu conservé entre les types cellulaires permet de les qualifier. Il s'agit :

- De protéines associées à leur biogenèse (Alix, TSG101), à leur libération (protéines Rab), de tétraspanines (CD9, CD63 et CD81), de protéines du cytosquelette (actines, tubulines), intégrines, protéines

de choc thermique (Hsp70, Hsp90), molécules du complexe d'histocompatibilité (CMH), protéines membranaires (LAMP), protéines ribosomales et du protéasome, protéines associées au réticulum endoplasmique, au Golgi et au noyau. Certains ont aussi décrit des médiateurs de voies de signalisation intercellulaires comme le TNF α , l'interleukine 1- β , ou le TGF- β .

- De lipides (sphingomyéline, phosphatidylsérine, cholestérol, ganglioside GM3, lipides insaturés et céramides) composant les membranes plasmiques desquelles les VEs dérivent.
- D'ADN génomique et mitochondrial, d'ARN codants et non codants : ARN ribosomiques, ARN de transfert, ARN messagers (ARNm) et miR sont retrouvés dans les vésicules où ils sont protégés de la dégradation. D'importance majeure dans la régulation de l'expression génique par les VEs, les miR (en tant que régulateurs traductionnels via leur action sur l'épissage alternatif, la stabilité des ARNm ou leur interaction avec les histones régulant l'épigénome) sont au cœur de nombreuses études sur le mécanisme d'action des VEs et leur potentiel thérapeutique (104,105).

4) Classifications et caractérisation des VEs

La découverte indépendante des vésicules dans différents domaines a mené à des nomenclatures parfois erronées et confuses étant donné les attentes inexacts d'une biogenèse unique. La Société Internationale des Vésicules Extracellulaires (ISEV) a donc suggéré d'utiliser une combinaison de caractéristiques pour définir plus précisément le type de VEs isolé, soit :

- Caractéristique physique comme la taille définie par des plages de diamètre ou de densité,
- Composition biochimique en termes de marqueurs de surface,
- Description des conditions de l'origine cellulaire.

Les méthodes d'isolation et de caractérisation des VEs n'étant pas standardisées, l'ISEV recommande aux chercheurs la description la plus fine et précise de tous les facteurs les influençant pour une meilleure reproductibilité des études. Ces facteurs sont principalement : les

conditions de culture des cellules, les méthodes d'isolation puis de stockage des VEs, la caractérisation multifactorielle du produit obtenu en termes de nombre de particules, quantification protéique, lipidique et en ARN, expression de marqueurs de surface protéiques ou lipoprotéiques. La visualisation des VEs grâce à des techniques de haute résolution ainsi que la documentation rigoureuse des liens entre les constituants des VEs et leurs effets fonctionnels (tests de bioactivité) est aussi fortement recommandée (106).

En effet, les VEs ne sont pas simplement des biomarqueurs d'activation ou de stress cellulaire ; leurs cargos sont libérés dans des cellules cibles où ils modifient la biologie endogène : elles représentent donc un acteur majeur de la transduction des signaux. Les VEs sont capables de transférer leurs cargos biologiquement actifs de différentes manières (Figure 15) :

- Une liaison ligand-récepteur via des molécules d'adhésion (ICAM), des intégrines, tétraspanines ou des lipides comme la phosphatidylsérine déclenchant une cascade de signalisation sans internalisation du contenu vésiculaire,
- L'internalisation des VEs puis leur fusion avec l'endosome entraînant la libération de leur contenu dans le cytoplasme,
- La fusion des membranes vésiculaires et cellulaires et le déversement de leur contenu dans le cytoplasme.

Etant des signatures moléculaires des cellules qui les libèrent, les VEs sont donc des facteurs clés de la communication intercellulaire et interviennent dans nombre de processus biologiques physiologiques : prolifération et migration cellulaires, angiogenèse, morphogenèse, homéostasie et détoxification cellulaires, mais aussi inflammation et réponse immunitaire. Les VEs jouent également un rôle exacerbant dans le développement des pathologies et leur implication est notamment décrite dans les infections et les maladies auto-immunes, la cancérogenèse et les processus métastatiques, les maladies neurodégénératives et cardiovasculaires. Afin de réduire le développement pathologique, des recherches sont en cours pour inhiber le rôle des VEs dans celui-ci via l'inhibition de leur formation, de leur libération ou de leur absorption. A l'inverse, d'autres approches

visent à exploiter leurs propriétés biologiques à des fins de thérapie réparatrice.

5) VEs dans essais cliniques

La dernière étape de la thérapie cellulaire tire donc partie du mécanisme d'action paracrine des cellules en n'exploitant plus ces dernières que comme sources productrices *ex vivo* de vésicules. De nombreuses études ont d'ailleurs permis de montrer que les produits de sécrétion cellulaire pouvaient récapituler les effets protecteurs des cellules dont ils sont issus dans des modèles précliniques cardiaque, pulmonaire, rénal ou cérébral (76–79). Pour un même niveau d'efficacité, l'utilisation de VEs préférentiellement à leurs cellules mères est cliniquement pertinente pour différentes raisons : disponibilité immédiate via la possibilité de les cryopréserver (107), faible immunogénicité (les VEs, du moins des CPC étant probablement incapables de récapituler les interactions inflammatoires et immunomodulatrices des cellules allogéniques avec les composants du système immunitaire (108,109)) et possibilité de fabrication selon les standards de l'industrie pharmaceutique (102).

6) Thérapies vésiculaires dans la réparation cardiaque

L'implication des VEs dans la réparation cardiaque a été montrée dans plusieurs études, notamment sur des modèles précliniques d'ischémie cardiaque (108,110–114). Les principaux effets documentés sont la diminution du stress oxydatif, l'augmentation de l'angiogenèse, de la réparation vasculaire ou de la néovascularisation, la restauration de l'état énergétique et la diminution du remodelage cardiaque via une action sur la fibrose, le remodelage de la matrice extracellulaire, l'adhésion cellulaire et la redirection des réactions immunitaires vers la résolution de l'inflammation (100,115,116). En revanche, les VEs ne semblent pas induire la formation de nouveaux cardiomyocytes que ce soit par différenciation de progéniteurs ou par enclenchement de cycles mitotiques chez les cardiomyocytes préexistants (117). Des études utilisant des VEs marquées ont montré qu'elles étaient internalisées par les cardiomyocytes (118), ce qui n'exclut pas que les mécanismes paracrines puissent aussi moduler des voies de signalisation dans les autres types cellulaires présents dans le cœur

(cellules endothéliales vasculaires et fibroblastes) et ce de façon dépendante de la source cellulaire et de la voie d'administration (100,119). De plus, le rôle de ces nanoparticules dans l'atténuation de la dysfonction cardiaque post-chimiothérapie a été rapporté, que les VEs soient dérivées de cellules progénitrices cardiaques (CPC) (120,121) ou de CSM (122). De même, il a été démontré que le sécrétome des cellules souches multipotentes dérivées du liquide amniotique humain limite la toxicité induite par la DOX sur les CPC humains (123).

A notre connaissance il existe à ce jour deux essais cliniques de thérapie vésiculaire pour le traitement de diverses cardiopathies. Le premier a pour indication l'infarctus du myocarde et utilise des VEs dérivées de plaquettes et injectées (selon un schéma d'escalade de doses) par voie intra-coronaire dans les 20 minutes suivant une revascularisation par angioplastie. Piloté par la Mayo Clinic aux US, il a débuté en Novembre 2021 (NCT04327635). Le second essai doit inclure des patients présentant une cardiomyopathie dilatée non ischémique traités par 3 injections intraveineuses de VEs dérivées de CPC. Cette étude (SECRET-HF) est conduite par notre groupe et le dossier est en cours d'examen à l'agence réglementaire.

La recherche sur les effets paracrines de la thérapie cellulaire n'a que quelques années, et même si d'énormes avancées ont été obtenues sur la compréhension de la biogenèse des VEs et leur mécanismes d'action, de nombreuses questions restent encore sans réponse consensuelle et parmi elles : Quelle est la source cellulaire la plus bénéfique et pour quelles indications ? Quelle est la dose de VEs optimale ? Quelle voie d'administration est à la fois non invasive et efficace ? Quelle est la fenêtre de temps thérapeutique ?

Autant de questions auxquelles ce projet de thèse tentera d'apporter quelques réponses.

XII. Rationnel et objectifs de recherche

1) Rationnel

Spécialisée dans la recherche translationnelle sur les thérapies régénératives des pathologies cardiaques et vasculaires, notre équipe s'attache à comprendre les mécanismes gouvernant la réparation cardiaque et à participer au développement de thérapies innovantes pour la stimuler. Des années de recherches ont permis d'affiner les premiers essais qui avaient testé la greffe de myoblastes autologues à des fins de remplacement du tissu cardiaque (79). La possibilité d'une différenciation des CSP en cellules commises vers le lignage cardiaque, conjuguée à la démonstration que de telles cellules semblaient les plus efficaces en termes d'effets cardio-protecteurs (84) ont conduit notre équipe à utiliser des CPC issus de CSP d'abord embryonnaires et intégrés dans un patch de fibrine, dans des modèles animaux puis chez l'homme (91,98). Bien que les résultats aient été globalement positifs, le faible taux de rétention des cellules ne suffisait pas à expliquer le bénéfice fonctionnel observé, confortant ainsi l'hypothèse d'un mécanisme d'action paracrine qui s'est trouvé confirmé par une étude montrant que l'administration intra-myocardique exclusive des VEs pouvait récapituler l'effet cardio-protecteur des CPC dont elles étaient issues (124).

Pour des raisons de disponibilité, notre équipe s'est alors tournée vers des CPC dérivés de CSPi, n'exploitant plus les cellules que comme sources de production de VEs (111). La reconnaissance que de meilleurs résultats semblent être obtenus lorsque les VEs proviennent de cellules parentales phénotypiquement proches de celles du tissu ciblé pour la réparation (125–127) et sont encore à un stade précoce de différenciation a justifié l'intérêt de notre équipe pour les CPC puisque moins la cellule est engagée, plus son sécrétome est bioactif (94,99,111,128) .

Toutefois, l'un des prérequis importants à une utilisation clinique des VEs a été leur meilleure caractérisation et la compréhension de leur contribution aux effets globalement cardio-protecteurs observés expérimentalement. Dans un but mécanistique, notre équipe a étudié le caractère immuno-modulateur de ces VEs *in vivo* et a constaté, dans un modèle murin

immunocompétent d'insuffisance cardiaque chronique, que l'injection intramyocardique de VEs permettait de diminuer l'inflammation, notamment en réduisant le nombre des précurseurs des macrophages pro-inflammatoires (Lyh6 High) dans le tissu cardiaque et les taux circulants de médiateurs pro-inflammatoires. Cette propriété anti-inflammatoire a été confirmée au stade aigu de l'infarctus avec une diminution significative des cellules (monocytes, macrophages et neutrophiles) et des médiateurs pro-inflammatoires et une augmentation des médiateurs anti-inflammatoires circulants. Par ailleurs, les VEs n'ont pas induit une réponse humorale (pas de production de immunoglobulines) ou cellulaire (pas de production d'IFN γ par les splénocytes) dans un modèle vaccinal, ce qui traduit l'absence de réponse immune de type allogénique et démontre leur intérêt pour une utilisation thérapeutique sans immunosuppression pharmacologique (108,111). L'utilisation des modèles de souris transgéniques MerCreMer-Zeg et MADM nous a aussi permis de prouver que le bénéfice observé n'était pas lié à l'augmentation du pool de cellules contractiles (ni par mobilisation de cellules progénitrices endogènes ni par réinduction d'un cycle mitotique chez les cardiomyocytes déjà différenciés) mais plutôt à un effet global anti-fibrotique (117).

2) Problématique et objectifs

Pour des raisons épidémiologiques, il est également important de savoir si ces VEs pourraient être efficaces dans le traitement de certaines cardiopathies non ischémiques dont l'incidence est élevée et pour lesquelles les résultats inconstants des médicaments classiques justifient d'explorer de nouvelles approches thérapeutiques. Ainsi, comme cela a été rappelé plus haut, le pronostic de nombreux cancers s'est nettement amélioré au cours des dernières années mais l'une des rançons de ce succès est la survenue possible chez les survivants d'une cardiomyopathie souvent sévère, et pouvant survenir à distance du traitement, induite par la chimiothérapie (5,33,129,130).

Dans ce projet, nous cherchons à établir si les VEs dérivées de CPC peuvent agir sur les principales anomalies chimio-induites (stress oxydatif et métabolique et perte de force contractile) et permettre ainsi d'améliorer la contractilité myocardique altérée par la chimiothérapie. Par ailleurs, le caractère invasif des injections intra-myocardiques communément employées jusqu'à maintenant nous semble justifier d'explorer les effets d'une injection directe des VEs dans la circulation systémique d'autant plus qu'il est maintenant reconnu que pour être efficace, il est préférable que le traitement soit répété (131–133), ce qui a pour corollaire une voie d'administration non invasive. Par ailleurs, les nouvelles recommandations des sociétés savantes de cardiologie et de cardio-oncologie actent que la fraction d'éjection ventriculaire gauche n'est plus le seul critère diagnostique des cardiomyopathies chimio-induites et qu'étant donné les mécanismes complexes qui régissent la cardiotoxicité aux anthracyclines, d'autres marqueurs plus précoces doivent être recherchés (37). Tel est le cas de la déformabilité myocardique évaluée par la mesure du strain que nous avons choisi de privilégier dans ce projet. Finalement, en vue d'une transposition chez l'homme, l'étude préclinique de l'efficacité fonctionnelle des VEs de CPC dérivés de CSPi produites selon un protocole compatible avec les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) a été le dernier objectif de cette thèse.

Matériels et Méthodes

I. Production des sécrétomes

1) Production des EV-CPC

Les CPC sont différenciés à partir d'une banque maîtresse de CSPi. Ces CSPi sont issues de la reprogrammation de cellules de sang périphérique d'un donneur sain et sont obtenues via l'expression ectopique de facteurs de reprogrammation (par exemple Oct4, Sox2, Nanog, Lin28, Klf4, L-Myc, SV40LT) par transfection épisomale (iCell CPC, Biosafety documentation, FCDI). Les CPC sont différenciés par un processus breveté par FCDI et représentent les premiers stades de l'engagement mésodermique vers le lignage cardiaque, elles montrent un profil classique de marqueurs de CPC (KDR⁺/PDGFR- α ⁺/C-KIT⁻) et sont, en tant que cellules progénitrices, capables de prolifération et de différenciation en divers types de cellules cardiaques ou vasculaires (iCell CPC, Product Datasheet, FCDI).

Les CPC cryopréservés (iCell[®] Cardiac Progenitor Cells, FUJIFILM Cellular Dynamics Inc, USA) sont décongelés etensemencés à une densité de 78 000 cellules par cm² sur des hyperflasques (CellBIND[®] Surface HYPERFlask[®], Corning) pré-enduites de fibronectine (Roche Applied Sciences, USA) et cultivées à 7% de CO₂ et 37°C dans un milieu sans sérum comme préconisé par le fournisseur : milieu William's E (Life Technologies, France) supplémenté en Cocktail B (Life Technologies), 25µg/mL de gentamicine (Life Technologies) et 1µg/ml de facteur de croissance FGF-2 (Cell Guidance System, UK). Après 2 jours de culture le milieu de culture est remplacé par un milieu pauvre (composé uniquement de milieu William's E et de gentamycine) pour 2 jours supplémentaires garantissant l'origine uniquement cellulaire des VEs recueillies. Le milieu conditionné composé du produit de sécrétion des cellules durant ces 2 derniers jours de culture est collecté et clarifié par 2 centrifugations successives de 400g, 10 minutes, puis 2000g, 30 minutes afin de le débarrasser d'éventuelles débris cellulaires et corps apoptotiques puis conservé à -80°C avant concentration du sécrétome. Les CPC sont décollés de l'hyperflasque par l'action de la trypsine (Gibco[™]Trypsine-EDTA 0,05 %) et comptés en cellule de Malassez.

Le sécrétome enrichi en vésicules est concentré par ultrafiltration à force centrifuge dont la membrane en cellulose régénérée verticale ne projette pas les particules contre la membrane filtrante (Merck Millipore, Amicon Ultra-15, PLTK, Membrane Ultracel-PI, 30 kDa) (Figure 16). La membrane est d'abord rincée par le passage d'eau stérile milliQ® à 4°C pendant une centrifugation de 10 minutes à 4000 *g*. Le milieu conditionné est ensuite ultrafiltré pendant une centrifugation de 10 minutes à 4000 *g*. Une diafiltration par ajout de tampon phosphate salin en excès est réalisée par une centrifugation de 10 minutes à 4000 *g* afin de remplacer le milieu cellulaire par un tampon neutre. Une dernière étape de concentration est réalisée par centrifugation du retentât à 4000 *g* pendant 7 minutes. Le sécrétome enrichi en vésicules extracellulaires isolé de CPC (EV-CPC) est alors aliquoté pour éviter les cycles congélation-décongélation et cryopréservé à -80°C.

Parallèlement, toutes les étapes décrites précédemment sont également réalisées avec du milieu de culture des CPC seul (sans CPC), appelé Milieu Vierge (VM-CPC), dans le but de comparer l'effet attribué aux EV-CPC à celui attribué au milieu de culture, contenant lui-même des vitamines, sels inorganiques et acides aminés. Ceci permet d'attribuer spécifiquement les effets fonctionnels aux EV-CPC et ainsi d'éliminer tout biais potentiel dû à un effet du milieu de culture.

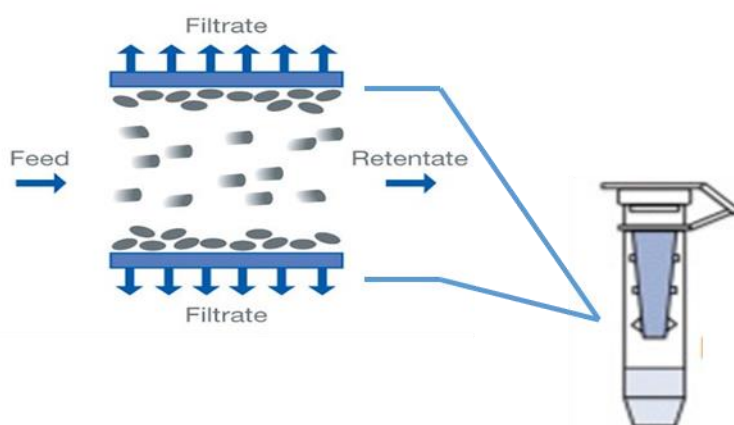


Figure 16 : Principe schématique de l'ultrafiltration à flux vertical et à force centrifuge (pall.com)

2) Production des GMP-EV

Pour l'étude de l'efficacité fonctionnelle de VEs de CPC dérivés de CSPi produites selon un protocole compatible avec les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF), les CPC humains dérivés de CSPi ont été produits à l'Innovation Facility for Advanced Cell Therapy de la société Fujifilm Cellular Dynamics, Incorporated (FCDI) avec laquelle notre équipe collabore de longue date (iFACT - FCDI, Madison, USA). La génération de CPC a été réalisée dans une suite BPF à l'aide d'un nouveau processus de différenciation avec des méthodes, des matériaux et des réactifs compatibles BPF à l'échelle de fabrication clinique d'une Phase 1 (prototype-BPF-CPC) (Ravel et al, manuscrit en préparation, brevet en instance). Les prototypes-BPF-CPC ont ensuite étéensemencés à une densité de 100.000 cellules par cm² sur des plateaux de culture CellStack® (Corning) pendant 3 jours dans un milieu enrichi en facteurs nutritifs puis pendant 2 jours dans un milieu appauvri en ces facteurs. Les processus de vésiculation et d'isolement (réalisés au Centre de thérapie cellulaire et génique MEARY, AP-HP, Paris, France) ont été menés à l'échelle d'une fabrication clinique et à l'aide de méthodes, de matériaux et de réactifs compatibles avec les BPF (manuscrit en préparation, brevet déposé). Le milieu conditionné issu des 2 derniers jours de culture est clarifié par une succession de 4 filtres 200 µm – 15 µm – 1,2 µm – 0,2 µm) en polyethersulfone (PES) et le sécrétome enrichi en vésicules est isolé à l'aide d'une filtration à flux tangentiel TFF Allegro™ CM150 (PALL/Sartorius) (Prototype-BPF-EV-CPC = « GMP-EV ») à l'aide de cassettes stériles en cellulose régénérée à usage unique (seuil 30 kDa ; 0,14 m², Sartorius). Le retentât a ensuite été soumis à des étapes de diafiltration et stérilisé sur filtre à l'aide d'un filtre de 0,22 µm (Sterivex™). Le produit final a été aliquoté et cryo-conservé à -80°C.

II. Caractérisation de l'enrichissement en VEs des sécrétomes isolés

Suivant les recommandations des informations minimales pour l'étude des vésicules extracellulaires publiées en 2018 (106), les EV-CPC et GMP-EV ont été caractérisées de plusieurs manières différentes : nombre de particules, morphologie, expression de marqueurs de surface, quantification

et contenu en protéines. Pour chaque lot de VEs, la reproductibilité de leur effet fonctionnel a été vérifiée sur des tests d'angiogenèse (test de cicatrice) et de survie cellulaire, *in vitro*.

1) Distribution de tailles et concentration protéique

L'analyse de la distribution de tailles des particules EV-CPC et GMP-EV a été faite par l'analyse du suivi de nanoparticules (NTA) (NanoSight LM-10, Malvern). Cette technique permet de quantifier les particules de tailles comprises entre 50 et 1000 nm selon leur mouvement brownien (déplacement qu'elles effectuent, en suspension dans un liquide contenu dans une chambre fermée), lorsqu'elles sont traversées par un faisceau laser. La lumière que les particules diffractent est alors détectée par un microscope et leur mouvement est enregistré sur 5 vidéos de 60 secondes chacune. Trois préparations de VEs avec des dilutions différentes sont réalisées. Les paramètres de température, de seuil de détection et de niveau de caméra sont fixés à 27 °C, 4 et 15, respectivement, pour toutes les analyses.

La concentration protéique du sécrétome des EV-CPC est déterminée par dosage colorimétrique au cours duquel les protéines dosées chélatent les ions cuivreux Cu^{2+} en ion Cu^+ dans un milieu alcalin. L'acide bicinchronique interagit avec ce dernier pour former un complexe hydrosoluble de couleur pourpre absorbant à 562 nm ; la mesure de l'absorbance par spectrophotométrie est proportionnelle à la concentration initiale en protéines (Bicinchoninic Acid Assay, BCA, Thermo Scientific, Illkirch, France).

2) Morphologie

L'observation d'échantillons en cryomicroscopie électronique à transmission (cryoMET) couplée à un immunomarquage combine les avantages des deux techniques : le CryoMET permet l'observation des membranes vésiculaires à haute résolution car les échantillons se trouvent dans un état proche de leur état hydraté natif puisqu'ils ne sont ni séchés, ni fixés, ni colorés, ni en lames minces. L'immunomarquage permet d'ajouter à cette technique la qualification des particules comme vésicules puisqu'il permet de marquer les marqueurs vésiculaires présents à leur surface.

Des nanoparticules d'or de 10 nm de diamètre ont été conjuguées à un anticorps monoclonal anti-CD81 (clone JS64, Beckman Coulter) ou à l'annexine-A5 (Anx5) suivant des procédures décrites précédemment (134). Les échantillons d'EV-CPC ont été marqués pendant 1h avec les nanoparticules d'or couplées à l'anti-CD81 ou à l'anti-Anx5 et incubées à $1-3 \times 10^{15}$ particules d'or/L, à température ambiante. Une fois les échantillons marqués ils ont été traités pour la cryoMET comme suit : un aliquot de 4 μ L a été déposé sur une grille de MET revêtue d'un film de carbone perforé. Après avoir drainé l'excès de liquide avec un papier filtre, les grilles ont été rapidement plongées dans l'éthane liquide à l'aide d'une chambre cryogénique (Leica EMCP) et stockées dans des cryoboîtes sous azote liquide jusqu'à l'observation. Pour l'observation cryoMET, les grilles ont été montées sur un cryosupport (Gatan 626) et transférées sur un microscope Tecnai F20 (FEI, USA) fonctionnant à 200 kV (Figure 17). Les images ont été enregistrées avec une caméra CCD Eagle 2k (Thermo Fisher). Cette technique a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Professeur Alain Brisson dans l'unité de Chimie et Biologie des Membranes et Nanoobjet (UMR-CBMN Université de Bordeaux-CNRS Pessac, France).

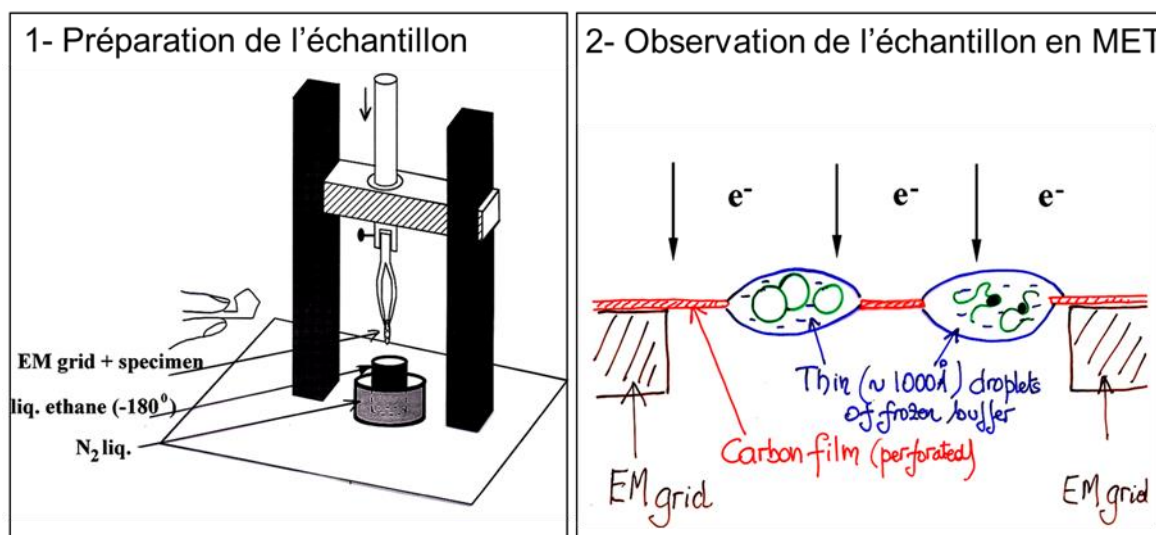


Figure 17 : Principe schématique de la cryomicroscopie électronique à transmission (cryoMET). (Pr A. Brisson, Unité de Chimie et Biologie des Membranes et Nanoobjet, UMR-CBMN, Université de Bordeaux-CNRS, France).

3) Expression de marqueurs vésiculaires

Les marqueurs vésiculaires ont été analysés par 3 techniques différentes : par cytométrie en flux utilisant le MACSPlex Exosome Kit (Milteny, Germany) et le MACSQuant Analyzer 10, par Kit Elisa (PS Capture Exosome ELISA Kit) et par analyse protéomique.

a. MACSPlex

Le kit MACSPlex permet la détection de nombreux marqueurs de surface susceptibles d'être exprimés par des VEs de sources différentes. Le kit comprend un cocktail de diverses populations de billes marquées par fluorescence, chacune revêtue d'un anticorps spécifique se liant à un épitope de surface. Les différentes populations de billes peuvent être distinguées par différentes intensités de fluorescence par cytométrie en flux : Les VEs sont incubées avec les billes de capture revêtues d'anticorps anti-marqueurs de surface vésiculaire, puis les VEs liées aux billes de capture sont marquées avec des réactifs de détection. Par conséquent, des complexes sandwich se forment entre la bille de capture de VEs, les VEs et le réactif de détection et ces complexes sont analysés sur la base des caractéristiques de fluorescence de la bille de capture de VEs et du réactif de détection. Le marquage est réalisé selon les recommandations du fournisseur, en duplicats techniques, à partir de 5×10^9 EV-CPC. Cette technique a été réalisée au Centre de thérapie cellulaire et génique MEARY, AP-HP Paris, France.

b. Elisa

Le kit PS Capture Exosome ELISA (Streptavidin HRP) (FUJIFILM Wako Pure Chemical, Japan) est un kit de dosage immunoenzymatique qui permet des analyses qualitative et quantitative des VEs. Il se base sur l'affinité des exosomes pour la protéine Tim4 qui se lie spécifiquement à ces derniers via les phosphatidylsérines (PS) présentes à leur surface. Un anticorps biotinylé spécifique des protéines de surface vésiculaire est utilisé pour la détection primaire et la streptavidine couplée à une peroxydase (HRP, de l'anglais horseradish peroxidase) permet la détection secondaire.

Le marquage a été réalisé selon les recommandations du fournisseur, en triplicats techniques, à partir du résultat du dosage protéique (BCA), sur des concentrations en EV-CPC de 10 ng/mL, 100 ng/mL et 1000 ng/mL.

c. Analyses protéomiques

- Préparation des échantillons

Les CPC dérivés de CSPi (iCell® Cardiac Progenitor Cells, Cellular Dynamics International, USA) et des fibroblastes de derme humain (NHDF) ont été décongelés etensemencés à une densité de 78000 cellules/cm² et 5000 / cellules/cm², respectivement, sur des flasques tapissées de fibronectine (Roche Applied Sciences, USA) et cultivés 4 jours à 7% CO₂ et 37°C dans le milieu des CPC (milieu William's E, Life Technologies, France) supplémenté en Cocktail B (Life Technologies), 25µg/mL de gentamicine (Life Technologies) et 1µg/ml de facteur de croissance FGF-2 (Cell Guidance System, UK). Au jour 2, les flacons ont été lavés 4 fois avec du tampon phosphate salin pour éliminer toute contamination sérique puis les cellules ont été cultivées dans un milieu sans supplément pendant les 2 derniers jours de culture. Au jour 4, le milieu conditionné a été collecté, pré-clarifié par centrifugation pendant 6 minutes à 1200 *g* et les EV-CPC ont été isolées par ultrafiltration de 3kDa. Dix µg de chaque échantillon ont été séchés et solubilisés dans 20 µL d'urée 8M, bicarbonate d'ammonium 200 mM, puis réduits dans du dithiothréitol 5 mM, pH 8 sous agitation à 37°C pendant 1 h. Après refroidissement à température ambiante, les cystéines ont été alkylées en ajoutant 10 mM d'iodoacétamide pendant 30 minutes dans l'obscurité. Après dilution à 1 M d'urée avec 200 mM de bicarbonate d'ammonium pH 8, les échantillons ont été digérés avec 1 µg de trypsine/LysC (Promega), sous agitation à 37 °C pendant une nuit. Les échantillons ont ensuite été chargés sur des StageTips C18 préparés au laboratoire pour le dessalage. Les peptides ont été élués en utilisant 40/60 MeCN/H₂O + 0,1% d'acide formique, concentrés sous vide à sec et reconstitués dans un tampon d'injection (0,3 % TFA) avant l'analyse par nano-LC-MS/MS. L'ensemble des étapes de l'analyse protéomique est présentée sur la Figure 18.

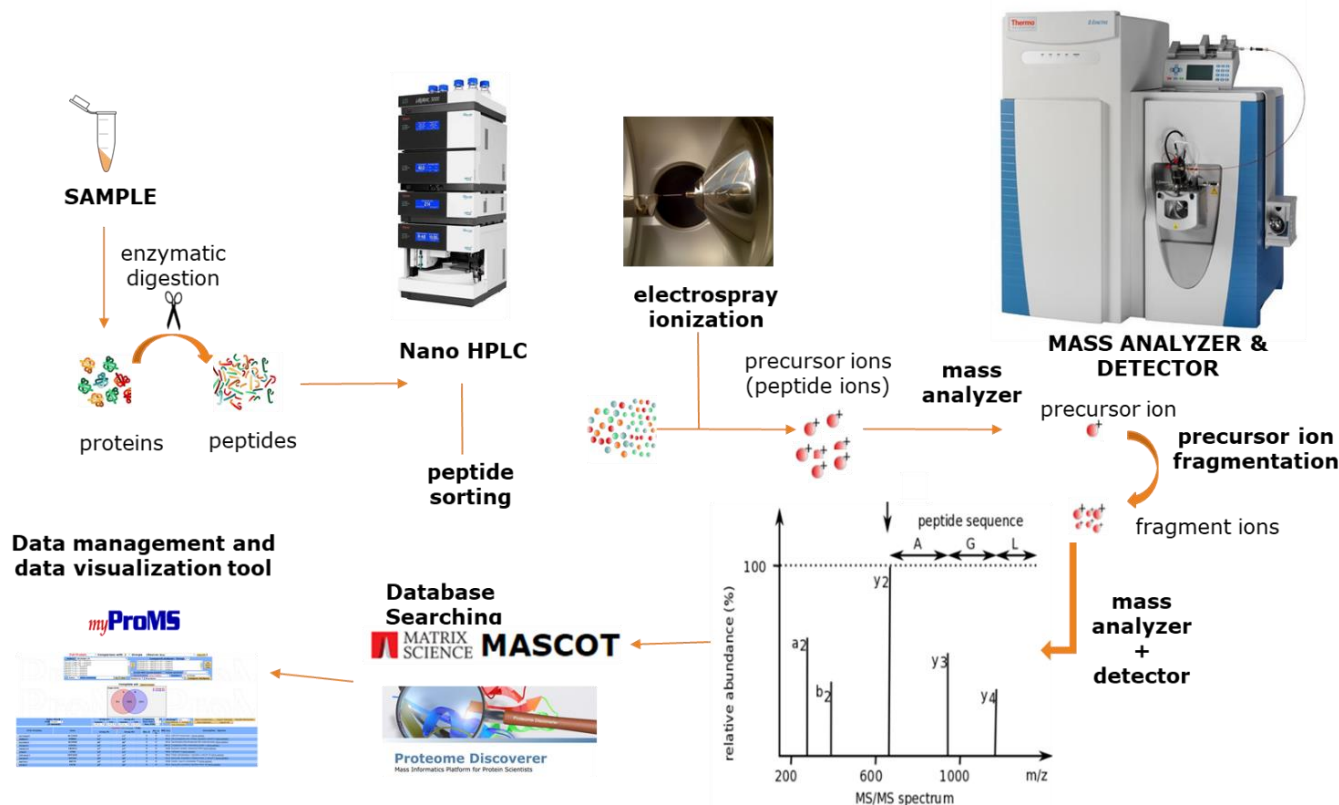


Figure 18 : Schéma des principales étapes de l'analyse protéomique (Centre de Recherche Curie CoreTech Mass Spectrometry Proteomics, Institut Curie, Université PSL)

- Analyse LC-MS/MS

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a été réalisée avec un système RSLCnano (Ultimate 3 000, Thermo Scientific) couplée à un spectromètre de masse Orbitrap Exploris 480 (Thermo Scientific). Les peptides ont d'abord été piégés sur une colonne C18 (75 µm de diamètre intérieur × 2 cm ; nanoViper Acclaim PepMap™ 100, Thermo Scientific) avec du tampon A (2/98 MeCN/H₂O dans 0,1 % d'acide formique) à un débit de 3,0 µL/minute environ 4 minutes. La séparation a ensuite été réalisée sur une colonne C18 de 50 cm x 75 µm (nanoViper Acclaim PepMap™ RSLC, 2 µm, 100Å, Thermo Scientific) réglée à une température de 40°C avec un gradient linéaire de 3% à 29% de tampon B (100 % MeCN dans de l'acide formique à 0,1 %) à un débit de 300 nL/minute pendant 91 minutes. Des scans complets MS ont été effectués dans l'analyseur de masse Orbitrap à champ ultra-élevé dans les plages m/z 375–1500 avec une résolution de 120.000 à m/z 200. Les 20 ions les plus intenses ont été soumis à Orbitrap pour une fragmentation supplémentaire via une dissociation de collision

(HCD) de haute énergie et une résolution de 15.000 avec la cible AGC réglée sur 100%. Les ions avec un état de charge de +2 à +6 ont été sélectionnés pour le screening. L'énergie de collision normalisée (NCE) a été fixée à 30 et l'exclusion dynamique à 40 s.

- Analyse des données

Pour l'identification de protéines, les données ont été recherchées dans la base de données Homo Sapiens Swiss-Prot (UP000005640) et dans une banque de données des contaminants courants à l'aide de Sequest-HT via le découvreur de protéomes (version 2.4). L'action de la trypsine a déterminé la spécificité enzymatique et un maximum de deux sites de clivages manquants a été autorisé. La méthionine oxydée, la perte de méthionine, la perte de méthionine-acétyle et l'acétylation N-terminale ont été définies comme modifications variables. La carbamidométhylation des cystéines a été définie comme une modification fixe. L'écart de masse maximal autorisé a été fixé à 10 ppm pour les ions précurseurs monoisotopiques et à 0,02 Da pour les pics MS/MS. Les fichiers résultants ont ensuite été traités à l'aide de myProMS v3.9 (135). Le calcul du FDR (taux de fausses découvertes) a utilisé le percolateur (136) et a été fixé à 1% au niveau du peptide pour toute l'étude. Les chromatogrammes ioniques extraits de peptides (XIC) ont été extraits à l'aide de MassChroQ version 2.2.17 (137) et un alignement spécifique à la condition a été effectué pour réextraire les XIC manquants à travers les réplicats.

Pour la quantification des protéines, les XIC de peptides protéotypiques partagés entre les conditions comparées (appariement TopN) et les clivages manqués ont été autorisés. Une normalisation médiane et d'échelle a été appliquée sur le signal total des protéines partagées pour corriger les XIC pour chaque réplicat biologique.

Pour estimer l'enrichissement en protéines dans les EV-CPC par rapport aux VEs de fibroblastes, un modèle linéaire (ajusté sur les peptides et les réplicats biologiques) a été réalisé et les valeurs de p ont été ajustées à l'aide de la procédure Benjamini – Hochberg. Le pourcentage molaire et massique des protéines a été estimé en utilisant le Top 3 (138) (y compris les protéines avec moins de 3 peptides) comme indice de quantification des

protéines et le modèle de proportionnalité directe (139). La quantification absolue des protéines présentes dans les EV-CPC (au moins deux peptides distincts pour chaque protéine) a sélectionné 2.713 protéines.

Les données de protéomique issues de la spectrométrie de masse ont été déposées auprès du consortium ProteomeXchange via le référentiel partenaire PRIDE (140) avec l'identifiant de l'ensemble de données PXD022129 (nom d'utilisateur : reviewer_pxd022129@ebi.ac.uk, mot de passe : Z8DFhSCS).

Cette technique a été réalisée par le Centre de Recherche Curie CoreTech Mass Spectrometry Proteomics, Institut Curie, Université PSL.

d. Western Blot anti-HSC70

Après décongélation, les EV-CPC ont été concentrées à nouveau avec une ultrafiltration 0,5 (Merck Millipore, PMNL 30Kda). Le retentât a été directement quantifié par NTA et dénaturé dans un tampon de charge (4X Laemmli Sample Buffer sans β -mercapto-éthanol, Bio Rad) à 95°C pendant 5 minutes. Trois^{E+9} EV-CPC ont été chargées sur des gels de polyacrylamide 1-D (4-20%) (Mini protean TGX precast, Bio-Rad) et soumises à une électrophorèse dans un tampon de charge (10X Tris-Glycine-Sodium dodecyl sulfate [SDS], Bio-Rad) pendant 2 heures à 20 V puis à 60 V pendant 2 heures supplémentaires dans une cuve d'électrophorèse verticale MiniPROTEAN Tetra (Bio Rad). Les membranes de nitrocellulose (Precut, Bio-Rad) ont été pré-humidifiées dans de l'eau et du tampon de transfert avant utilisation. Les protéines ont ensuite été transférées sur les membranes de nitrocellulose dans une cuve humide (Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad) avec un tampon de transfert (Tris-Glycine 10X, Bio-Rad, additionné d'éthanol à 20 %, pH fixé à 8,3 pour améliorer la résolution des protéines de petit poids moléculaire) à 125 V pendant 1 h. Les membranes ont ensuite été bloquées dans un tampon de blocage constitué de 3% de lait-TBS-T (10X Tris Buffered Saline, Bio-Rad, complété par 0,01% Tween 20 et 3% lait écrémé) sous agitation constante pendant 1 h. HSC70 a été marqué avec l'anticorps monoclonal de rat HSC70/HSP73 (clone 1B5, Enzo Life Sciences, dilué 1/1500) pendant une nuit dans un

tampon de blocage sous agitation constante. Les membranes ont ensuite été marquées avec l'anticorps secondaire d'âne anti-rat conjugué à la peroxydase de raifort (HRP-AffiniPure Donkey Anti-Rat Ig, Laboratoire Jackson, dilué au 1/1000) dans un tampon de blocage sous agitation constante pendant 1,5 h. Après les incubations d'anticorps primaires et secondaires, les blots ont été lavés trois fois avec du TBS-T pendant 15 minutes et deux fois pendant 5 minutes. La révélation a été réalisée avec un substrat de chimioluminescence améliorée (ECL) (ThermoScientific) et le signal chimioluminescent a été révélé à l'aide de l'ImageQuant™ LAS 4 000.

4) Tests de fonctionnalité

a. Test de cicatrisation

Chaque nouvelle production d'EV-CPC est soumise à un test *in vitro* de routine pour évaluer la reproductibilité de chaque lot de VEs en termes de bio-activité. Des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (C-12200, PromoCell, Allemagne) sontensemencées à une densité de 45.000 cellules par cm² dans un milieu de culture Endothelial Cell Growth medium (C-22210, PromoCell) supplémenté de Endothelial Cell Growth Medium Supplement (C-39210, Promocell) pendant 24 heures à 5 % CO₂ et 37 °C. Lorsque les cellules forment un tapis homogène confluent, une cicatrice est formée dans le tapis manuellement à l'aide d'un cône de pipetage 10 µL. Les puits sont alors traités par les EV-CPC (5^E+9p / 15.000 cellules pour 24 h) dans du milieu pauvre (sans supplément, PM) et comparés aux puits contrôles traités par du milieu pauvre seul ou du milieu complet seul (Cont). Rapidement après les traitements, la position de la cicatrice est localisée et enregistrée par un vidéo-microscope inversé (Nikon Eclipse Ti, Nikon Corporation, Japon) qui acquiert des images de chaque puit toutes les 6 heures pendant 24 heures. La surface de la cicatrice est déterminée à chaque point temporel par un logiciel de traitement d'images (Image J). Le pourcentage de cicatrisation de la plaie est calculé à la fin de l'expérience selon l'équation suivante :

$$100\% \times \frac{\text{Surface à } T_0 - \text{Surface à } T_{24h}}{\text{Surface à } T_0} .$$

Chaque valeur de réplicat scientifique (n=5) est une moyenne de trois réplicats techniques et a testé 5 préparations d'EV-CPC différentes.

b. Test de survie cellulaire

La bio-activité des GMP-EV a été testée sur des tests colorimétriques au WST-8. Les sels de tétrazolium WST-8 sont réduits par les déshydrogénases cellulaires en un produit orange, le formazan, qui est soluble dans le milieu de culture cellulaire. La quantité de formazan produite, reflétée par son absorbance à 450 nm, est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

Des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC) ont été utilisées entre les passages 2 et 6 et cultivées avec le milieu de croissance de cellules endothéliales (Promocell, Allemagne) à 37°C et 5 % de CO₂. La veille de l'essai, les cellules sontensemencées sur des plaques de 96 puits recouvertes de gélatine à 0,1 %. Le lendemain, lorsque les cellules ont atteint la confluence, le milieu complet a été remplacé par un milieu dépourvu de sérum (PM) avec 0,01 µM de staurosporine (Cell Signaling Technology, USA) pendant 1 heure à 37°C. Après l'incubation, les cellules ont été rincées deux fois avec du PM et incubées avec 100 µL de PM supplémentés en 2^E+9 ou 5^E+9 GMP-EV. Après 20 h, le kit Cell Counting kit-8 (Sigma-Aldrich, USA) a été ajouté dans chaque puits (dilution 1/10) suivi d'une incubation de 3 heures à 37°C. La viabilité cellulaire a été évaluée avec la mesure de l'absorbance à 450 nm. Les résultats ont été normalisés au contrôle positif PM+Stauro et le milieu complet (Cont) sans stress à la staurosporine a été utilisé comme témoin négatif. Chaque valeur de réplicat scientifique est une moyenne de trois réplicats techniques. Les résultats sont exprimés normalisés par rapport à la moyenne des réplicats scientifiques du contrôle négatif (PM) fixée à 1.

III. Evaluation du métabolisme énergétique *in vitro*

1) Caractérisation des cellules

Les cellules choisies pour la réalisation des tests *in vitro* sont des cardiomyocytes (CM) humains dérivés de CSPi (kit iCell® Cardiomyocytes², 01434, FCDI.). Les lignées cellulaires de CSPi ont été générées à partir de fibroblastes humains par expression ectopique de facteurs de reprogrammation (c'est-à-dire Oct4, Sox2, Nanog, Lin28) par transduction rétrovirale (dont les particules rétrovirales ont été obtenues à partir du surnageant de culture de cellules HEK 293T (iCellCM², Biosafety documentation, FCDI). Les CM différenciés à partir de ces cellules constituent une population pure à 98% (sélectionnée sur l'expression de la troponine) selon les informations du fabricant, composée d'un ensemble de cellules auriculaires et nodales, et de myocytes de type ventriculaire avec des propriétés biochimiques et électrophysiologiques caractéristiques de CM humains (iCellCM², Certificates of Analysis and Testing and User Guide, FCDI).

A la décongélation ces cellules ont été caractérisées phénotypiquement par FACS (Macsqant10 MQ10®, Miltenyi) pour leur expression de divers marqueurs :

- Marqueurs de pluripotence (anticorps anti Sox2, clone REA320, Miltenyi, et anticorps anti Nanog, clone N31-355, BD Biosciences),
- Marqueurs de différenciation cardiaque précoce (anticorps anti Islet-1, clone Q11-465, BD Biosciences, et anticorps anti GATA4, clone L97-56, BD Biosciences),
- Marqueurs de différenciation cardiaque tardive (anticorps anti Cardiac Troponin T, clone REA400, Miltenyi, et anticorps anti-chaîne lourde de myosine, clone REA399, Miltenyi).

L'expression de ces marqueurs par les CM a été comparée à celles de cellules témoins : des cellules CSPi (Gibco® Episomal hiPSC Line) cultivées selon les recommandations du fabricant et des cellules prototype-BPF-CPC cultivées selon les protocoles décrits plus haut.

Les CM ont ensuite étéensemencés à une densité de 156.000 cellules viables/cm². Après 4 jours de culture, lorsqu'ils forment une couche

syncytiale composée de cellules connectées électriquement et qui battent en synchronie, les CM ont été marqués par immunofluorescence : les cellules ont été fixées avec du paraformaldéhyde (4 %, 20 minutes) et les membranes cellulaires ont été perméabilisées avec du Triton (1 %, 20 minutes). Les sites non spécifiques ont été saturés avec de l'albumine de sérum bovin (BSA, 5 %). Les CM ont été incubés avec un anticorps anti-troponine I cardiaque (Abcam) (dilué au 1/500 dans BSA2%, 4°C, pendant la nuit), puis incubés avec un anticorps secondaire (Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Texas Red, Thermofisher) (1/500 en BSA2%, 2h) et contre-colorés au DAPI. Les images ont été acquises sur le microscope numérique à fluorescence inversée EVOS™ FL (objectif X10) et traitées avec le logiciel ImageJ.

2) Evaluation de la fonction mitochondriale

Afin de reproduire les expositions répétées des protocoles cliniques, les CM ont été soumis à trois expositions séquentielles de 48 heures chacune à la DOX (0,2 µM de chlorhydrate de DOX, Merck Millipore) soit aux jours 0, 2 et 4 (J0, J2, J4) selon un protocole adapté de Chaudhari et al (141). Les CM ont ensuite été exposés aux EV-CPC ajoutées au milieu de maintenance des CM. Les cellules contrôles ont reçu uniquement le milieu de maintenance (DOX+placebo) ou le milieu de maintenance complété par le milieu de culture des CPC vierge (VM-CPC, même volume que celui occupé par les EV-CPC) (Figure 19).

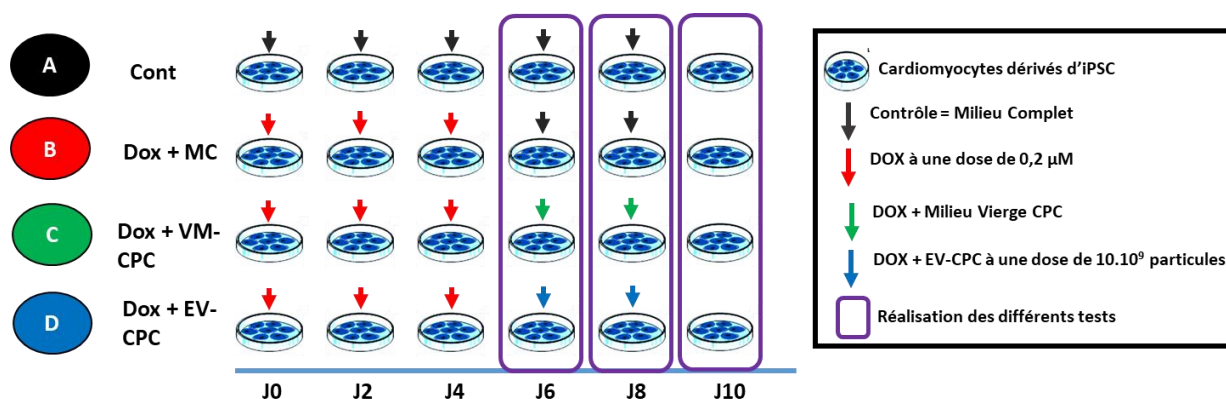
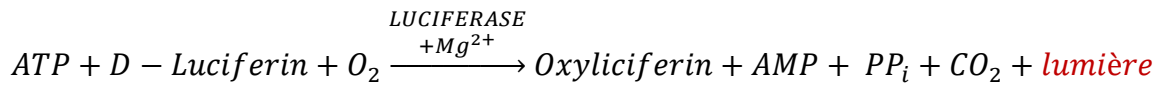


Figure 19 : Protocole d'expositions répétées à la DOX et aux EV-CPC

Les résultats ont été analysés au jour 6 (directement après la fin de l'exposition à la DOX) et au jour 8 (après 48h de traitement par les EV-CPC à une dose de 10^{E+9} particules pour 50.000 cellules) sur la fonction mitochondriale évaluée par le Seahorse XFp Cell Mito Stress Test (Agilent). Cette technique maintient les mitochondries dans leur environnement intracellulaire natif et permet l'évaluation d'une part, du taux d'acidification extracellulaire (ECAR) qui donne un aperçu de l'activité glycolytique par la mesure de la concentration en protons dans le milieu d'essai, principalement modulée par la formation d'acide lactique au cours du métabolisme énergétique glycolytique ; et d'autre part, du taux de consommation d'oxygène mitochondrial (OCR) qui est un indicateur clé du taux de respiration mitochondriale évalué par la mesure de la concentration d'oxygène dans le milieu d'essai. Le MitoStress réalise une analyse non-invasive qui permet de mesurer l'OCR en temps réel avant et après l'injection de différents modulateurs de la respiration mitochondriale : l'oligomycine, un inhibiteur de l'ATP synthase, le cyanure de carbonyl-p-trifluorométhoxyphényl-hydrazon (FCCP), un agent découplant qui arrête le gradient de protons, et enfin la rotenone et l'antimycine A, inhibiteurs respectifs des complexes I et II de la chaîne mitochondriale.

Le MitoStress test a été réalisé selon les recommandations du fournisseur et analysé sur le logiciel Wave Desktop software 2.6. Chaque valeur de réplicat scientifique est une moyenne de trois réplicats techniques. Les résultats sont présentés normalisés par le nombre de cellules comptées manuellement en bleu trypan sur une lame de Malassez. Ils sont exprimés normalisés par rapport à la moyenne des réplicats scientifiques du contrôle négatif (DOX+placebo) fixée à 1.

Aux jours 6, 8 et 10 l'effet des EV-CPC a aussi été observé sur les taux intracellulaires d'ATP après exposition soit à une dose d'EV-CPC ($1,7^{E+9}$ particules pour 50.000 cellules) pendant 48h ou soit à deux doses d'EV-CPC ($1,7^{E+9}$ particules pour 50.000 cellules) répétées (pendant 96 heures) (Figure 19). Cette mesure a été réalisée par un test en luminescence basé sur une réaction enzymatique (ATPlite Luminescence Assay System, PerkinElmer) dont l'équation chimique est la suivante :



Le jour de l'essai, 50 µL de tampon de lyse sont ajoutés à chacun des puits avant d'être agités 5 minutes à 700 rpm. Cinquante µL du mélange Luciférine/Luciférase sont ajoutés à chaque puit, et agités pendant 5 minutes à 700 rpm. Après 10 minutes dans l'obscurité, la bioluminescence est mesurée dans l'appareil Mithras LB 940 (Berthold) avec le logiciel Mikrowin 2 000. Chaque valeur de réplicat scientifique est une moyenne de trois réplicats techniques. Les résultats sont exprimés normalisés par rapport à la moyenne des réplicats scientifiques du contrôle négatif (DOX+placebo) fixée à 1.

IV. Modèles animaux de cardiopathie à la chimiothérapie et administration des EV-CPC et GMP-EV

1) Modèles animaux

Toutes les procédures ont été approuvées par le comité d'éthique institutionnel de l'Université de Paris (projets #15616 et #33136) et sont conformes à la législation européenne (directive de la Commission européenne 2010/63/UE) sur les soins aux animaux.

Soixante-seize souris mâles BALB/c immunocompétentes (BALB/cJRj ; âgées de 9 à 12 semaines ; Janvier Labs) ont été soumises à 3 injections intrapéritonéales (IP) hebdomadaires de DOX (DOX ACCORD 2 mg/ml) pour une dose cumulée totale de 12 mg/kg selon un protocole adapté de Li et al. (142). Quatorze souris supplémentaires ont été traitées de façon fictive (SHAM) et ont subi des injections IP de tampon isotonique (solution de chlorure de sodium à 0,9 %, Fresenius Kabi) sans traitement DOX. Trois doses égales d'EV-CPC (dose totale de 30^E+9 particules) ont été administrées par voie intraveineuse (IV, par le sinus rétro-orbitaire ; n=30) à des intervalles de 4 à 7 jours, en commençant immédiatement après la fin du traitement DOX ou 2 semaines plus tard. Un groupe placebo a subi des injections de tampon isotonique selon le même calendrier et le même protocole d'administration (n=39) (Figure 20A).

Dans un second temps, 27 rats Wistar femelles immunocompétentes (RjHan: W ; 8 semaines ; Janvier Labs) ont reçu 5 injections IP de DOX (3 mg/kg chacune ; dose cumulée totale de 15 mg/kg), selon un protocole adapté de Altomare et al. (143)) suivies de 3 injections IV (par la veine caudale) de GMP-EV (dose totale de 100E + 9 particules, une tous les 2 jours). Les rats contrôles ont reçu une injection fictive (Sham, n=6) ou la DOX puis une injection de tampon isotonique (DOX+placebo) (Figure 20B). Afin d'éviter les biais de sélection et d'assurer la comparabilité des mesures, les animaux traités à la DOX (souris et rats) ont été répartis entre les groupes d'EV-CPC (ou GMP-EV) et de contrôles (DOX+placebo) sur la base de leur état clinique à la fin de la chimiothérapie, principalement via leur perte de poids par rapport au début de l'étude. Les poids des animaux juste avant l'injection sont présentés en Annexe Figure 1. Les souris ont été euthanasiées 9 à 11 semaines après la première injection de DOX. Les rats ont été euthanasiés 29 jours après la première injection de DOX (Figure 20).

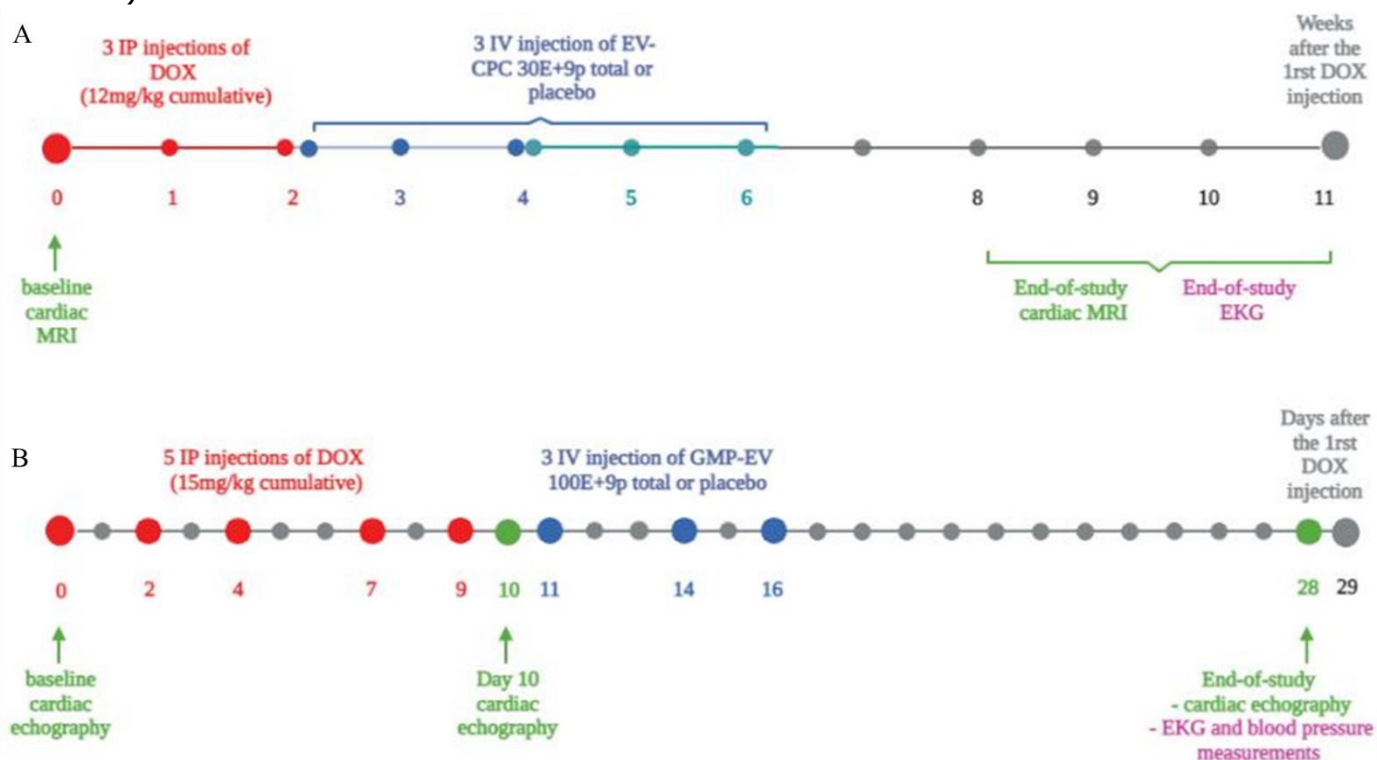


Figure 20 : Schéma des protocoles expérimentaux des modèles animaux de cardiopathie à la chimiothérapie et administration des EV-CPC et GMP-EV

Les euthanasies ont été réalisées sous anesthésie avec de hautes doses d'isoflurane associées à une dépression des voies nociceptives par injection

préalable d'un anti-hyperalgésique opioïde (buprenorphine 0,05 mg/kg par voie sous cutanée). L'euthanasie est effectuée par exsanguination par ponction cardiaque : le cœur est prélevé battant et nettoyé dans une solution chaude de sérum physiologique avant pesée et cryoconservation afin de pouvoir être caractérisé par histologie ou immunofluorescence. Les poumons, foies et rates des souris et des rats ont été prélevés pour être pesés. Les poumons ont également été pesés après 24h dans une étuve à 60°C. Les pattes droites ont été récoltées et les longueurs de tibia ont été mesurées avec un pied à coulisse après la lyse des tissus des pattes (Tris 50 mM, EDTA 5 mM ; SDS 0,5 %, NaCl 0,9 % 100 mM, protéinase K, 550 µg/mL) pendant une nuit dans une étuve à 37 °C.

La manipulation des animaux a été réalisée après des formations « concepteur de projets en expérimentation animale » et « chirurgie expérimentale du petit animal » délivrées par la Faculté de Pharmacie et l'INSERM. Les bonnes pratiques de manipulation ont aussi été enseignées et validées en interne grâce aux techniciens animaliers du PARCC et de l'Institut Cochin.

Chez la souris, les injections IP (aiguille 26 Gauge) et IV (aiguille 29 Gauge) sont réalisées en vigile avec dans ce dernier cas, une induction préalable par anesthésie gazeuse à l'isoflurane 1,5%. Cette anesthésie gazeuse a été choisie car elle permet une sédation et une myorésolution avec un réveil rapide et, bien qu'il ait un effet inotrope négatif, l'isoflurane est le gaz halogéné qui a le moins d'effets cardiopresseurs.

Les rats sont anesthésiés avant chaque manipulation (isoflurane 2%) et les injections IP et IV (aiguilles 25 gauge) se font après rasage et passage de la zone à l'éthanol. Chaque injection IP alterne entre les côtés gauche et droit de l'animal.

Avant chaque intervention et régulièrement au cours du suivi, une grille de scores de points limites est évaluée afin d'estimer de façon objective l'état clinique et le degré d'angoisse ou de souffrance des animaux (en termes d'apparence physique, d'abreuvement et d'alimentation et de comportement individuel et social) et ainsi leur maintien ou leur écartement du protocole expérimental. Si les hauts scores de points limites sont atteints

une euthanasie est effectuée par une dose létale de pentobarbital sodique (euthasol 40%, 140 mg/kg) par injection IP sous anesthésie gazeuse.

2) Évaluation fonctionnelle par IRM cardiaque chez la souris

L'imagerie par résonance magnétique cardiaque (IRM) a été réalisée chez la souris sur un scanner préclinique de 4,7 Tesla (Biospec 47/40 USR, Bruker, Allemagne) avec une bobine de volume de transmission combinée à une bobine de surface à réseau phasé de quatre canaux, spécifique au cœur de la souris. L'anesthésie des souris a été induite avec 4 % d'isoflurane en air ambiant, puis avec 1,5 - 2 % d'isoflurane, sur la base d'un rythme respiratoire d'environ 80/min. La température des souris a été stabilisée à 37°C à l'aide d'une couverture chauffante. Une vidéo du petit axe du cœur a été acquise avec des séquences de type ciné FLASH intragate : 8 coupes de 1 mm d'épaisseur ont été acquises séquentiellement avec les paramètres suivants : temps de répétition / temps d'écho (TR/TE) = 7,2/2,7 ms ; angle de bascule de 18 ° ; résolution planaire de 117 µm ; 16 images du cycle cardiaque par coupe ; et un suréchantillonnage de 150 avec un temps d'acquisition de 2 minutes 18 sec par coupe. Les vidéos ont également été acquises dans une coupe de grand axe avec les mêmes paramètres. Pour certaines souris, une coupe à quatre chambres a également été acquise. Les valeurs basales se réfèrent à des souris saines non traitées dont les données ont été évaluées en début d'étude dans un échantillon aléatoire de 5 animaux. Les paramètres fonctionnels des animaux traités ont aussi été évalués à la fin de l'étude soit 9 à 11 semaines après le début du traitement à la DOX (Figure 20A). Le logiciel Circle Cardiovascular Imaging (cvi 42 version 5.13, Canada) a été utilisé pour le post-traitement des images et l'évaluation quantitative des acquisitions CINE a été réalisée, en aveugle, par le laboratoire de recherche en imagerie biomédicale CREATIS (Saint Etienne, Lyon).

La fonction globale a été évaluée en traçant manuellement les bords endocardiques internes et épicaudiques externes du ventricule gauche (VG), dans le petit axe, en fin de diastole et en fin de systole. Les muscles papillaires ont été systématiquement exclus de la segmentation du

diamètre interne en utilisant une fonctionnalité du logiciel. Après validation, le logiciel calcule les paramètres basés sur les volumes du ventricule gauche pour l'ensemble des données. Cela comprend le volume en fin de systole (VTS en mL), le volume en fin de diastole (VTD en mL), la masse myocardique (MyoMass en g) et la fraction d'éjection (FEVG en %) définie comme suit : $FEVG = \left(\frac{VTD - VTS}{VTD} \right) \times 100$

Le module de suivi des tissus (tissue-tracking) a été utilisé pour déterminer la déformation (strain) longitudinale globale (SLG) du VG chez tous les animaux avec une segmentation régionale (endocardique et épicaudique) réalisée en vue à 2 chambres (et 4 chambres si disponible) en fin de diastole, puis propagée automatiquement dans l'ensemble du cycle cardiaque. Lorsqu'il était disponible, le SLG a été calculé à partir de la moyenne des valeurs SLG obtenues dans les vues à 2 et 4 chambres. Sinon, seule la vue 2 chambres a été analysée. La précision du suivi a été inspectée visuellement et des corrections ont été apportées au contour initial (manuellement, si nécessaire) avant de réappliquer l'algorithme de suivi.

Pour l'évaluation de la déformation (strain) circonférentielle (SC), des coupes en petit axe ont été analysées au niveau basal (la coupe la plus basale incluant une visualisation complète du myocarde circulaire en fin de systole). L'évaluation régionale du SC (valeurs épicaudiques et endocardiques) a également été réalisée.

Les muscles papillaires ont également été inclus dans la segmentation du diamètre interne à l'aide d'une fonctionnalité du logiciel et les données sont présentées en Annexe, Figure 2.

Les valeurs absolues des mesures SC et SL ont été exprimées en pourcentage où des valeurs plus élevées (moins négatives) indiquent une fonction contractile moins bonne. Les données sont également exprimées en pourcentage de variation (% Δ) par rapport aux valeurs de référence moyennes fixées à 100 % et, dans ce type de présentation, plus la valeur est positive, meilleure est la fonction.

Des analyses ECG ont été effectuées à la fin de l'étude sur le module d'analyse LabChart® & PowerLab® conformément aux instructions du fabricant. Des aiguilles placées en sous-cutané détectent le début,

l'amplitude et l'intervalle des ondes PQRST pour évaluer la fonction cardiaque avec des paramètres de détection spécifiques de l'espèce. La fonction de « moyenne des battements » du module réduit le bruit et les artefacts de mouvement.

3) Évaluation fonctionnelle par échocardiographie chez le rat

Chez le rat, une évaluation de la fonction cardiaque a été réalisée (sous anesthésie à 1,5-2 % d'isoflurane) avec une échocardiographie bidimensionnelle (échographe Visual Sonics 2100, FUJIFILM, Canada) équipée d'une sonde transductrice de 20 MHz. Les données ont été acquises sur tous les animaux à l'inclusion avant le traitement par la DOX, entre le traitement par la DOX et les injections de GMP-EV au jour 10 (J10) et à la fin de l'étude soit 29 jours après la première injection de DOX. La température corporelle ainsi que les rythmes respiratoire et cardiaque ont été contrôlés tout au long des acquisitions.

Les valeurs échocardiographiques de VTS et de VTD ont été calculées à partir de vues parasternales dans le grand axe en mode bidimensionnel (logiciel VEVO Lab) avec la méthode d'aire-longueur en plan unique. Les contours ont été tracés toujours par le même opérateur, en aveugle du groupe de traitement et vérifiées par un cardiologue senior.

A la fin de l'étude, les rats ont été légèrement anesthésiés (1,5% d'isoflurane) et des électrocardiogrammes ont été enregistrés avec le module d'analyse LabChart® & PowerLab®, comme décrit précédemment. Des mesures de la pression artérielle ont aussi été réalisées avec une technologie non invasive d'enregistrement de la pression volumique (VPR) (CODA® High Throughput System, Kent Corporation), qui mesure les caractéristiques physiologiques du retour du flux sanguin (pulsations artérielles) après gonflage occlusif d'un bandeau caudal. La pression artérielle systolique (PAS, mmHg) est mesurée automatiquement dès la première apparition d'un gonflement de la queue. La pression artérielle diastolique (DPB, mmHg) est mesurée automatiquement lorsque le taux de gonflement cesse d'augmenter dans la queue. La pression artérielle moyenne (mmHg) et la fréquence cardiaque (bpm) sont également évalués.

V. Analyse des mécanismes moléculaires de l'effet des EV-CPC dans les cœurs de souris

1) Analyses transcriptomiques des cœurs de souris par qRT-PCR et histologie

Après les euthanasies, les oreillettes des cœurs de souris explantées ont été retirées et les cœurs ont été disséqués en 2 parties : l'apex (1/4 du volume du cœur) a été directement congelé dans de la vapeur d'azote liquide pour analyse transcriptomique et la partie restante (3/4 du volume du cœur) a été immergé dans un agent d'enrobage cryo-préservant (Optimal Cutting Temperature, OCT, Tissue-Tek ; Sakura Finetek, France) avant congélation.

L'ARN total du tissu cardiaque extrait a été lysé mécaniquement avec un Polytron (IKA Ultra Turrax T25) dans une solution de lyse (TRIzol™, Invitrogen, USA) conformément aux instructions du fabricant. La concentration et la pureté de l'ARN ont été évaluées par spectrophotométrie (NanoDrop One®, ThermoFisher Scientific).

Des amorces spécifiques au remodelage cardiaque et à la fonction contractile ont été conçues avec le logiciel Oligo 7 (Molecular Biology Insights, USA). La transcription inverse a été effectuée à partir de 100ng d'ARN total (QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Allemagne). Les réactifs (SYBR® Green reagents, Meridian Bioscience, USA) pour la réaction en chaîne de polymérisation quantitative (qPCR) ont été préparés et distribués dans des plaques de 96 puits, manuellement ou avec le PIPETMAN® (Pipetmax 268 Gilson). Les PCR ont été réalisées sur le système StepOnePlus (ThermoFisher Scientific), l'expression génique a été analysée sur le logiciel StepOne™ et comparée à l'expression génique constitutive de l'Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase (HPRT). La liste des amorces est indiquée en Annexe Tableau 1.

Pour la recherche de la fibrose, les cœurs de souris ont été cryo-sectionnés en coupes minces transversales de 7 µm. La coloration au rouge PicroSirius a été utilisée pour visualiser et quantifier la fibrose interstitielle : cette technique colore les fibres de collagène de type I et III en rouge alors que les autres éléments cellulaires et extracellulaires acquièrent une coloration

non spécifique variant de jaunâtre à rosâtre. Les coupes de tissu congelées ont été immergées dans de l'éthanol à 80 % (10 minutes) puis réhydratées dans de l'eau. La coloration a été effectuée dans un bain de rouge Sirius (10 g/100 ml d'acide picrique - 16 minutes) suivie d'un rinçage dans des bains d'eau, d'éthanol à 95 %, d'éthanol à 100 % et de xylène (3 minutes chacun). Le milieu de montage Eukitt a été utilisé pour un montage entre lame et lamelle. Les images ont été acquises sur un scanner de coupes Nanozoomer XR (Hamamatsu Photonics, Japon) et quantifiées manuellement, en aveugle des groupes de traitement, à l'aide du logiciel de traitement d'images Image J (au moins 3 images sur 4 coupes de tissu prises à 3 niveaux différents du cœur ont été analysées).

2) Analyses transcriptomiques des cœurs de souris par puces Affymetrix®

La quantification de l'ARN et le contrôle de sa qualité ont été effectués à l'aide du kit de réactifs HT RNA et du système microfluidique Caliper Lab Chip (Perkin Elmer). Cent nanogrammes d'ARN total ont été amplifiés, marqués et fragmentés à l'aide du kit de réactifs GeneChip Plus (ThermoFisher Scientific). Le principe schématique de cette technique est présenté Figure 21. Cette technique rend possible l'analyse de l'expression du transcriptome entier sur des puces d'expression GeneChip™ Whole Transcript (WT). Le kit utilise une méthode d'amorçage par transcription inverse qui amorce la longueur totale de l'ARN, y compris l'ARNm poly(A) et non poly(A), afin de fournir une couverture complète et non biaisée du transcriptome : la transcription inverse est initiée à la queue poly-A de l'ARN ainsi que sur toute sa longueur ce qui permet de capturer à la fois les formes codantes et les formes multiples non codantes de l'ARN et ainsi, l'amplification d'échantillons d'ARN intacts, partiellement dégradés ou compromis. L'amplification de l'ARN est réalisée par PCR à faibles cycles suivie d'une amplification linéaire utilisant la technologie de transcription *in vitro* T7 (IVT). L'ARNc est ensuite converti en cibles d'hybridation (ADN à

brins sens amplifiés et biotinylés) pour une couverture non biaisée du transcriptome.

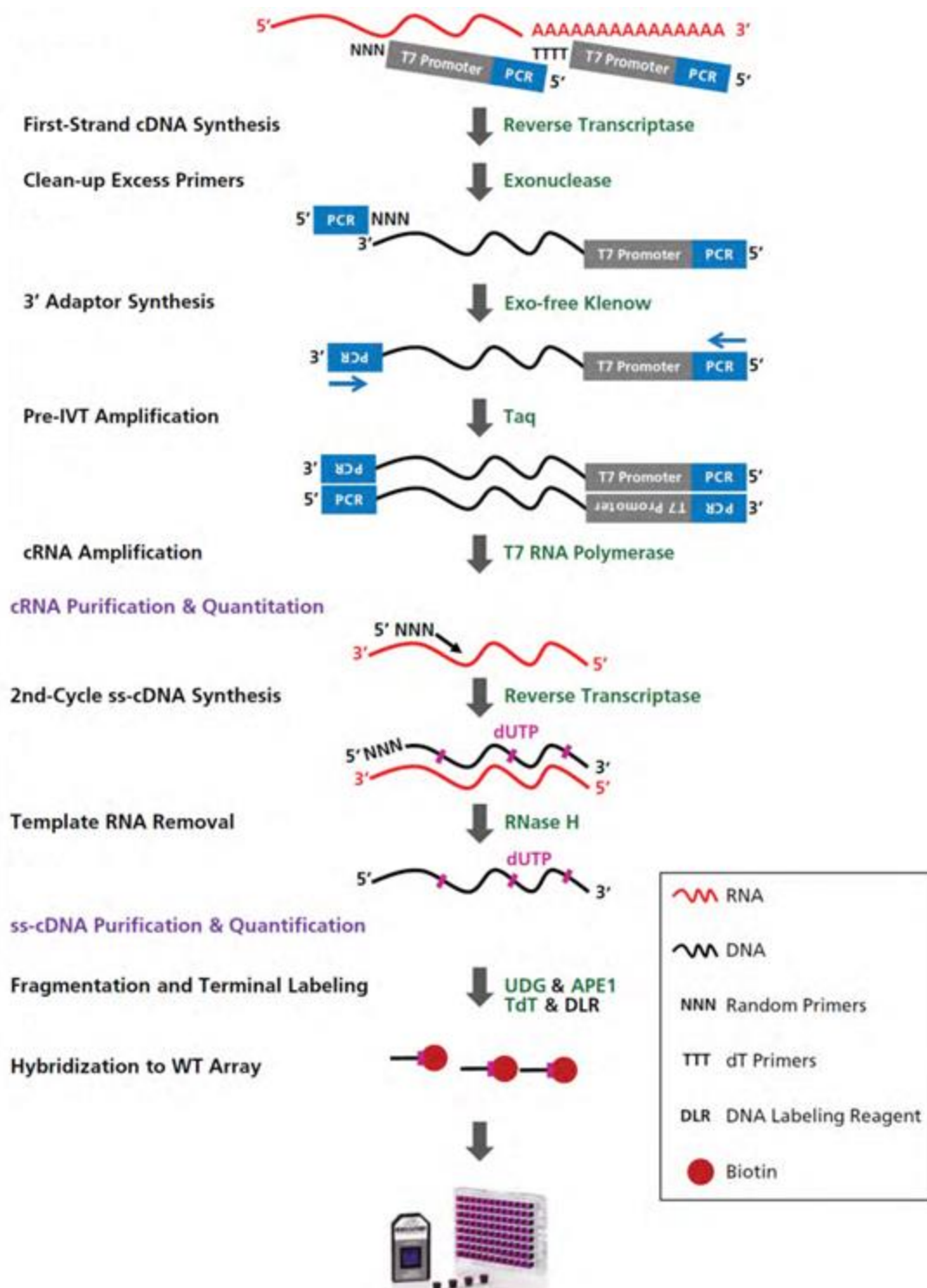


Figure 21 : Schéma des étapes principales des analyses transcriptomiques sur puces. Ce protocole permet la génération des cibles d'ADN à brin sens amplifiées et biotinylés à partir de l'ARN total sans qu'il soit nécessaire de procéder à une étape de sélection ou d'enrichissement préalable de l'ARNm (thermofisher.com).

Chaque échantillon (sham : n=2, DOX+EV-CPC : n=4, DOX+placebo : n=3) a été hybridé sur la puce Clariom D Rat Array (ThermoFisher Scientific), lavé et coloré avec l'Affymetrix® Fluidics Station 450. Le balayage de la puce a été effectué avec l'Affymetrix® GeneChip Scanner 3 000 7G à l'aide du logiciel Command Console (ThermoFisher Scientific), puis analysé en utilisant la routine Affymetrix® rma-sketch.

Cette technique a été réalisée et analysée en collaboration avec la Plateforme technologique IRSL de l'Hôpital Saint Louis, Paris, France.

Les gènes exprimés de manière différentielle entre les groupes ont été sélectionnés à l'aide d'une analyse de variance unidirectionnelle (méthode ANOVA eBayes) à l'aide du logiciel Affymetrix Transcriptome Analysis Console (TAC) v.1.0 ($-2 \leq \text{fold change} \leq +2$; $p\text{-value} \leq 0,05$). Une première comparaison (Comparaison A - Figure 22) a été effectuée pour identifier les gènes exprimés de manière différentielle entre les souris injectées DOX + placebo (n=3) et les sham (n=2) et a révélé 1.752 gènes. Une deuxième comparaison (Comparaison B - Figure 22) a été effectuée pour identifier les gènes exprimés de manière différentielle entre les souris injectées DOX + EV-CPC (n=4) et les sham (n=2) et a révélé 1.345 gènes. La liste commune (Liste C - Figure 22) entre les deux comparaisons précédentes a été supprimée de la liste B et un total de 173 gènes ont été sélectionnés comme « gènes spécifiquement modifiés par le traitement EV-CPC ».

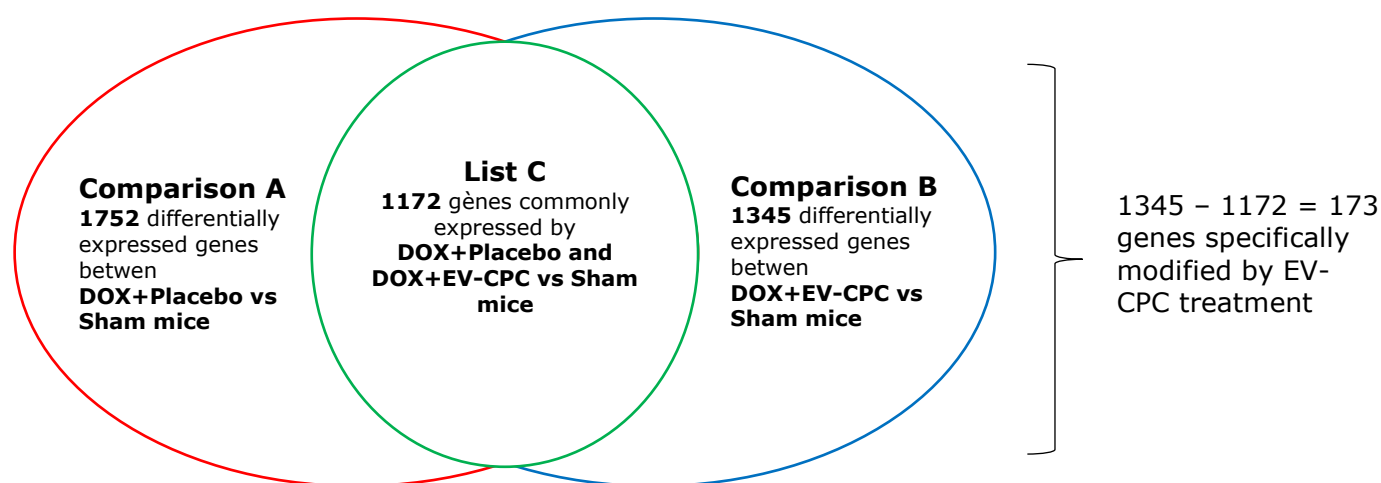


Figure 22 : Méthode d'analyse comparative des expériences de transcriptomiques réalisées sur les cœurs de souris

Avant l'analyse, une curation de la liste des gènes a été effectuée pour supprimer tous les gènes comportant les termes non spécifiques ou redondants suivants (arabidopsis, yeast, cerevisiae, pombe, drosophila, olfactory vomeronasal, riken, eukaryotic translation/traduction, solute carrier, et family sequence similarity). Après curation, 122 gènes ont été trouvés comme étant régulés à la hausse après le traitement par les EV-CPC et 22 gènes, à la baisse. L'analyse des voies de signalisation selon KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) impliquant les 122 gènes régulés positivement par les EV-CPC après curation a été réalisée grâce à la ressource en ligne d'annotation et d'analyse de gènes, Metascape (144).

3) Analyses protéomiques des cargos présents dans les EV-CPC

Le matériel et méthode décrivant les expériences de protéomique ont été décrits dans la section « Matériel et Méthodes II. 3) c. analyses protéomiques ».

Afin de qualifier le cargo protéique des EV-CPC par rapport aux VEs de fibroblastes, une sélection selon les critères suivants a été réalisée : Les protéines avec au moins trois peptides distincts dans au moins cinq réplicats (n=5), un enrichissement minimum de 50 fois dans les EV-CPC par rapport aux VEs de fibroblastes et une valeur p ajustée $\leq 0,05$, qualifiant les protéines uniques des EV-CPC, ont été sélectionnées. Ces protéines (1123 protéines) ont ensuite été soumises à une analyse d'enrichissement fonctionnel d'ontologie des gènes (Gene Ontology - GO) comme dans Kowal et al (145) en utilisant le fichier d'ontologie slim. Trente-quatre protéines qui ne correspondaient à aucun terme GO ont été exclues de l'analyse. Le diagramme en points des termes GO enrichis pour le processus biologique a été obtenu à partir du langage de programmation R en utilisant le package ggplot2.

VI. Statistiques

Toutes les données ont été soumises à l'outil GraphPad Prism Outlier (ROUT ; Q=10 %) avant de créer des graphiques et de calculer des statistiques. La normalité de chaque distribution de variable a été testée par les tests D'Agostino & Pearson et Shapiro-Wilk. Un test U de Mann Whitney a été utilisé pour comparer 2 groupes de distribution non paramétrique. Un test de Kruskal-Wallis par rangs a été utilisé pour comparer 3 groupes expérimentaux indépendants ou plus présentant une distribution non paramétrique. Les comparaisons entre les groupes ont ensuite été effectuées en utilisant le test de comparaisons multiples de Dunn. Réciproquement, lorsque les variables présentaient une distribution normale, un test t non apparié a été utilisé pour comparer 2 groupes et une ANOVA unidirectionnelle a été utilisée pour comparer 3 groupes expérimentaux indépendants ou plus corrigés avec la méthode Tuckey pour les comparaisons multiples par paires. Pour comparer les courbes de survie, un test du Log-rank a été réalisé. Une valeur de $p \leq 0,05$ a été considérée comme significative. Pour estimer la taille de l'effet du traitement par les VEs, l'indice d de Cohen pour la variance inégale a été calculé comme suit (SD = écart type, S = variance moyenne) :

$$Cohen's\ d = \frac{|Mean_{EV} - Mean_{DOX}|}{S} \text{ where } S = \sqrt{\frac{(SD_{EV}^2 + SD_{DOX}^2)}{2}}$$

L'interprétation de cet indice est basée sur la stratification communément acceptée où des tailles d'effet petites, moyennes, grandes et très grandes sont considérées pour des valeurs de 0,2, 0,5, 0,8 et 1,3 respectivement. Chez un rat témoin pour lequel l'enregistrement d'échocardiographie de fin d'étude n'a pas pu être analysé, l'imputation de la donnée manquante a été effectuée selon la méthode de la dernière observation reportée (LOCF). Toutes les analyses statistiques ont été vérifiées par une statisticienne indépendante.

Résultats

I. Production et caractérisation des sécrétomes enrichis en vésicules extracellulaires issus de progéniteurs cardiaques

1) Production adaptable avec une réalisation à large échelle

Jusqu'à aujourd'hui, toutes les VEs testées dans notre équipe provenaient de progéniteurs cardiaques de grade recherche et ont été collectées par des techniques de laboratoire classiques : les cellules étaient ensemencées en flasques de 150cm², cultivées dans un milieu de culture complet (supplémenté en facteurs nutritifs) et le milieu conditionné était soumis à une ultracentrifugation à 100.000 g pendant 16 heures à 4°C.

L'étape suivante a consisté à faire évoluer la méthode de production de VEs vers des procédés compatibles avec une utilisation clinique et à grande échelle. Pour ce faire, nous avons élargi la taille de nos productions en ensemencant les cellules sécrétrices sur des hyperflasques dont l'aire de culture est de 1720cm² et dont la fabrication est optimisée pour favoriser les échanges gazeux entre les plateaux de la flasque. Le milieu de culture a aussi été modifié pour que les deux derniers jours soient réalisés avec un milieu dépourvu de suppléments, afin de ne récupérer que les VEs de source cellulaire sans contamination de protéines et particules issues de composants du milieu de culture. Enfin, afin de travailler sur un milieu conditionné épuré de débris cellulaires et corps apoptotiques, la méthode de clarification a été optimisée en testant plusieurs techniques (centrifugations successives, filtres, terre de diatomées) et ont mené à la sélection de deux centrifugations séquentielles de 400g, 10 minutes, puis 2 000g, 30 minutes.

Enfin, l'ultracentrifugation a été remplacée par l'ultrafiltration. A l'échelle de laboratoire cette technique s'effectue en tubes de 15 mL : la concentration du sécrétome est permise par force centrifuge et la membrane de filtration étant verticale, le flux ne projette pas les particules contre la membrane

filtrante. Une membrane en cellulose régénérée a aussi été choisie puisqu'elle présentait un meilleur rendement en VEs que celle en PES.

Cette technique a aussi été sélectionnée pour son adaptabilité à grande échelle inhérente à un processus de fabrication cliniques au cours duquel elle apporte plusieurs avantages :

- Le retentât peut être remis en circulation et diafiltré plusieurs fois sans risque d'encrassement du filtre ; cela permet donc le remplacement complet du milieu de culture cellulaire par le tampon de préservation des VEs souhaité,
- Le circuit d'isolation peut être fermé, évitant ainsi les sources de contamination extérieure, absolu prérequis à toute utilisation clinique,
- La valeur du seuil de coupure à 30kDa a permis de récolter également un mélange de biomolécules libérées par les cellules et distinctes des VEs: cette méthode d'isolation définie comme « de récupération intermédiaire et de spécificité intermédiaire » est justifiée par des études qui ont montré que des résultats supérieurs pouvaient être obtenus par l'administration de la quasi-totalité du sécrétome cellulaire par rapport à des fractions exosomales ou protéiques hautement purifiées (99,146–150).

2) Caractérisation du sécrétome issu de CPC

Conformément aux directives de la MISEV 2018 (106), les EV-CPC ont été caractérisées par des méthodes multiples et complémentaires.

Comme le montre la Figure 23, le NTA a identifié des particules dont la taille varie de 50 nm à 1000 nm et dont près de 85 % d'entre elles ont une taille inférieure à 200 nm les qualifiant de « petites vésicules » principalement exosomales et microvésiculaires si l'on considère les anciennes qualifications (décrites aux sections « Mécanismes paracrines » et « Biogenèse des VEs » Intro – XI. 1) et 2).

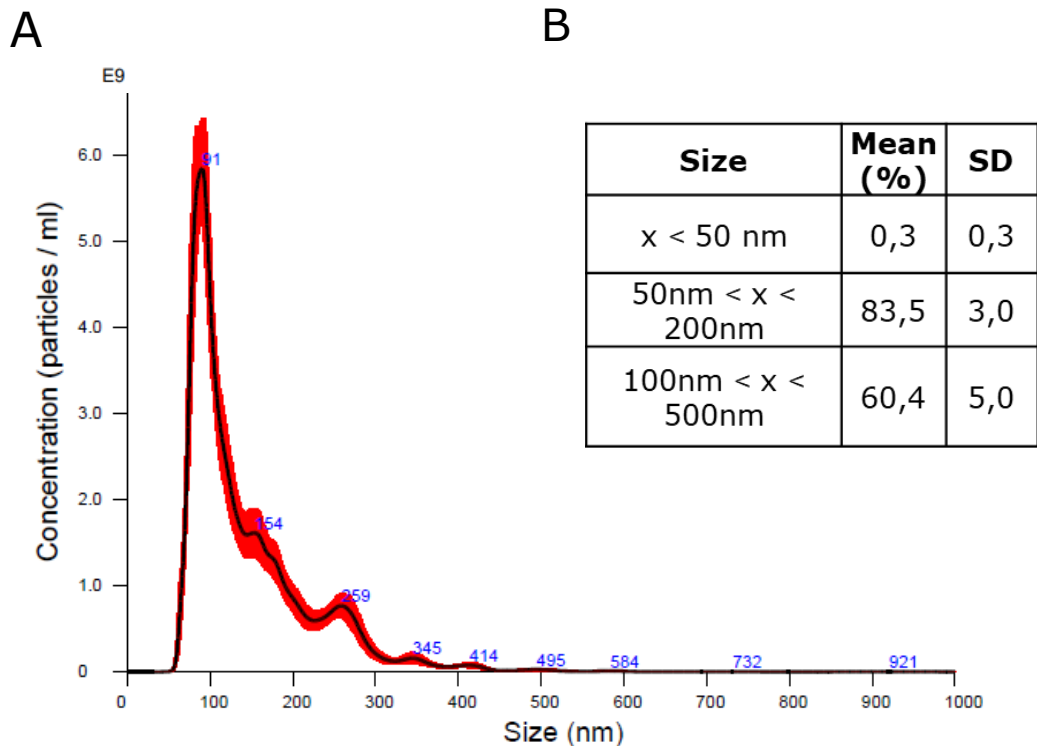


Figure 23 : Caractérisation du sécrétome EV-CPC en termes de distribution de taille des particules isolées par analyse NTA : (A) Apparence du spectre issu de la combinaison de 4 dilutions avec 5 mesures chacune, (B) Moyennes et écarts types des distributions de taille sur l'ensemble des productions d'EV-CPC
SD : écart-type

La cryoMET couplée à des immuno-marquages aux billes d'or a montré des agrégats de matériaux amorphes à l'échelle du micromillimètre et de grands fragments de membrane contenant des vésicules encapsulées. Les doubles membranes lipidiques des VEs sont résolues et le marquage a révélé que les VEs les plus petites (<100 nm) étaient densément CD81⁺ (Figure 24) et que 100% des VEs observées étaient phosphatidylsérine (PS⁺). La PS du feuillet externe est mise en évidence indirectement par sa liaison à des protéines (ici à l'Annexin V) et représente un témoin positif de la présence de VEs.

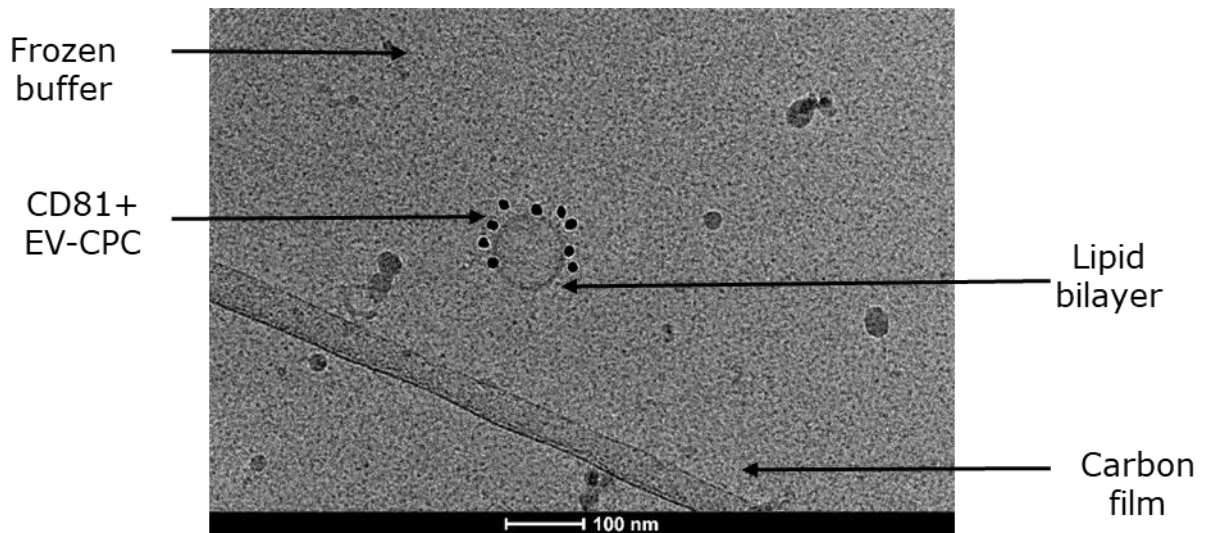


Figure 24 : Résolution cryoMET des doubles membranes lipidiques des EV-CPC et marquage CD81+ avec des nanobilles d'or. Échelle = 100µm.

La cytométrie en flux (Figure 25A) et l'analyse protéomique (Tableau 2) ont permis d'identifier, dans les préparations d'EV-CPC, des protéines clés transmembranaires ou ancrées au glycosylphosphatidylinositol : les VEs expriment des marqueurs de surface non spécifiques de tissus particuliers, comme les glycoprotéines membranaires associées aux lysosomes (LAMP1/2) et les protéines tétraspanines (clusters de différenciation CD9, CD63, CD81). La présence de ces protéines représente une caractéristique de tous les types de VEs dans le sens où elle démontre une bicouche lipidique dans le matériel analysé, qu'elle soit d'origine plasmatiche ou endosomale. La présence de la tétraspanine CD63 à la surface des EV-CPC a aussi été révélée de manière qualitative par ELISA sur des dilutions séquentielles de 10, 100 et 1000 ng/mL d'EV-CPC. Le même test a été réalisé sur le contrôle négatif VM-CPC et aucune présence de CD63 n'a été détectée (Figure 25B).

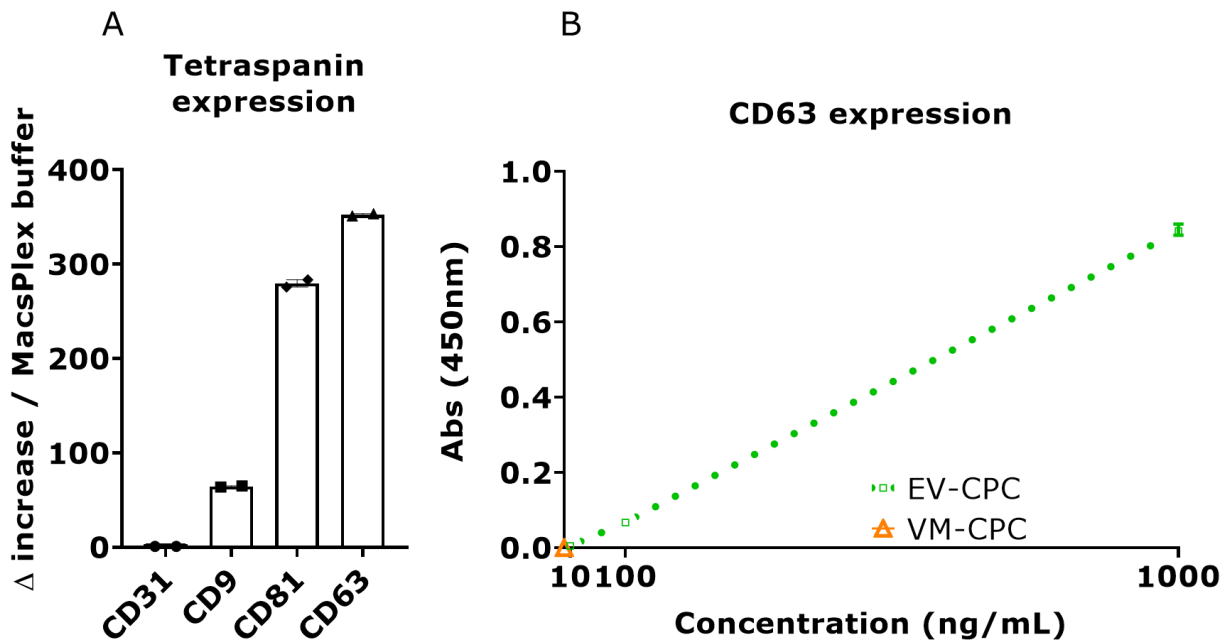


Figure 25 : Preuve protéique de la présence d'une bicouche lipidique dans les EV-CPC. (A) Détection en cytométrie en flux de l'expression des tétraspanines (CD9, CD63 et CD81) sur les EV-CPC (par rapport à un marqueur endothélial CD31 servant de témoin négatif, en duplicats techniques). (B) Détection ELISA de la tétraspanine CD63, en triplicats techniques, sur des concentrations en EV-CPC de 10 ng/mL, 100 ng/mL et 1000 ng/mL. (Médiane+/-IQR). *CD* : cluster de différenciation, *VM-CPC* : milieu vierge de culture des CPC ultrafiltré

Les analyses protéomiques ont aussi mis en lumière que les EV-CPC hébergent également des protéines cytosoliques ayant une capacité de liaison aux lipides ou aux protéines membranaires : protéine du gène de susceptibilité aux tumeurs 101 (TSG101), protéine de choc thermique (HSC70), protéine d'interaction 6 de mort cellulaire programmée (ALIX) et intégrines alpha et bêta (ITGB1/5 et ITGA2/3/5/6) (Tableau 2). La présence de la protéine de choc thermique HSC70 a aussi été mise en évidence par Western blot (Annexe Figure 2). La présence de ces protéines démontre que la bicouche lipidique des EV-CPC renferme du matériel intracellulaire.

	Gene & Synonyms	Mol percent (%)	MW (kDa)	Description
P21926	CD9,MIC3,TSPAN29,GIG2	0,0054	25,4	CD9 antigen
P08962	CD63,MLA1,TSPAN30	0,0079	25,6	CD63 antigen
P60033	CD81,TAPA1,TSPAN28	0,0300	25,8	CD81 antigen
P11279	LAMP1	0,0134	44,9	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1
P13473	LAMP2	0,0106	45	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2
Q99816	TSG101	0,0059	43,9	Tumor susceptibility gene 101 protein
P11142	HSPA8,HSC70,,HSPA10	0,4346	70,9	Heat shock cognate 71 kDa protein
Q8WUM4	PDCD6IP,AIP1,ALIX,	0,0159	96	Programmed cell death 6-interacting protein
P05556	ITGB1,FNRB,MDF2	0,0280	88,4	Integrin beta-1
P18084	ITGB5	0,0012	88,1	Integrin beta-5
P17301	ITGA2,CD49B	0,0052	129,3	Integrin alpha-2
P08648	ITGA5,FNRA	0,0052	114,5	Integrin alpha-5
P26006	ITGA3,MSK18	0,0036	116,6	Integrin alpha-3
P23229	ITGA6	0,0017	126,6	Integrin alpha-6

Tableau 2 : Preuve protéique de l'encapsulation de matériel intracellulaire dans les EV-CPC. Extrait de la quantification absolue de l'analyse protéomique

Le nombre médian de particules produites par chaque CPC est de 25.000 environ et la teneur médiane en protéines dans la suspension finale d'EV-CPC est de 140ug/mL.

3) Caractérisation du sécrétome issu d'un processus compatible avec les bonnes pratiques de fabrication

En vue d'un essai clinique de phase I testant la sécurité de VEs issues de CPC injectées par voie intraveineuse chez des patients présentant une dysfonction ventriculaire gauche non ischémique, mon rôle a été de réaliser une partie des études fonctionnelles non cliniques chez le petit animal. La transposition de nos recherches « de pailleasse » à la clinique s'est faite depuis plusieurs années en collaboration avec FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc, (FCDI), Madison, USA, en charge de la production des CPC cliniques,

et le Centre de thérapie cellulaire et génique de l'hôpital Saint Louis (MEARY, AP-HP Paris, France) auquel nous avons transféré une part de la technologie et qui a assuré la production d'un sécrétome de grade clinique. Bien que les cellules de grade clinique conservent un phénotype de CPC, elles sont différentes des CPC de grade recherche étudiées tout au long de ce manuscrit en ce sens qu'elles proviennent de lignée de CSPi différente, d'une méthode d'engagement cardiaque différente avec des milieux et des temps de culture différents. Il en est de même pour les vésicules dont la qualification à un grade clinique a nécessité de nombreuses adaptations des techniques de laboratoire qui ont été réalisées de façon successive. L'un des lots pré-cliniques préparé pour des raisons réglementaires a fait l'objet d'une étude fonctionnelle dans le modèle de cardiopathie à la doxorubicine chez le rat mis en place dans ce projet.

Des contrôles qualités et des études de sécurité, tant pour les cellules (caractérisation du phénotype de CPC, stabilité génétique au cours de la culture, taux résiduel de CSPi, viabilité cellulaire) que pour les vésicules obtenues (vérification de la stérilité, d'absence de mycoplasmes, d'endotoxines ou d'impuretés, pH, génotoxicité et osmolarité, études de toxicité et de tumorigénicité chez le petit animal, stabilité à long terme) ont été réalisés par nos partenaires et restent à ce jour confidentiels pour des raisons de propriété intellectuelle. Tous les tests nommés ont été réalisés pour les lots cliniques finaux et un sous ensemble de ces tests a été effectué sur les GMP-EV dans le cadre des cycles de développement du produit. Le produit final a également été caractérisé (présence de VEs selon les recommandations de la MISEV, contenu en cargos protéiques et en acides nucléiques) et a fait l'objet de tests de bio-activité *in vitro* (prolifération, cytotoxicité et viabilité cellulaires, modulation de l'angiogenèse et de la fibrose) et *in vivo* (sur des modèles animaux d'ischémie cardiaque et de cardiopathies dilatées) ; ces études non cliniques incluent celle chez le rat décrite dans ce projet.

4) Bio-activité des EV-CPC et GMP-EV

Des tests de bio-activité effectués en routine au laboratoire servent à vérifier la qualité fonctionnelle de chaque lot de VEs. Pour les EV-CPC

l'évaluation se fait sur un test de cicatrisation et en moyenne, les EV-CPC sont capables d'induire une recolonisation de la cicatrice par prolifération et migration d'hUVECs de 30 % par rapport aux puits traités par le milieu pauvre seul (Figure 26 A).

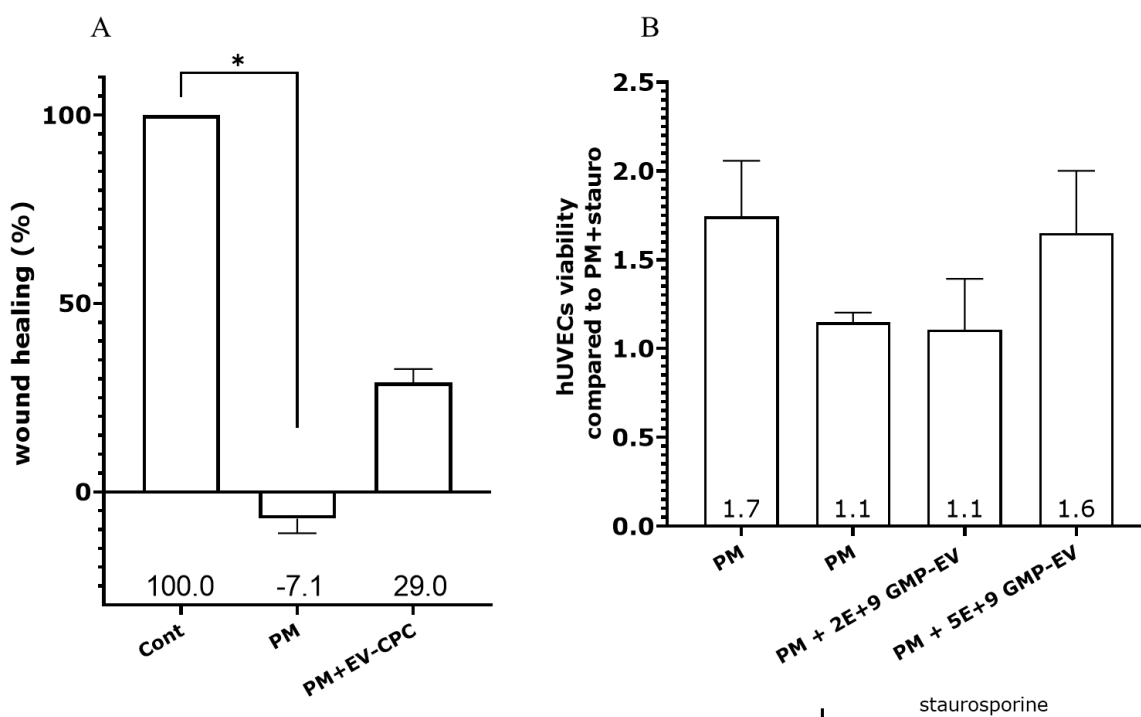


Figure 26 : Bio-activité des EV-CPC et GMP-EV : (A) Pourcentage de recolonisation d'une cicatrice créée sur un tapis d'hUVECS par les cellules traitées aux EV-CPC (Median+/-IQR) ; (B) Viabilité cellulaire après induction de la mort cellulaire par la staurosporine sur une culture d'hUVECS traités aux GMP-EV. Les résultats sont exprimés normalisés par rapport à la moyenne des réplicats scientifiques du contrôle négatif (PM) fixée à 1 (Median+/-IQR).

** $p \leq 0,01$. Cont : milieu des hUVECS ; EV-CPC : vésicules extracellulaires dérivées de cellules progénitrices cardiaques ; GMP-EV : vésicules extracellulaires dérivées de cellules progénitrices cardiaques préparées selon des protocoles compatibles avec une production BPF, PM : milieu pauvre

De façon similaire, les GMP-EV sont capables de réduire la mort cellulaire d'hUVECS traités par la staurosporine de façon dose dépendante, jusqu'à 60 % pour les puits traités par 5^E+9 GMP-EV (Figure 26 B).

II. Effet des EV-CPC sur le métabolisme énergétique de cardiomyocytes humains

1) Rationnel

L'objectif a été la mise au point d'un modèle cellulaire permettant de tester l'effet des VEs produites par des CPC et de caractériser les voies de

signalisation sur lesquelles ces dernières sont susceptibles d'agir. Pour cela, nous avons utilisé plusieurs types cellulaires (lignée de cardio-myoblastes de rat H9C2, lignée de cardiomyocytes humains immortalisés AC16 et cardiomyocytes humains différenciés à partir de CSPi), plusieurs doses de DOX, plusieurs modalités de stress (expositions unique ou séquentielle des cellules à la drogue), plusieurs temps d'administration du traitement par les VEs ainsi que différents biomarqueurs des principales anomalies cytotoxiques et cytostatiques chimio-induites : mesure de la survie cellulaire par comptage des cellules vivantes et apoptotiques (Bleu Trypan et Annexin V), évaluation des lésions cellulaires (dosage de troponine dans les surnageants de culture et test MTT), évaluation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (par cytométrie en flux), évaluation de la cytotoxicité (dosage de lactate déshydrogénase dans les surnageants cellulaires).

Ces essais ont mené au développement d'un test de mesure de l'activité mitochondriale sur des cardiomyocytes dont le protocole a été dicté par plusieurs assumptions :

- Pour que les tests *in vitro* soient le plus représentatif des schémas thérapeutiques cliniques, ils doivent être réalisés sur des cellules humaines suivant des protocoles de cumulation de doses induites par des expositions répétées à la drogue,
- La lecture de la toxicité doit se faire « à distance de l'exposition » et, compte tenu de la complexité des mécanismes cardio-toxiques, doit être à la fois spécifique d'une anomalie chimio-induite mais aussi le plus simple possible pour constituer un contrôles-qualité facile à standardiser,
- Pour être efficace le traitement doit être répété.

2) Les EV-CPC restaurent une partie de la capacité de production d'énergie des cardiomyocytes traités à la DOX

La caractérisation des CM par cytométrie en flux a permis de confirmer qu'ils exprimaient des marqueurs de différenciation cardiaque à un stade avancé

(α MHC, cTNT). Les marqueurs typiques des stades progéniteurs (ISL-11, GATA4) ne sont que légèrement exprimés tandis que des marqueurs de pluripotence (NANOG, SOX2) n'étaient plus détectables par comparaison avec les prototype-BPF-CPC et des CSPi en culture (Figure 27).

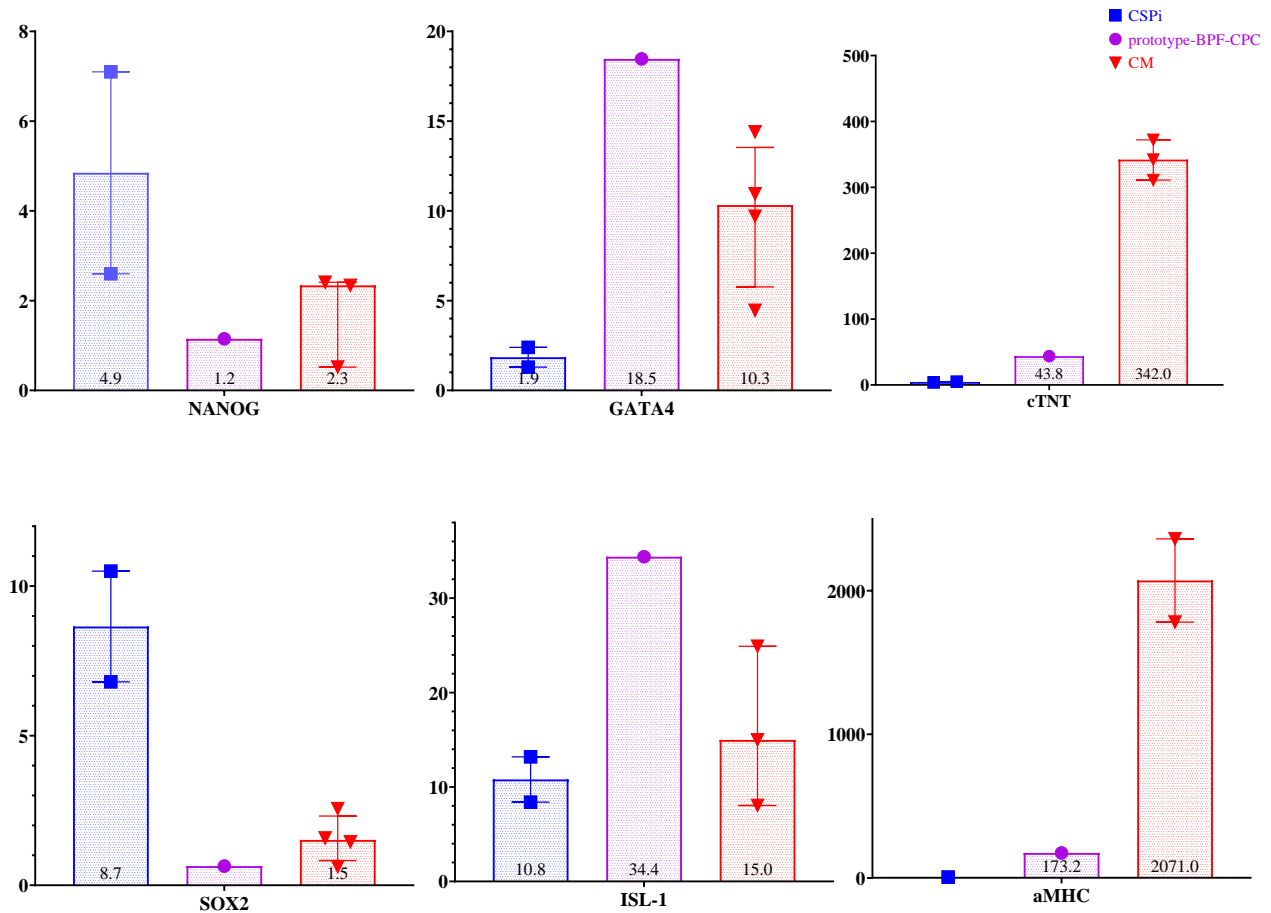


Figure 27 : Caractérisation phénotypique des CM par cytométrie en flux. Les cardiomyocytes expriment des marqueurs de différenciation cardiaque à un stade avancé (α MHC, Troponine cardiaque T) plus que ceux typiques d'un stade progéniteur (Islet1, Gata4) alors que les marqueurs de pluripotence (Nanog, Sox2) ne sont plus détectables par rapport au prototype-BPF-CPC et aux CSPi. (Median+/-IQR).

iPSC : cellules souches pluripotentes induites, prototype-BPF-CPC : Cellules progénitrices cardiaques fabriquées dans une suite BPF avec des méthodes, des matériaux et des réactifs compatibles BPF à l'échelle de fabrication clinique d'une Phase 1, CM : iCell cardiomyocytes, NANOG : Homeobox Transcription Factor Nanog, SOX2 : SRY-Box transcription factor 2, GATA4 : GATA binding protein 4, ISL-1 : Insulin gene enhancer protein 1, cTNT : cardiac troponin T, α MHC : Myosin Heavy Chain alpha

L'expression de la troponine I cardiaque a également été vérifiée par immunofluorescence (Figure 28).

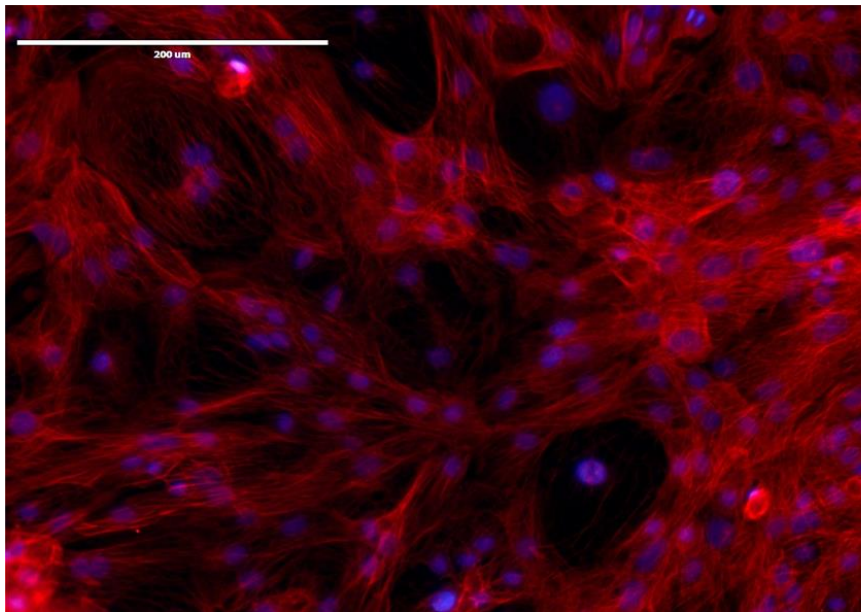


Figure 28 : Caractérisation phénotypique des CM par immunofluorescence. Les CM ont été marqués pour la troponine I cardiaque et contre-marqués au DAPI. Les images ont été acquises au microscope à fluorescence inversée FL EVOS™ (objectif X10) et fusionnées avec le logiciel ImageJ. Échelle = 200μm

Au jour 6 (D6), à la fin de l'exposition à la DOX, la teneur en ATP a diminué de 50 % comparé aux cellules contrôles non traitées (Figure 29 A). Ce défaut en ATP se maintient dans le temps (Figure 29 B) même après la fin de l'exposition à la DOX et ce jusqu'à la fin de l'expérience au jour 10 (D10) (Figure 29 C).

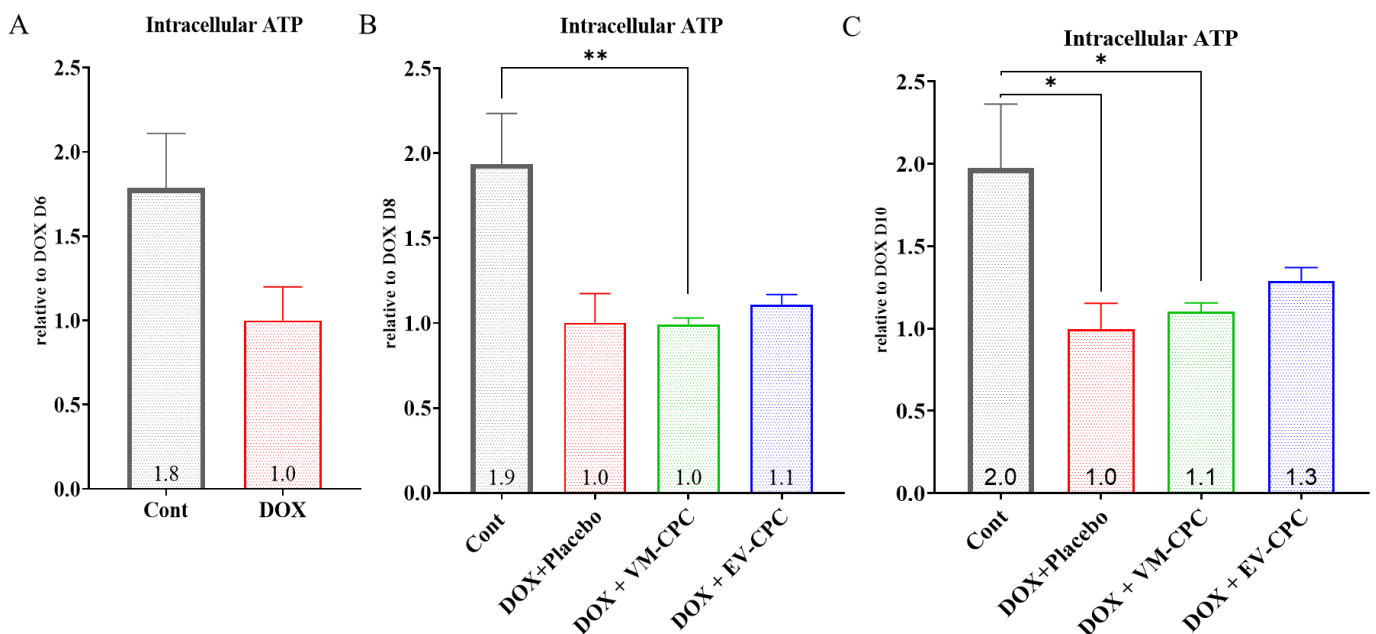


Figure 29 : Concentration d'ATP intracellulaire (A) au jour 6, (B) au jour 8 et (C) au jour 10. Les résultats sont exprimés à chaque jour de mesure, normalisés par rapport à la moyenne des réplicats scientifiques du contrôle négatif (Dox+placebo) fixée à 1. Moyenne +/- SEM (n=5 en triplicats techniques) ; *p≤0,05 ; **p≤0,01. Cont : milieu des CM ; DOX : doxorubicine, EV-CPC : vésicules extracellulaires dérivées de cellules progénitrices cardiaques ; VM-CPC : milieu vierge des CPC ; ATP : Adénosine Triphosphate

Cette déficience énergétique est confirmée aux jours 6 et 8 (D6, D8) par la lecture de la respiration basale des cellules (via la mesure de la consommation en oxygène), de la respiration couplée à la production d'ATP et de la glycolyse (Figure 30 A-C). Les cellules stressées à la DOX présentent donc un défaut global de la production d'énergie sans compensation permise par une flexibilité métabolique vers les voies secondaires de production d'énergie comme la glycolyse.

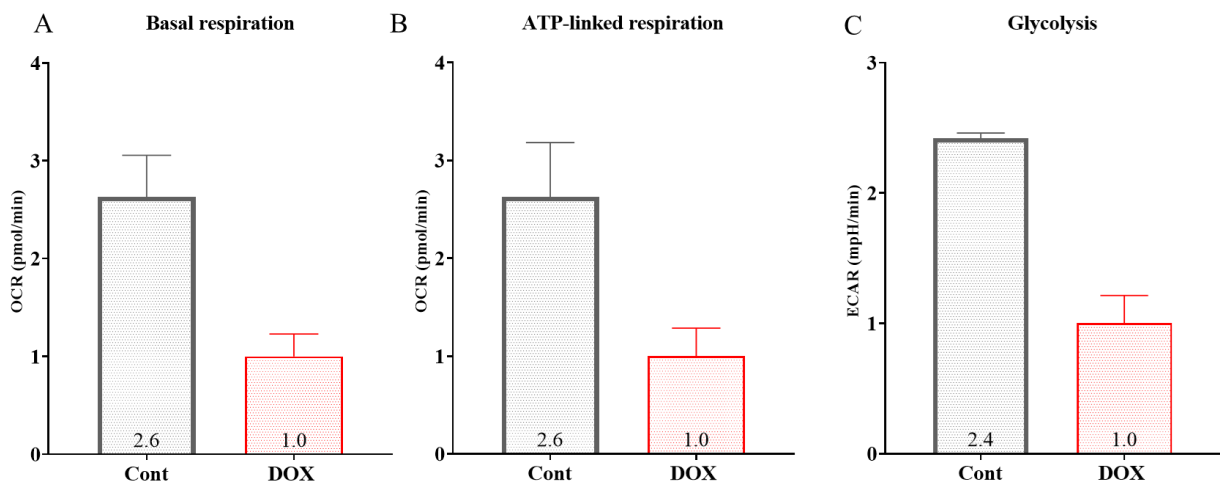


Figure 30 : Consommation en oxygène et acidification du milieu au jour 6. Au jour 6, la consommation en oxygène (A) basale, (B) couplée à la production d'ATP et (C) la glycolyse sont impactées négativement par la DOX. Les résultats sont exprimés normalisés par rapport à la moyenne des réplicats scientifiques du contrôle négatif (DOX) fixée à 1. (Moyenne +/- SEM) (n=3 en triplicats techniques). OCR : taux de consommation en oxygène, ECAR : Taux d'acidification extracellulaire

Une exposition unique aux EV-CPC semble augmenter, de façon non significative, la production d'ATP (Figure 29 B) des CM stressés par la DOX en augmentant l'activité des voies métaboliques de phosphorylation oxydative et de glycolyse (Figure 31 A-C) au jour 8.

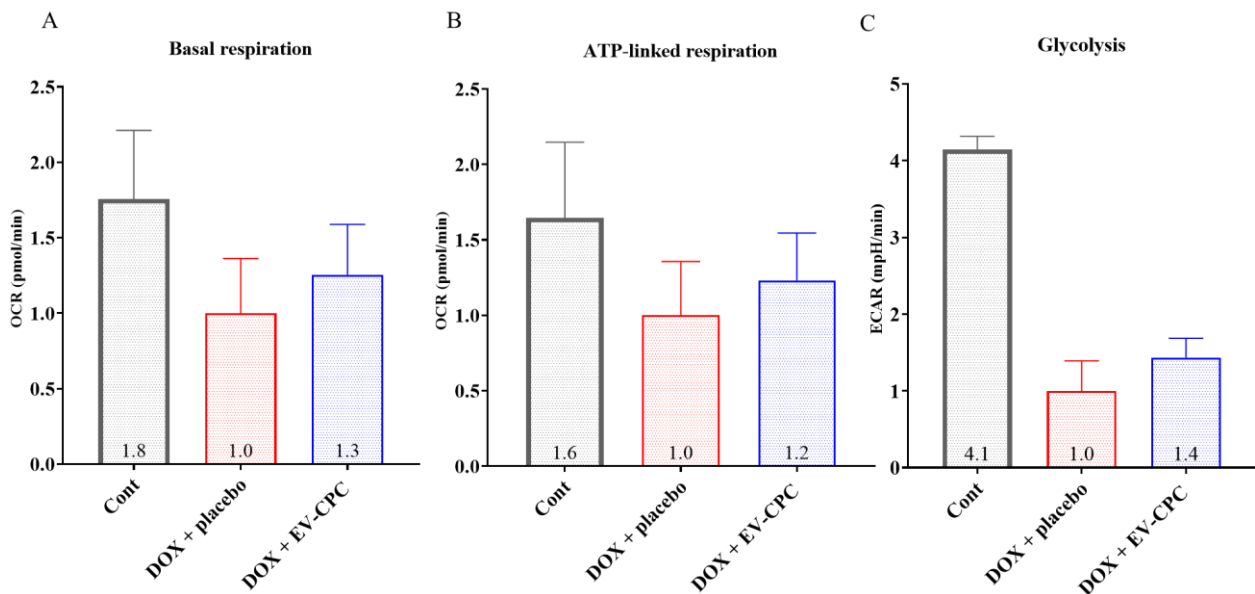


Figure 31 : Consommation en oxygène et acidification du milieu au jour 8. Au jour 8, une exposition unique aux EV-CPC semble augmenter, de façon non significative, la consommation en oxygène (A) basale, (B) couplée à la production d'ATP et (C) la glycolyse. Les résultats sont exprimés normalisés par rapport à la moyenne des réplicats scientifiques du contrôle négatif (DOX+placebo) fixée à 1. (Moyenne +/- SEM) (n=3 en triplicats techniques).
OCR : taux de consommation en oxygène, ECAR : Taux d'acidification extracellulaire

Une administration répétée de VEs restaure partiellement les niveaux intracellulaires d'ATP de 30 % par rapport aux cellules recevant le placebo au jour 10 (Figure 29 C). En effet, alors que l'administration du placebo ou du milieu vierge des CPC entraîne une baisse statistiquement significative des niveaux d'ATP par rapport au contrôle ($p=0,0446$ et $p=0,0231$ respectivement), ce n'est pas le cas lorsque les cellules sont traitées par les EV-CPC (indice de taille de l'effet d de Cohen=1,1) (Figure 29 C).

III. Mise en place d'un modèle chronique de cardiopathie aux anthracyclines chez la souris et évaluation du bénéfice fonctionnel du traitement par les EV-CPC

1) Rationnel

L'objectif principal a été la mise au point du modèle de cardiomyopathie induite par la DOX chez la souris. Initialement, un protocole d'induction par expositions répétées à la DOX, constitué de 5 injections intra-péritonéales

de DOX à raison d'une par semaine aboutissant à une dose cumulée de 25 mg/kg chez des souris BL6j femelles âgées de 8 semaines, a été retenu après plusieurs essais (85 souris ont été nécessaires pour finaliser ce schéma thérapeutique). Ce protocole a permis de mettre en évidence une détérioration de la fonction ventriculaire gauche entre le début du traitement par la drogue, semaine 0, et la fin de l'étude en semaine 16. Cependant, sur la base des critères échocardiographiques habituels (fraction d'éjection en mode bidimensionnel et fraction de raccourcissement en mode motion) et par comparaison avec une évaluation en fin de l'étude par l'imagerie par résonance magnétique (IRM), les résultats étaient inconstants. Sur ce modèle, l'injection des VEs par la veine de la queue (2 injections à raison d'une par semaine, en semaines 8 et 9 après la première injection de DOX, dose totale de 20^{E+9} particules) a eu comme principal effet une augmentation de la masse myocardique chez les souris traitées par les VEs par rapport à celles injectées avec le placebo. Cependant, la discordance entre les résultats de l'échocardiographie et ceux de l'IRM nous ont conduits à revisiter ce protocole en lui apportant cinq types de modifications: le passage à une souche de souris décrite comme étant plus sensible à la DOX (BALB/cJRj) ; le raccourcissement du protocole avec 3 administrations de la drogue sur 2 semaines réalisant une dose cumulée de 12 mg/kg; l'utilisation de la voie d'injection rétro-orbitaire pour administrer les VEs ; l'augmentation de la dose totale à 30^{E+9} particules par souris ; et le recours à une DOX de grade clinique pour une meilleure assurance de la qualité et de la concentration de la drogue.

2) Validation du modèle

Parmi les 76 souris initialement incluses, 7 sont décédées au cours du traitement DOX, avant toute injection du traitement. Les 69 survivantes ont ensuite été réparties soit dans un groupe placebo, soit dans un groupe injecté avec des EV-CPC (n=39 et n=30, respectivement). Quarante-quatre de ces souris ont ensuite été euthanasiées au cours de la période d'étude parce qu'elles avaient atteint les points limites établis pour l'étude, laissant 14 souris traitées par administration du placebo et 11 souris traitées par les EV-CPC à la fin de l'étude (Figure 32 A).

Ce taux de mortalité élevé reflète la sévérité du régime d'induction par la DOX qui se manifeste clairement par une détérioration de l'état clinique des souris, encore plus rapide quand les souris ont reçu une injection de placebo (Figure 32 B).

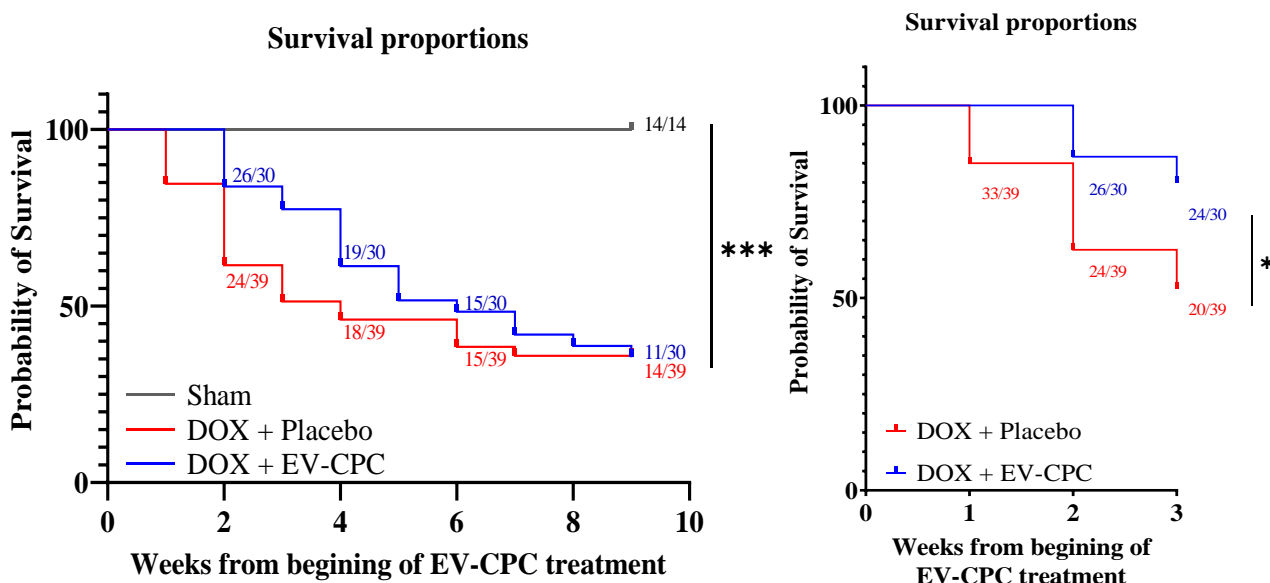


Figure 32 : Courbes de survie Kaplan Meier avec test d'analyse du Log rank : 14 souris ont été sham-injectées (sans DOX) et 76 souris ont reçu une injection de DOX. Parmi elles, 7 ont été exclues en raison d'une détérioration de leur état clinique, 39 reçu le placebo et 30, les EV-CPC. En fin d'étude, les effectifs sont : Sham : n=14 ; DOX+Placebo : n=14, DOX+EV-CPC : n=11. *p≤0,05. ***p≤0,001

A la fin de l'étude, les souris présentent une baisse significative du strain global longitudinal SLG (Figure 33 A) et de la masse diastolique (Figures 33 B et 33 C) par rapport aux animaux Sham.

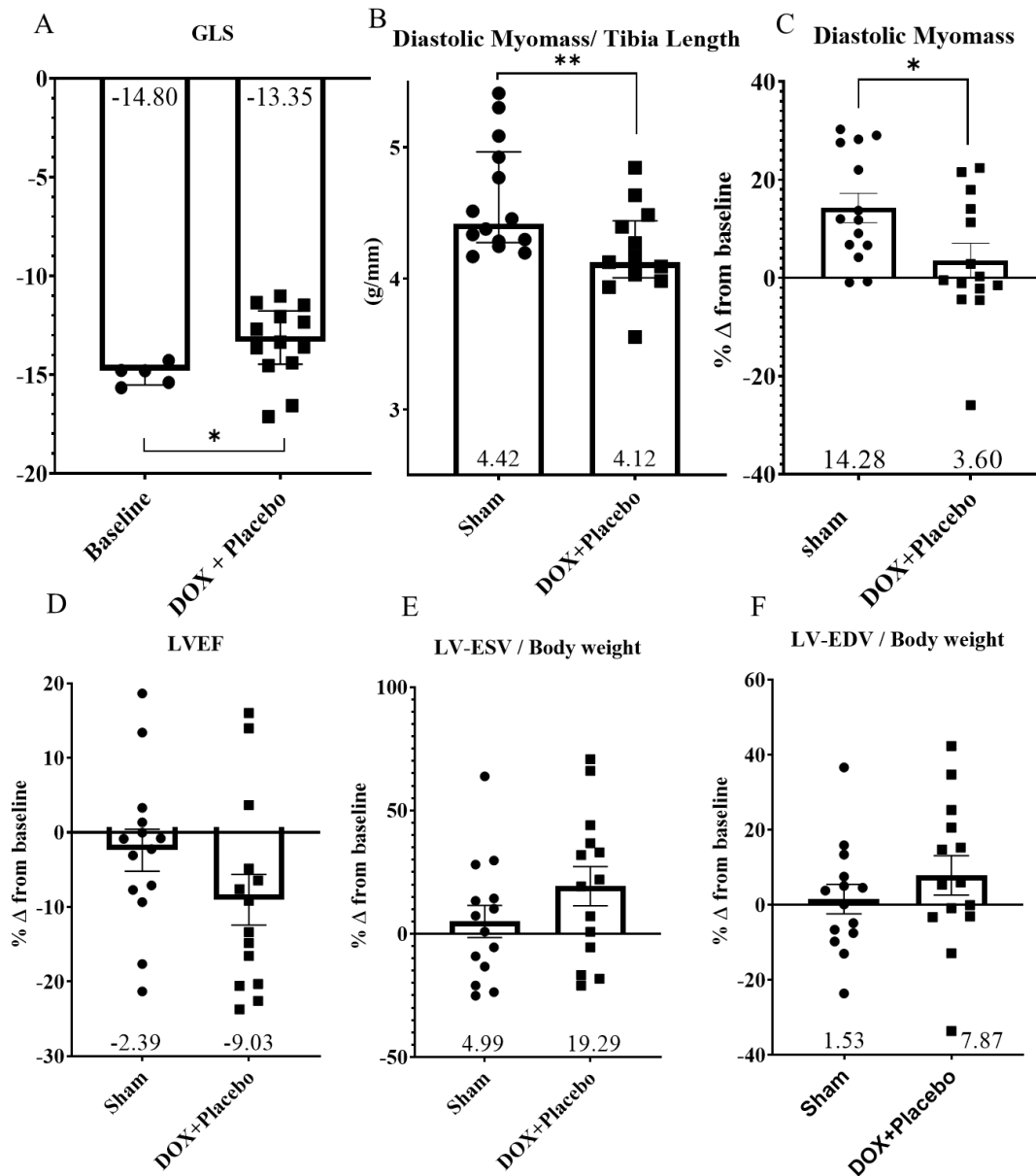


Figure 33 : Validation du modèle murin de cardiomyopathie induite par la DOX. (A) Valeurs absolues (médiane+/-IQR) de SLG, mesurées par IRM (des valeurs moins négatives indiquent une fonction contractile moins bonne). (B) Valeur absolue de la myo-masse diastolique par rapport à la longueur du tibia (médiane+/-IQR) ou (C) exprimée en pourcentage de changement par rapport aux valeurs basales (moyenne+/-SEM) mesurée par IRM. (D) FEVG en pourcentage de changement par rapport aux valeurs basales (moyenne +/- SEM). (E) VTS et (F) VTD normalisés au poids corporel en pourcentage de changement par rapport aux valeurs basales (moyenne+/-SEM). Sham : n=14 ; DOX+Placebo : n=14. Les valeurs basales (Baseline, dans la Figure) se réfèrent à des souris saines non traitées (n=5) évaluées au tout début du protocole. *p≤0,05 ; **p≤0,01. GLS : strain longitudinal global (%), Myomass : masse musculaire diastolique, LVESV/LVEDV : fonction ventriculaire gauche télésystolique/télédiastolique (%), LVEF : fraction d'éjection ventriculaire gauche (%)

Par ailleurs, il existe une tendance constante à la dilatation ventriculaire gauche reflétée par l'augmentation des volumes télésystoliques et

télédiastoliques (Figure 33 E-F) par rapport aux valeurs de base (enregistrées au tout début du protocole chez des souris saines), ce qui est cohérent avec la réduction de la FEVG illustrée à la Figure 33 D.

Les électrocardiogrammes montrent aussi un allongement de l'intervalle QTc (Figure 34 A) qui traduit une dépolarisation ventriculaire gauche plus lente induisant une contraction systolique moins efficace (151).

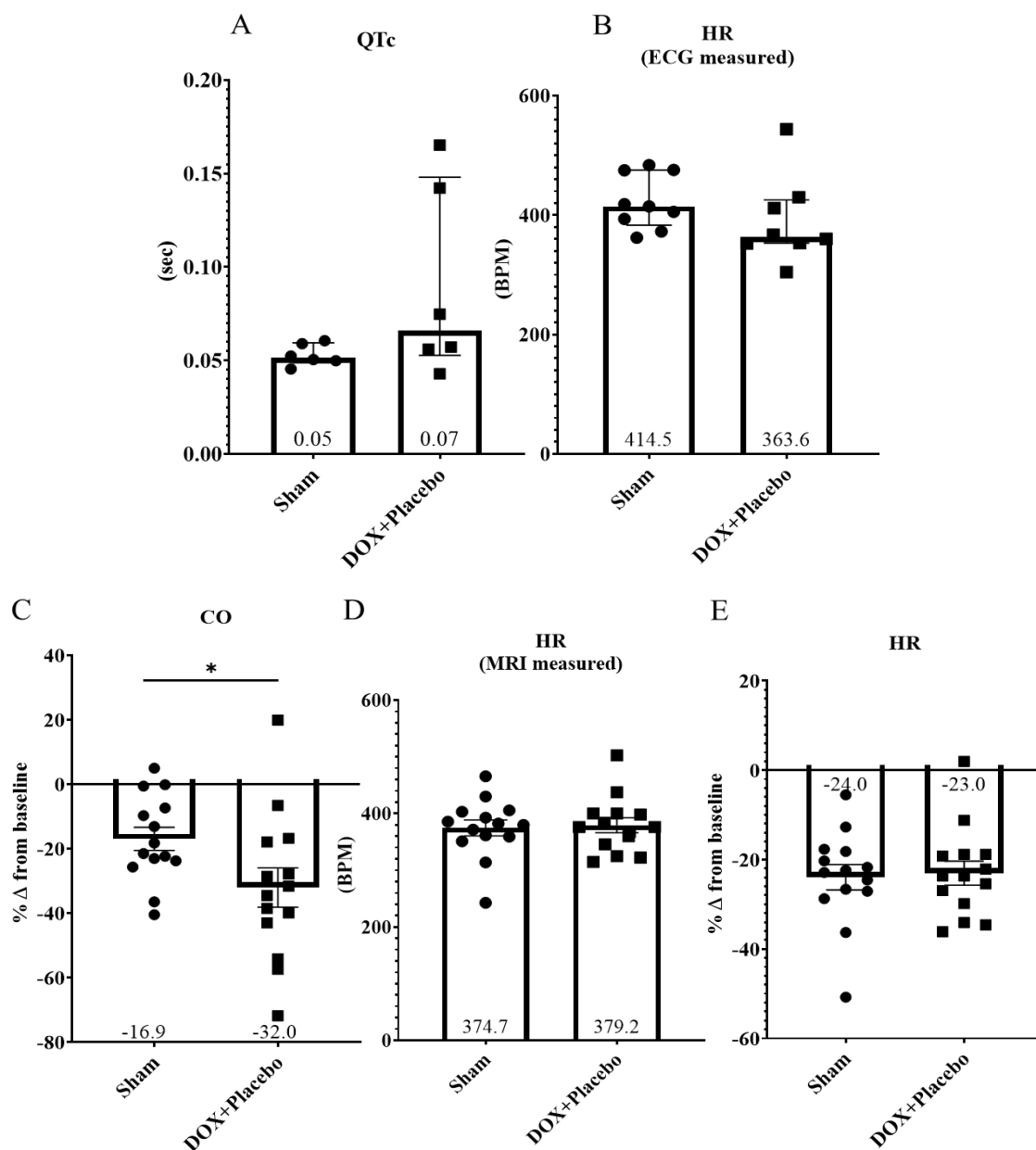


Figure 34 : Effet de la DOX sur l'activité cardiaque électrique et le débit cardiaque. (A) Évaluation sous-cutanée de la longueur de la systole ventriculaire par analyse de l'électrocardiogramme (longueur QT corrigée par la fréquence cardiaque) et (B) Fréquence cardiaque (Sham : n=6 ; DOX : n=6) (médiane+/- IQR) ; Évaluation IRM des paramètres cardiaques (Moyenne+/-SEM) ; (C) Débit cardiaque et (D) Fréquence cardiaque en valeurs absolues ou (E) en pourcentage de variation par rapport aux valeurs basales (Sham : n=14 ; DOX : n=14) *p ≤0,05. QTc : longueur du segment QT corrigée par la PC (sec) ; FC : fréquence cardiaque (BPM), CO : débit cardiaque

Ces résultats sont en accord avec la chute du débit cardiaque (Figure 34 C) alors que la fréquence cardiaque est conservée chez les animaux DOX par rapport aux sham en fin d'étude (Figure 34 B et D) ou par rapport aux valeurs de base (Figure 34 E).

Il convient de noter que lorsque les paramètres volumétriques ont également été calculés en incluant les muscles papillaires dans la segmentation du diamètre interne, des tendances similaires ont été observées (Annexe Figure 3).

Cependant, bien que la DOX ait également causé des dommages au foie (Figure 35 A), les souris traitées ne présentent pas d'œdème pulmonaire

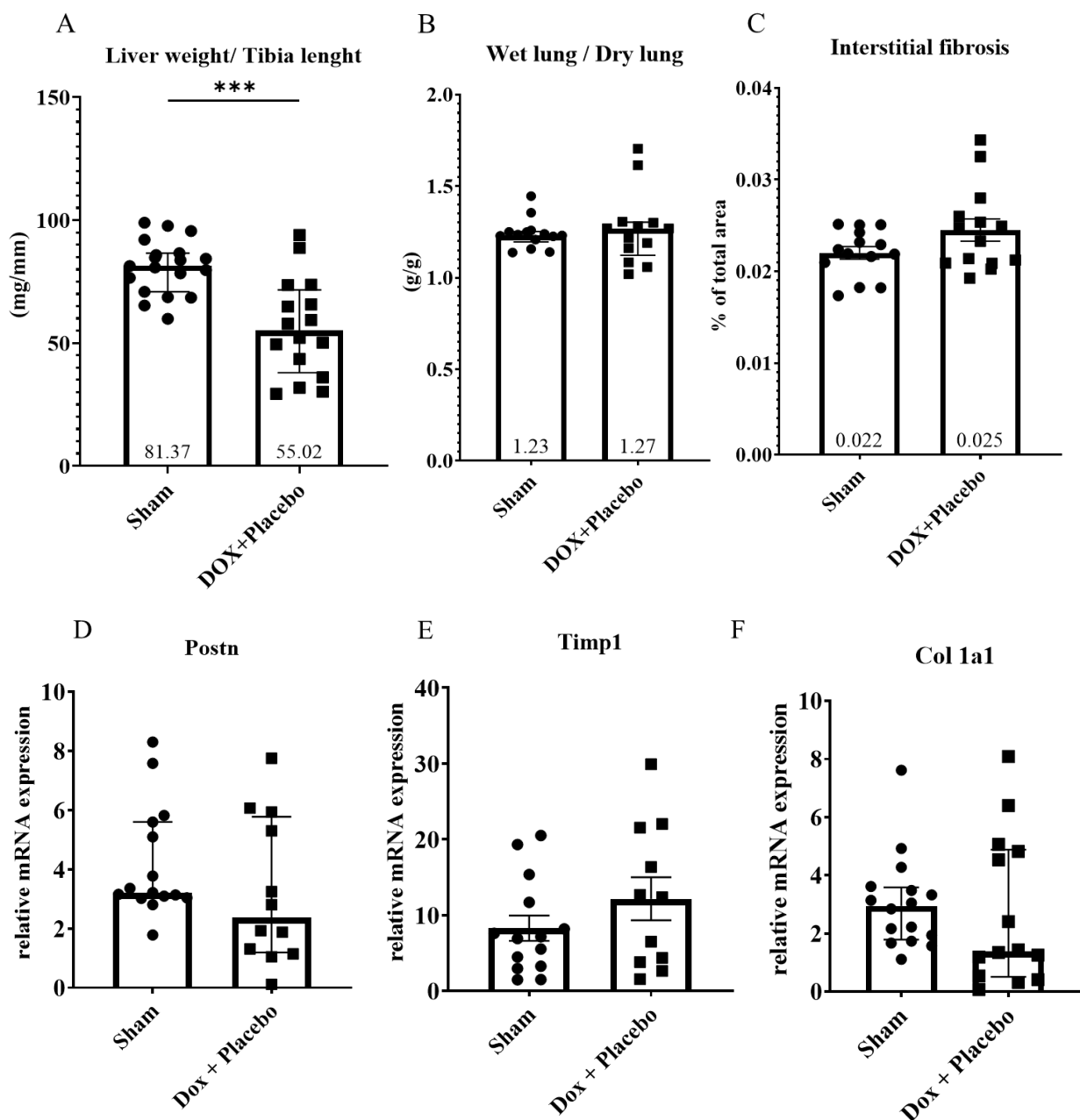


Figure 35 : Validation du modèle de cardiopathie à la DOX chez la souris. (A) Effets hépatiques hors cibles de la DOX (médiane+/-IQR), (B) Œdème pulmonaire (médiane+/-IQR), (Sham : n=14 ; DOX : n=14) ; (C) Pourcentage de fibrose interstitielle sur la surface totale du cœur (Sirius Red) (Moyenne +/-SEM), (D, E, F) expression relative de l'ARNm des gènes activés par la fibrose par rapport à l'expression constitutive de HPRT. *** $p \leq 0,001$. *Timp1* : inhibiteur de métallopeptidase 1 (moyenne+/-SEM), *Col1a1* : chaîne alpha 1 de collagène de type I (médiane+/-IQR), *Postn* : périostine (médiane+/-IQR)

(Figure 35 B) ni de fibrose interstitielle (Figure 35 C à F), suggérant ainsi que notre protocole capture un stade précoce de dysfonctionnement ventriculaire précédant la survenue de lésions irréversibles.

3) Les EV-CPC améliorent la contractilité myocardique des cœurs de souris traités à la DOX

En fin d'étude, le bénéfice thérapeutique des EV-CPC a été démontré par trois observations principales :

(1) Les EV-CPC ont considérablement amélioré le taux de survie des souris précocement au cours du suivi par rapport aux contrôles injectés par le placebo même si les courbes ont ensuite eu tendance à fusionner, probablement en raison de la progression de la maladie induite par la DOX (Figure 32 A et B).

(2) Alors que les cœurs DOX + placebo ont subi une baisse significative du SC basal (global, endocardique et épicaudique) par rapport aux souris sham ($p=0,043$, $p=0,048$, $p=0,042$ respectivement), les injections d'EV-CPC préservent ces indices qui ne diffèrent pas significativement de ceux enregistrés chez les sham (indice de taille de l'effet d de Cohen=0,4 pour chacun) (Figure 36 A à C). Des changements de même tendance ont été observés pour le SLG (Figure 36 D). De plus, si l'on fixe à -15 % le seuil sous lequel (valeurs plus négatives) une baisse du SLG devient cliniquement pertinente car prédictive d'un dysfonctionnement du ventricule gauche, comme le recommandent les experts de la Société Américaine de l'Echographie et l'Association Européenne de l'Imagerie Cardiovasculaire (37,38), on observe deux fois plus de souris ayant reçu un placebo dans ce sous-groupe que de souris traitées par les EV-CPC (indice de taille de l'effet d de Cohen=0,4).

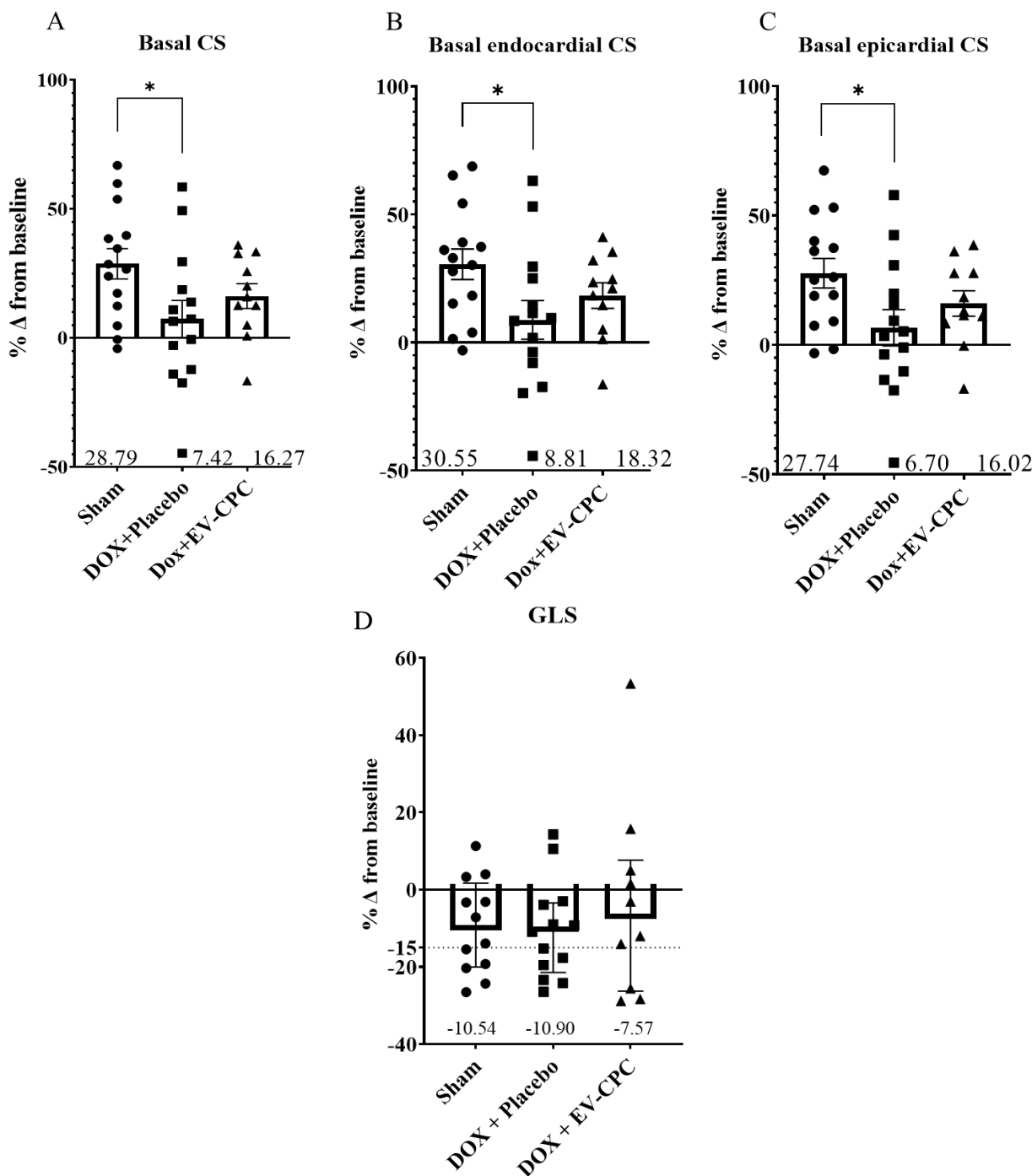


Figure 36 : Évaluation IRM des paramètres cardiaques chez la souris: SC mesuré par IRM (Moyenne+/-SEM) aux niveaux (A) basal global, (B) basal endocardique et (C) basal épicaudique et exprimé en pourcentage de variation par rapport aux valeurs basales (une valeur positive indique une meilleure fonction).

Sham: n=14; DOX+Placebo: n=14, DOX+EV-CPC: n=11. *p≤0,05

(D) SLG en pourcentage de variation par rapport aux valeurs basales. (Médian+/-IQR). Six souris DOX+Placebo sur 13 (43 %) sont sous le seuil de -15 % qui définit le déclin cliniquement pertinent du SLG prédictif du dysfonctionnement du ventricule gauche alors que seulement 3 souris DOX+EV-CPC sur 10 (30 %) sont sous ce seuil (Sham : n=12 ; DOX+Placebo : n=13, DOX+EV-CPC : n=10).

CS : strain circonférentiel, GLS : Strain longitudinal global

(3) Le traitement par les EV-CPC tend aussi à maintenir l'expression basale de gènes impliqués dans le remodelage cardiaque et les mécanismes de compensation qui sont en revanche augmentés par la DOX. Plus particulièrement, les protéines encodées par ces gènes sont la Galectine 3 (Gal3), produite principalement par les fibroblastes cardiaques et les macrophages activés et décrite comme un biomarqueur de l'insuffisance cardiaque compte tenu de sa forte implication dans la fibrose inadaptée et les réponses inflammatoires conduisant à la décompensation ; CCN2 (Cellular Communication Network Factor 2) qui, lorsqu'il est produit par un fibroblaste, est une molécule pro-fibrotique dont l'expression est perturbée précocement dans les maladies à pathogenèse fibrotique ; NPPA (Atrial Natriuretic Peptide), connu pour jouer un rôle critique dans la surcharge hémodynamique ; Myh7 (Myosin Heavy Chain 7) qui signe la réintroduction d'un phénotype fœtal via la forte expression du gène qui a une faible capacité d'hydrolyse de l'ATP au détriment de la Myh6 (Myosin Heavy Chain 6) et précède le remodelage hypertrophique.

Le traitement par les EV-CPC modère ainsi les réponses adaptatives contribuant à un remodelage délétère et au dysfonctionnement systolique consécutif et qui sont régulées à la hausse par la DOX (Figure 37 A à D) (indice de taille de l'effet d de Cohen=0,3, 0,2, 0,8 et 0,2 pour Gal3, CCN2, NPPA et Myh6/Myh7, respectivement).

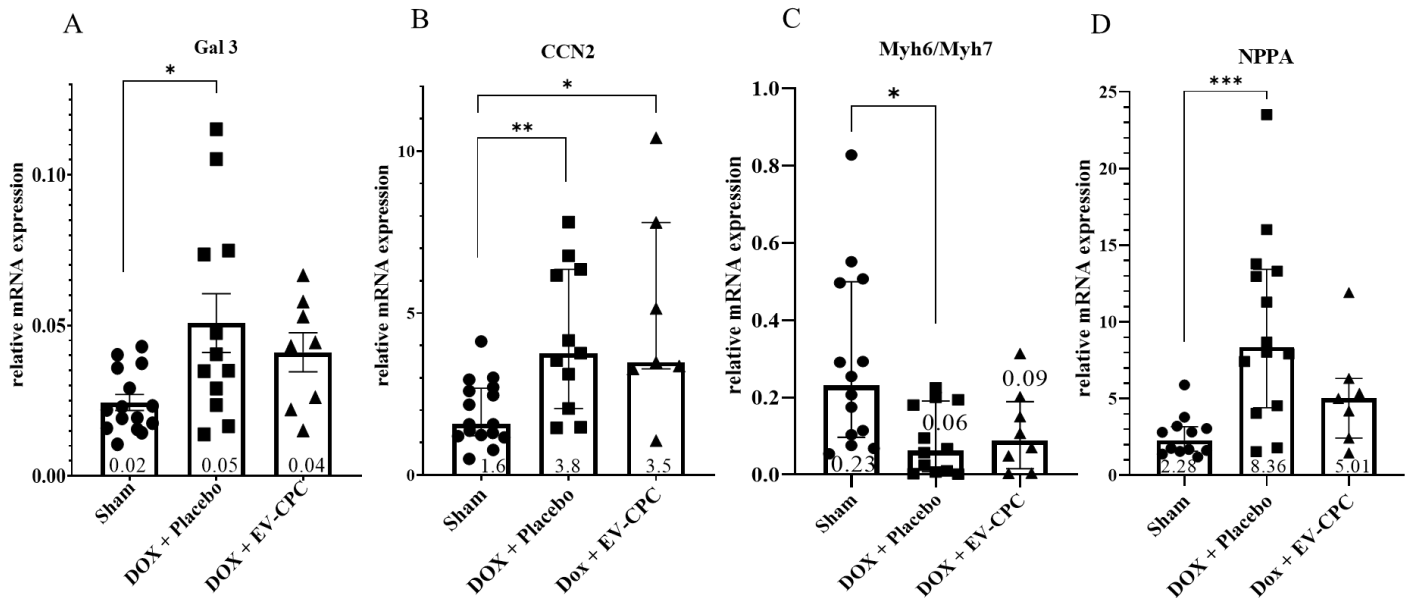


Figure 37 : Expression relative dans les cœurs de souris de l'ARNm Gal3 (A ; Moyenne+/-SEM), CCN2 (B ; Médiane+/-IQR), Myh6/Myh7 (C ; Médiane+/-IQR) et NPPA (D ; Médiane+/-IQR). Ces données intègrent une série supplémentaire d'animaux Sham et DOX+placebo exclusivement utilisés pour l'évaluation par PCR. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. Gal 3 : galectine 3, CCN2 : facteur 2 du réseau de communication cellulaire, rapport Myh6/Myh7 : chaîne lourde de myosine α /chaîne lourde de myosine β , NPPA : peptide natriurétique auriculaire

IV. Mise en place d'un modèle de cardiopathie aux anthracyclines chez le rat et évaluation du bénéfice fonctionnel du traitement par les GMP-EV

1) Validation du modèle

Pour compléter les données précédentes et évaluer les effets des injections IV répétées de GMP-EV dans un modèle plus aigu et chez une espèce animale différente, nous avons soumis des rats à des injections séquentielles de DOX.

Parmi les 27 initialement inclus, 4 ont été euthanasiés pour atteinte des points limites avant la fin de l'étude, laissant ainsi 6 animaux sham, 11 animaux ayant reçu le placebo et 12 ayant reçu des injections de GMP-EV en fin d'étude.

Ce protocole court a induit un dysfonctionnement du ventricule gauche caractérisé par une diminution de la FEVG (Figure 38 A), une altération de la compliance ventriculaire (évaluée par le rapport pression diastolique/VTD) sans élévation notable de la pression artérielle (Figure 38

B-C) et une dépolarisation du VG plus lente (Figure 38 D). L'altération de la compliance ventriculaire est caractéristique des cardiomyopathies dilatées dans lesquelles le ventricule se dilate sans élévation appréciable associée de la pression diastolique. De plus, depuis la dernière injection de DOX jusqu'à la fin de l'étude, chaque rat ayant reçu une injection de DOX a développé une ascite abdominale, témoin d'une insuffisance cardiaque.

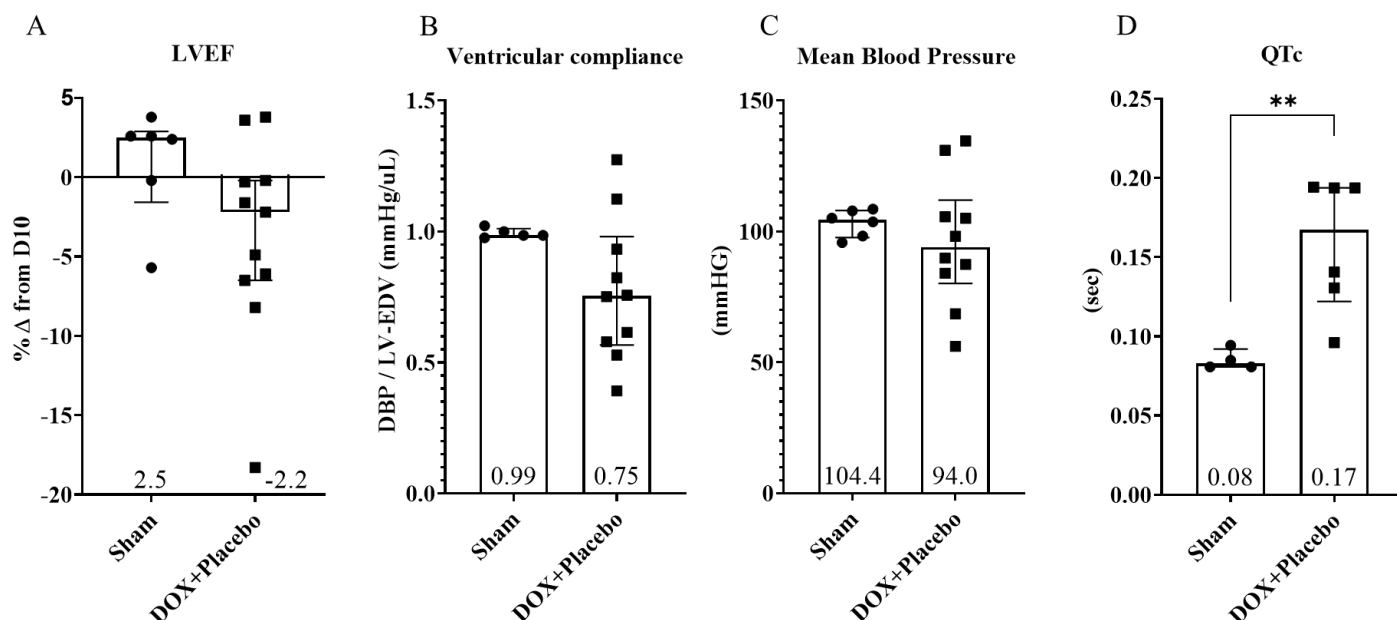


Figure 38 : Validation du modèle de cardiomyopathie induite par la DOX chez le rat. (A) FEVG en pourcentage de variation par rapport au jour 10 (fin de l'administration de la DOX), (B) Rapport PAD/VTD pris comme marqueur de substitution pour la compliance ventriculaire en fin d'étude, (C) Pression artérielle moyenne, (D) Intervalle QT corrigé par la fréquence cardiaque. (Médiane +/-IQR). **p≤0,001. LVEF : fraction d'éjection ventriculaire gauche (%), QTc : longueur du segment QT corrigée en FC (sec), DBP : pression artérielle diastolique, LV-EDV : volume télédiastolique ventriculaire gauche

2) Les GMP-EV préservent les volumes ventriculaires gauches des cœurs de rats traités à la DOX

Alors que les volumes télésystoliques sont significativement augmentés après injection de placebo par rapport aux Sham (p=0,033), ils ont été préservés par les injections de GMP-EV (indice de taille de l'effet d de Cohen=0,4) (Figure 39 A). De même, le pourcentage de rats « répondeurs » qui n'ont pas augmenté leurs volumes télédiastoliques de plus de 5 % par rapport à leurs valeurs post-DOX avant traitement est de 58 % (7 sur 12) contre 28 % (3 sur 11) dans les groupes GMP-EV et

placebo, respectivement (taille d'effet indice d de Cohen de 0,5) (Figure 39 B).

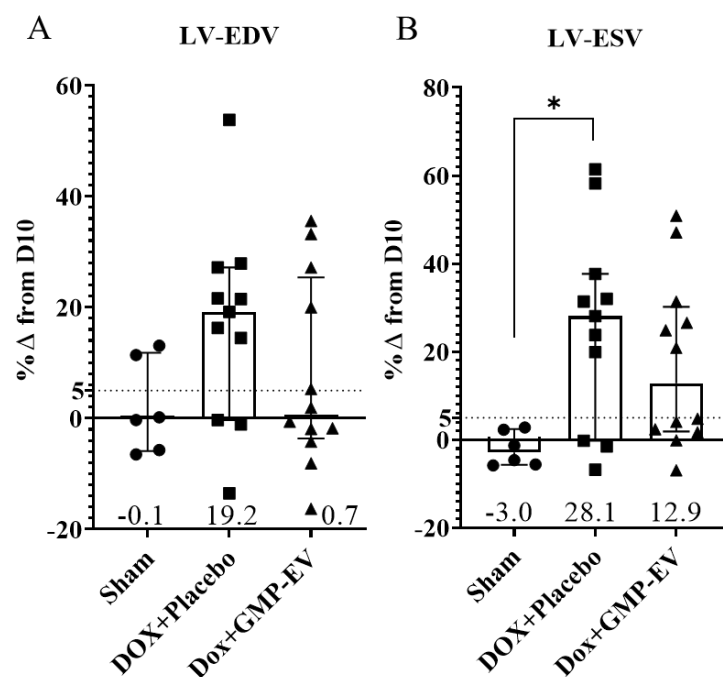


Figure 39 : Effets fonctionnels des GMP-EV sur la fonction cardiaque dans le modèle de cardiomyopathie induite par la DOX chez le rat. (A) VTS et (B) VTD mesurés par échocardiographie et exprimés en pourcentage de variation (médiane +/-IQR) à partir du jour 10 (administration post-DOX).

Sham: n=6; DOX+Placebo: n=11, DOX+GMP-EV: n=12. *p≤0,05 ;
 LV-ESV/LV-EDV : volumes télésystolique/télédiastolique ventriculaires gauches

V. Le traitement par EV-CPC est associé au maintien du métabolisme et de l'homéostasie chez les souris DOX

1) Analyse des cargos protéiques des EV-CPC

L'analyse protéomique des EV-CPC a mis en évidence un enrichissement de 1.123 protéines uniques par rapport aux VEs dérivés de fibroblastes dermiques humains (données non présentées). L'analyse de l'ontologie des gènes (Figure 40) a rapporté de manière intéressante que cet enrichissement concerne notamment les fonctions biologiques impliquées dans le maintien de :

- la capacité de production d'énergie des cellules (« cellular nitrogen compound metabolic process ») ;

- La structure cellulaire et l'homéostasie (« anatomical structure development », « biosynthetic process », « cellular component assembly », « protein-containing complex assembly ») ;
- Les processus cataboliques (« catabolic process », « small molecule metabolic process ») ;
- Le traitement de l'ARNm (maturation, stabilité, épissage) ;
- La formation de vésicules (« transport », « vesicle-mediated transport ») ;
- Les réponses aux stimuli (« response to stress », « immune system process »).

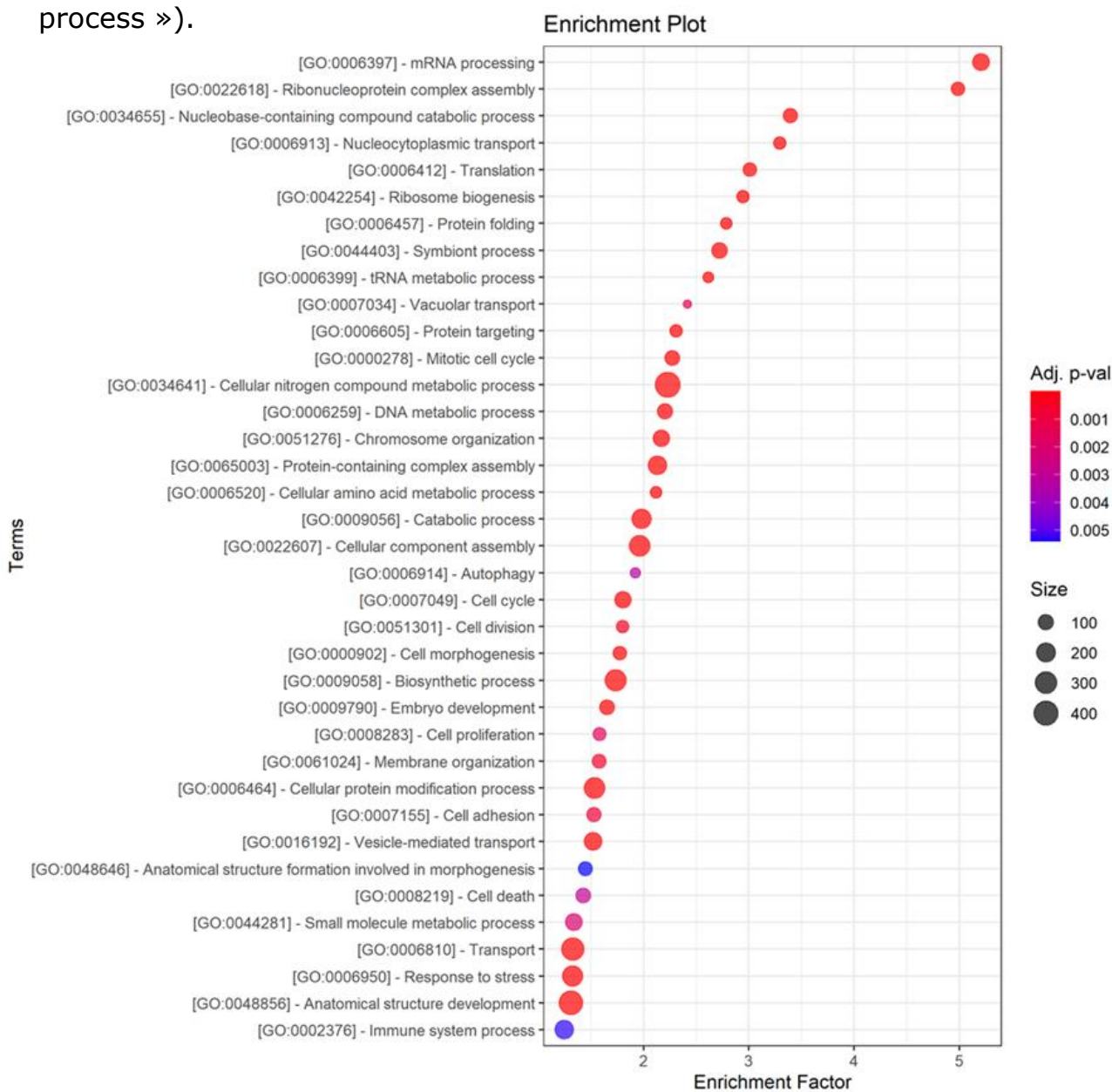


Figure 40 : Caractérisation des cargos protéiques des EV-CPC par rapport à des VEs de fibroblastes. Analyse d'ontologie des gènes (GO) « slim » des 1.123 protéines détectées uniquement dans les EV-CPC (au moins 3 peptides distincts dans 5 répliquats ; valeur p ajustée < 0,05 ; FC>50). Dot plot des termes GO correspondants aux processus biologiques

2) Etude de la signature moléculaire des EV-CPC dans les cœurs de souris DOX

Une étude de transcriptomique des cœurs de souris a été réalisée pour identifier les gènes exprimés de manière différentielle entre les groupes de traitement. Parmi la liste des 173 gènes spécifiquement modifiés par le traitement aux EV-CPC, après curation, 122 ont une expression régulée à la hausse et 22, à la baisse.

L'analyse des voies de signalisation Kegg (base de données de Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) a permis de classer les voies en fonction de leur enrichissement en gènes spécifiquement régulés par les EV-CPC.

Ces voies sont présentées dans la Figure 41 sur laquelle on peut voir que ces gènes appartiennent à des voies biologiques qui permettent de maintenir :

- les processus métaboliques et notamment les voies cataboliques qui pilotent la production cellulaire d'énergie : soit directement en régulant à la hausse la dégradation des acides gras, par exemple, soit indirectement en aidant au maintien des couples redox (NAD^+/NADH , H^+ ; $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, H^+ ; FAD/FADH_2) (« upgulation of valine, leucine and isoleucine degradation » et « NADP metabolic process ») ;
- l'homéostasie cellulaire, en régulant à la hausse des voies telles que « detoxification », « metal ion homeostasis », « protein localization to phagophore assembly site » (autophagie) et « cellular homeostasis » ;
- la « regulation of membrane potential » qui est essentielle pour de nombreux processus, notamment le cycle cellulaire, le contrôle du volume cellulaire, la prolifération, la contraction musculaire et la cicatrisation des plaies ;
- la « stem cell differentiation ».

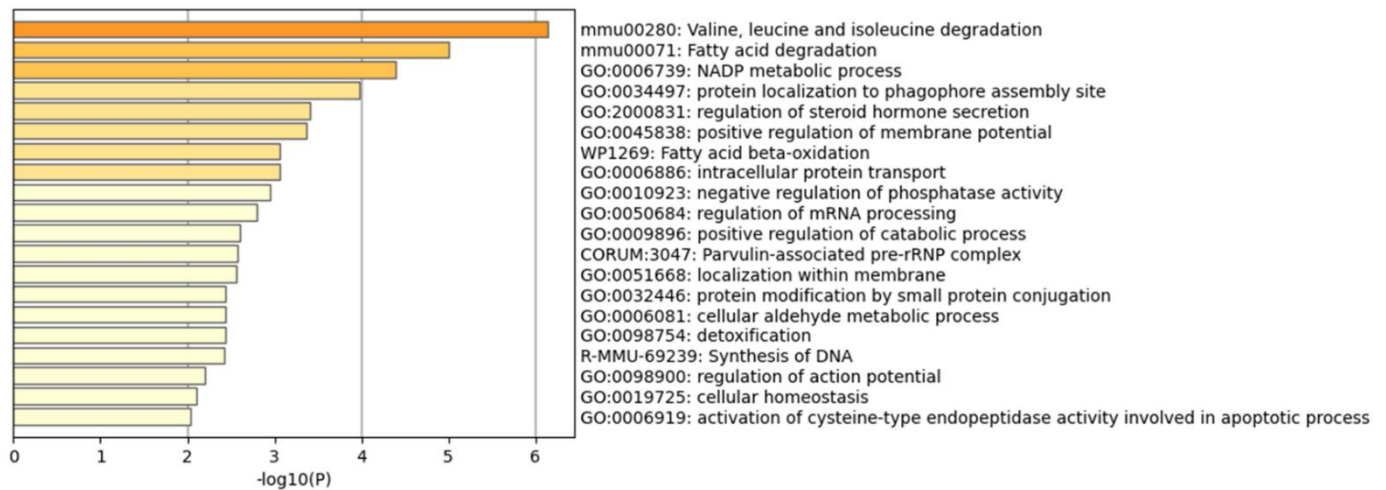


Figure 41 : Signature moléculaire des cœurs traités par les EV-CPC. Analyse ontologique des gènes spécifiquement régulés à la hausse (122 gènes après curation). L'analyse des voies a été réalisée grâce au Gene Annotation & Analysis Resource (Metascape). *Mmu* : *Mus musculus*

De plus, dans le tableau complet présenté en Annexe (Tableau 2), certains gènes sont cohérents avec les effets présumés des VEs dans la mesure où ils sont décrits comme des régulateurs-clés de la fission/fusion/fonction mitochondriale, du stress oxydatif, de l'activité ATPase, de l'hypertrophie cardiaque, de la modulation du métabolisme du glucose et des lipides, de l'apoptose, de l'adhésion cellule-cellule, de la régulation du calcium dans les cellules cardiaques et de la maturation des cardiomyocytes (LDH2, GLRX, CPT1B, TXNIP, AREL1, RBM24, ALDH9A1, HNRNPA1, PKP2, TMEM161B, ANXA6, MYOM2 respectivement).

Le traitement par les EV-CPC a également entraîné la régulation à la baisse de gènes décrits comme de puissants facteurs d'inflammation, de dommages à l'ADN, de cytotoxicité, de fibrose réactive et de régulation de la fonction pacemaker cardiaque (TAOK1, PP2R5A, GZMA, NES, HNC4 respectivement).

Dans l'ensemble, l'étude de la régulation des gènes et des voies spécifiquement modifiées dans les cœurs traités par les EV-CPC a confirmé que les VEs sont capables d'aider leurs cellules cibles cardiaques à adapter métabolisme et homéostasie afin de maintenir leur capacité de production d'énergie et force contractile.

Discussions

Le principal résultat de cette thèse est que des perfusions intraveineuses répétées de VEs sécrétées par des CPC ont permis d'éviter la dégradation significative de la fonction cardiaque induite par la doxorubicine dans deux modèles différents de rongeurs différents. Dans l'ensemble, il existe une bonne corrélation entre les cargos protéiques des EV-CPC, les voies de signalisation régulées positivement dans les cœurs de souris traités par ces VEs et leurs bénéfices fonctionnels, tant *in vitro* qu'*in vivo*, ce qui laisse envisager le potentiel thérapeutique de ces particules contre le stress énergétique myocardique causé par la DOX.

1) Nécessité de nouveaux traitements en cardio-oncologie

Ces dernières années, le pronostic de nombreux cancers s'est nettement amélioré mais l'une des rançons de ce succès est la survenue possible chez les survivants d'une cardiomyopathie souvent sévère, et pouvant survenir à distance du traitement, induite par la chimiothérapie (33,129,130).

L'incidence des atteintes cardiaques (qui varie selon la population considérée, le schéma anticancéreux, la durée du suivi, la stratégie utilisée pour détecter la cardiotoxicité et la définition utilisée pour la classer) va de 5% pour des doses cumulées de 400mg/m² de DOX à 48% pour des doses de 700 mg/m² cumulées (5).

Bien que les cardiopathies aux anthracyclines ne soient pas les premières causes d'insuffisance cardiaque, elles sont traitées par les drogues conventionnelles dont l'efficacité (y compris contre les autres molécules anti-cancéreuses), dans ce contexte d'anomalies chimio-induites, reste cependant controversée et laisse les experts des centres cardio-oncologiques en demande d'options thérapeutiques nouvelles. Une méta-analyse récente de la chimiothérapie chez les survivantes d'un cancer du sein (152) a montré que si les bloqueurs des récepteurs de l'angiotensine/inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine ou les bêtabloquants préservaient de manière significative la fonction du ventricule gauche pendant le traitement par le trastuzumab, ce n'était pas

le cas pour les anthracyclines. Jusqu'à présent, aucun des médicaments couramment utilisés n'a montré une efficacité sans équivoque pour prévenir les cardiopathies aux anthracyclines, à l'exception du dexrazoxane, mais ce médicament a suscité des inquiétudes quant à une myélotoxicité limitant la dose et à un risque potentiellement accru d'autres malignités primaires (71).

Parmi les nouveaux traitements des cardiomyopathies pos-chimiothérapie figure l'utilisation de cellules à des fins thérapeutiques. L'expérience clinique est limitée, mais le récent essai SENECA (83), bien qu'il n'ait pas réussi à détecter de différences dans les résultats cliniques entre les patients traités par des cellules stromales mésenchymateuses et les témoins, a néanmoins rapporté certaines améliorations fonctionnelles qui justifient une exploration plus approfondie de cette approche. Parallèlement, la double observation que les cellules agissent principalement par une activation paracrine des voies de réparation endogènes, et que cette signalisation paracrine est largement médiée par les VEs, a conduit à envisager l'utilisation de ces particules au lieu de leurs cellules parentales. La principale raison est que, d'un point de vue translationnel, les VEs présentent des avantages cliniquement pertinents par rapport aux cellules, notamment :

- Le maintien de leur bio activité après cryoconservation permettant une disponibilité immédiate à la demande (153) ;
- La possibilité de contrôles-qualité plus faciles à standardiser et donc à analyser que lorsque l'on travaille avec des cellules,
- L'absence d'immunogénicité (108) ;
- L'absence de toxicité et de potentiel tumoral (154,155) ;
- Des processus de fabrication plus proches de ceux des produits pharmaceutiques (156).

2) Choix de l'approche thérapeutique

Dans cette étude, les VEs (VE-CPC et GMP-EV) ont été collectées à partir de CPC. Le choix de ce type de cellules a été dicté par l'observation que de meilleurs résultats étaient obtenus lorsque les VEs provenaient de cellules parentales phénotypiquement proches de celles du tissu visé par la

réparation (126,127) et que ces cellules parentales étaient encore à un stade précoce de différenciation (94,99,111,128) sans autre pré-conditionnement. Cela peut être expliqué par le fait que les cargos des VEs dérivées de cellules cardiaques sont certainement plus aptes à enclencher des mécanismes endogènes de cardioprotection que les VEs issues d'autres cellules et ceci a été suggéré par des analyses de séquençages d'ARN et de protéomique (157). Il est à noter que le concept de ce « lineage matching » s'étend au-delà du domaine cardiologique. Ainsi, dans un modèle de fibrose pulmonaire, les exosomes provenant de cellules souches pulmonaires se sont avérés plus efficaces que ceux provenant de CSM (148) et un avantage similaire a été documenté dans un modèle murin d'accident vasculaire cérébral thromboembolique après l'administration intraveineuse répétée de VES dérivées de cellules souches neurales par rapport à celles dérivées de CSM (158).

Bien qu'il soit utilisé tout au long du manuscrit, le terme VEs n'est probablement pas le reflet de la réalité puisque le seuil de poids moléculaire des membranes d'ultrafiltration utilisées a permis de récolter également un mélange de biomolécules libérées par les cellules et distinctes des VEs (cette méthode d'isolement est définie comme « de récupération intermédiaire et de spécificité intermédiaire »). Il est donc plus approprié de qualifier les produits thérapeutiques testés ici de « sécrétomes enrichis en VEs » et une telle approche est justifiée par des études qui ont montré que des résultats similaires voire supérieurs pouvaient être obtenus en délivrant la quasi-totalité du sécrétome cellulaire par rapport à des fractions exosomales ou protéiques hautement purifiées (99). Cela a notamment été le cas dans des études de survie de cardiomyocytes, d'infarctus chez le rat, d'encéphalomyélite auto-immune, de fibrose et d'inflammation pulmonaires ainsi que d'épilepsie infantile (99,146–150).

3) Choix du mode d'administration et bio-distribution

Outre la nature des cellules productrices, une condition préalable probable à un effet thérapeutique durable est l'administration répétée de ces cellules ou de leurs produits sécrétés (132,133,159). En pratique, cela implique que la voie d'administration soit non invasive et facile d'utilisation, ce qui

souligne l'intérêt de l'approche intraveineuse. À première vue, une telle approche peut sembler contre-intuitive au vu des études de bio-distribution qui ont montré que les VEs administrées par voie intraveineuse sont principalement séquestrées dans les poumons, le foie et la rate (160,161), et que peu d'entre elles atteignent le cœur (119). Néanmoins, plusieurs études expérimentales ont documenté les effets cardio-protecteurs des VEs injectées par voie intraveineuse (revues dans (131)), y compris dans des modèles de cardiopathies aux anthracyclines (120–122,162). Ces données sont indirectement confirmées par les résultats positifs des essais cliniques qui ont testé l'administration intraveineuse de cellules dans des indications de cardiopathie, ischémique ou non ischémique (163–165), ces dernières incluant les atteintes cardiaques présentes dans la myopathie de Duchenne (166). Il convient de noter que les bénéfices de l'administration systémique de VEs ont également été rapportés dans des modèles précliniques de maladie rénale chronique (167), de fibrose pulmonaire (168), de lésion d'ischémie-reperfusion hépatique (169) et de lésion cérébrale traumatique (170), pour n'en citer que quelques-uns.

La justification de l'utilisation de la voie intraveineuse est aussi renforcée par les résultats de bio-distribution de cellules injectées en intramyocardique (soit par injection intramyocardique directe lors d'une chirurgie à thorax ouvert, soit par voie percutanée endomyocardique), ou en intracoronaire (131,171), qui ne montrent pas toujours un meilleur taux de rétention cardiaque que la voie intraveineuse ; d'ailleurs, une méta-analyse des effets des VEs dans des modèles précliniques d'infarctus du myocarde n'a pas permis d'identifier la voie d'administration (quelle qu'elle soit) comme un facteur prédictif de résultat positif (172).

Dans nos expériences, on ne peut cependant pas exclure que le ciblage du cœur ait néanmoins été facilité par l'utilisation de VEs dérivées de CPC qui présentent le même répertoire de récepteurs de surface que leurs cellules mères (119) ce qui pourrait favoriser leur adressage vers le cœur par analogie avec le tropisme des VEs isolées d'un tissu donné pour les tumeurs développées aux dépens de ce même tissu (173).

4) Choix des modèles d'étude et des modalités de mesure

Plusieurs études utilisant les VEs comme agents thérapeutiques dans les cardiopathies aux anthracyclines ont fait le choix d'analyser l'effet de VEs issues de CSM (122), de CPC administrées une seule fois et avec un court suivi (121) ou selon un schéma préventif (120).

Dans une perspective translationnelle, la présente étude a été conçue afin de reproduire au mieux les protocoles anti-cancéreux actuellement utilisés en clinique ainsi que la cardiotoxicité associée dans ses caractères cumulatif, dose-dépendant et progressif. Nous avons donc mis en place une exposition répétée plus ou moins chronique dans deux modèles de rongeurs (mâles et femelles), qui, contrairement à d'autres souches d'animaux testés, ont été décrits pour être sensibles à la DOX.

L'échocardiographie et l'IRM étant les techniques qui prévalent pour l'évaluation de la fonction cardiaque (37), nous avons décidé d'utiliser ces deux approches pour évaluer respectivement la fonction cardiaque des rats et des souris. L'avantage indéniable de l'IRM cardiaque sur l'échographie est qu'elle présente une moindre variabilité inter-études (55) et est suffisamment précise pour détecter de faibles variations de la fonction cardiaque (34). De plus, la cardiotoxicité induite par les anthracyclines pouvant faire discuter l'arrêt du traitement anti-cancéreux, les cliniciens ont besoin d'un marqueur précoce, sensible et prédictif des événements cardiovasculaires avant de prendre une telle décision, ce qui qualifie comme critère important d'évaluation la déformabilité du muscle cardiaque (strain) que nous avons de fait mesurée chez la souris (56,57,174).

5) Limites des modèles expérimentaux *in vivo*

Bien que nous ayons adapté nos protocoles expérimentaux à partir d'études publiées précédemment (142,143), la difficulté de reproduction des expériences décrites, jointe aux mécanismes complexes et systémiques de la toxicité aux anthracyclines, ont rendu difficile l'obtention d'un compromis entre un taux de mortalité acceptable et l'apparition d'un dysfonctionnement du ventricule gauche laissant un certain espace pour démontrer un effet thérapeutique. Bien qu'un grand nombre d'animaux ait été inclus dans l'étude, le taux de mortalité élevé inhérent au modèle a

limité la taille des échantillons et a contribué à affaiblir la puissance statistique. La variabilité des réponses inter-individuelles des animaux a également contribué à l'absence de différences significatives constantes entre les groupes de traitement. Ceci a donc justifié de compléter les méthodes statistiques classiques par l'évaluation des tailles d'effet.

L'exposition additionnelle des animaux à l'anticorps monoclonal anti-HER2 trastuzumab aurait pu aggraver la cardiopathie aux anthracyclines car son action à la fois sur les mécanismes de réparation cellulaire et l'appareil contractile est aussi connue pour être cardiotoxique ; ceci est d'autant plus vrai que l'intervalle de temps entre l'exposition à l'anthracycline et le début du traitement par le trastuzumab est plus court (175). Cependant, compte-tenu de la forte mortalité déjà présente avec le seul traitement aux anthracyclines, nous n'avons pas souhaité approfondir cette hypothèse.

Par ailleurs, chez le petit animal il est difficilement envisageable d'administrer la doxorubicine en perfusion intraveineuse lente comme il est recommandé de le faire chez l'Homme (entre 3 et 10 minutes, dans une solution de chlorure de sodium isotonique à 0,9 % ou de glucose à 5 %). Bien que les doses administrées (12 mg/kg pour la souris et 15 mg/kg pour le rat) dans nos modèles animaux correspondent à des faibles doses homothétiques chez l'Homme (36mg/m² et 90 mg/m² respectivement) (176), la voie d'administration intrapéritonéale obligatoire chez les rongeurs est très vraisemblablement responsable des effets toxiques non cardiaques ainsi que de la dégradation clinique rapide des animaux. Cela a empêché un suivi à plus long terme qu'il aurait été intéressant de mener.

6) Limites du traitement

Certaines limites au bénéfice cardio-protecteur des VEs dérivées de CPC doivent être aussi discutées.

Tout d'abord, nous n'avons pas inclus de groupe recevant une forme encapsulée liposomale ou pégylée de DOX, ce qui aurait pu atténuer sa cardiotoxicité (66,67) et donc rendre l'utilisation des VEs peut-être moins pertinente. De plus, un groupe contrôle composé d'un traitement classique de l'insuffisance cardiaque, l'enalapril, un IECA, avait initialement été envisagé comme référence pour évaluer l'intérêt thérapeutique additionnel

des VEs de CPC, il n'a pas encore été réalisé mais constitue une expérience qu'il serait intéressant de mener. De même, l'utilisation d'un modèle de rongeur n'a pas permis de moduler l'administration de DOX, en jouant notamment sur le caractère progressif d'une perfusion intraveineuse dont seule une étude sur le gros animal permettrait d'évaluer les effets sur la cardio-toxicité.

Par ailleurs, de nombreuses stratégies visent aujourd'hui à améliorer le ciblage cardiaque des VEs en modifiant leurs membranes, par des méthodes génétiques ou par conjugaison chimique, soit en traitant les cellules sécrétrices des VEs soit en modifiant directement les VEs post-isolation (177). Une de ces stratégies est actuellement en cours d'étude dans notre équipe, et s'attache à potentialiser le ciblage cardiaque des EV-CPC en leur faisant exprimer des ligands spécifiques du myocarde inflammatoire, et plus spécifiquement la E-sélectine (178). Le rôle potentiel joué par les lipides ou protéines liés à des glucides (appelés glycoconjugués) exprimés à la surface des VEs sur le ciblage de ces dernières, est un nouvel objet d'étude. Les interactions sélectine/ligand sont responsables de l'initiation des cascades d'adhésion et de signalisation dans de nombreux processus biologiques, et, la E-sélectine étant l'un des principaux récepteurs exprimés sur l'endothélium humain inflammatoire, l'hypothèse de recherche est que l'ingénierie des VEs visant à leur faire surexprimer des ligands de cette sélectine pourrait les orienter de manière plus sélective vers le cœur (179) et ainsi optimiser leurs effets cardio-réparateurs. On ne peut donc pas exclure que l'utilisation de VEs ainsi traitées pour améliorer leur adressage cardiaque aurait orienté nos résultats dans le sens d'une plus grande efficacité.

Enfin, bien que leur pertinence clinique puisse être discutée au regard du caractère invasif de leur administration et de leur intégration sur/dans le myocarde, des biomatériaux de nature appropriée incorporant les VEs pourraient, par comparaison avec les suspensions de VEs utilisées dans cette thèse, permettre des effets plus prolongés liés à un relargage contrôlé (180,181).

7) Cellules réceptrices et mécanismes d'action

Bien que nos résultats *in vitro* aient démontré un effet des EV-CPC sur la capacité de production d'énergie des CM, ce qui semble dû à une préservation intrinsèque du métabolisme cellulaire plutôt qu'à une simple augmentation du nombre de cellules survivantes (données non présentées), il n'est pas démontré que les cardiomyocytes soient les cibles exclusives des VEs dont l'internalisation, notamment dans les cellules endothéliales vasculaires et les fibroblastes a également été rapportée (100,118,119).

La bio-distribution des VEs injectées par voie intraveineuse, discutée plus haut, ainsi que la reconnaissance que les VEs peuvent aussi être internalisées par d'autres cellules cardiaques que les cardiomyocytes rendent complexe l'interprétation de leur(s) mécanisme(s) d'action. Bien que le lien entre les VEs piégées à distance et un effet bénéfique cardiaque ne soit pas encore complètement élucidé, une première étude (182) avait déjà rapporté que des CSM injectées par voie intraveineuse amélioraient la fonction cardiaque bien que séquestrées dans le poumon où elles libéraient une protéine douée d'anti-inflammatoires (TSG-6) dont la neutralisation abolissait les effets bénéfiques des cellules sur le cœur. Deux études plus récentes ont contribué à clarifier davantage les mécanismes de la communication inter-organes qui peuvent expliquer qu'un agent thérapeutique séquestré à distance du cœur puisse néanmoins exercer des effets cardio-protecteurs. La première de ces études (183) a utilisé des CSM injectées par voie intraveineuse dans un modèle de cardiopathie aux anthracyclines chez la souris. Comme attendu, les cellules se sont principalement logées dans le poumon, ce qui ne les a pas empêchées d'améliorer la fonction cardiaque et notamment de diminuer l'expression dans le tissu myocardique d'un facteur pro-apoptotique (GRP78). Une fois dans les capillaires pulmonaires, les CSM ont relargué des VEs dont leur marquage a permis de suivre leur cheminement dans le sang. Ces VEs contiennent, entre autres, le miR181a-5p dont on trouve ainsi l'expression augmentée dans le sang mais aussi dans le tissu myocardique. Or l'une des cibles de ce miR est précisément le facteur pro-apoptotique GRP78 dont il régule à la baisse l'expression dans le tissu ventriculaire, ultime étape

cardiaque de la séquence initiée dans le poumon. La seconde étude a porté sur un modèle également murin de néphrite (184). Là encore, les CSM injectées par voie intraveineuse sont identifiées principalement dans le poumon et très peu dans le rein. Un marquage montre que des VEs de CSM sont transférées sur les leucocytes de la rate, principalement les macrophages M2 dont ils majorent le phénotype anti-inflammatoire ; la circulation sanguine achemine ensuite ces macrophages anti-inflammatoires vers le rein où on les retrouve augmentés (ainsi que les lymphocytes T régulateurs), ce qui contribue aux effets réno-protecteurs. Ainsi ces études illustrent-elles les mécanismes possibles de ces communications inter-organes : dans un cas, les VEs sont directement les vecteurs de l'effet protecteur en transférant dans le tissu cardiaque leur cargo bioactif alors que dans l'autre cas, elles agissent à distance par le biais d'une régulation du système immunitaire splénique (108,185). Ce dernier mécanisme de modulation de la réponse immune systémique a été décrit à la suite d'une injection intraveineuse de VEs dans des modèles précliniques très divers (accidents vasculaires cérébraux, schizophrénie, dysplasie pulmonaire, lésions neurales, de la moelle épinière, ou encore cardiaques) (158,168,186-190). Les cellules immunitaires endogènes agiraient alors comme vecteurs du message protecteur atteignant l'organe cible par le biais du flux sanguin et dans ces études, les modifications inflammatoires induites par les VEs ont systématiquement été associées à une amélioration des résultats fonctionnels quel que soit l'organe ciblé.

Dans notre étude, la nature des voies de signalisation dans lesquelles les cargos protéiques des EV-CPC sont impliqués laisse raisonnablement supposer que, indépendamment du site précis dans lequel les VEs administrées par voie intraveineuse ont abouti, il existe une relation mécanistique entre leur présence, les changements observés dans l'expression des gènes et les performances fonctionnelles du VG. Pour tenter de mieux documenter cette possible relation entre les VEs et le système immunitaire, des analyses complémentaires de la formule sanguine, des cytokines et des cellules immunitaires (macrophages et lymphocytes T régulateurs) dans les tissus cardiaques des rats traités par

la DOX selon le protocole décrit plus haut et sacrifiés précocement, sont en train d'être réalisées au moment de l'écriture de ce manuscrit.

8) Faisabilité d'une production clinique

La faisabilité d'une production clinique a été démontrée puisque la génération de CPC a été réalisée dans une suite BPF à l'aide d'un nouveau processus de différenciation avec des méthodes, des matériaux et des réactifs compatibles avec les normes BPF et à l'échelle de fabrication clinique pour une Phase 1 (à l'Innovation Facility for Advanced Cell Therapy (iFACT - FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc, (FCDI), USA). Les processus de vésiculation et d'isolement (réalisés au Centre de thérapie cellulaire et génique MEARY, AP-HP Paris, France) ont aussi été menés à l'échelle d'une fabrication clinique et à l'aide de méthodes, de matériaux et de réactifs compatibles avec les BPF.

L'observation que les EV-CPC et GMP-EV ont produit des améliorations fonctionnelles équivalentes dans les modèles de rongeurs fournit donc l'information rassurante que des VEs dérivées de CPC peuvent être produites selon des procédures compatibles avec une utilisation clinique pour le traitement de cardiopathies. Ces résultats ont constitué une partie des études précliniques qui ont ouvert la voie à un futur essai clinique monocentrique de Phase I dont le dossier du médicament expérimental (DME) a été fourni et est en train d'être analysé par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament. Cet essai prévoit l'évaluation de la sécurité d'injections intraveineuses répétées de VEs dérivées de CPC de grade clinique (considérées comme un Médicament de Thérapie Innovante Préparé Ponctuellement-MTI-PP) à deux doses différentes chez des patients sévèrement symptomatiques présentant une dysfonction ventriculaire gauche secondaire à une cardiomyopathie dilatée non ischémique et réfractaire aux médicaments habituels. Les critères de jugement principaux porteront sur l'évaluation de la sécurité (décès cardiovasculaire ou de toute cause, hospitalisation pour aggravation de l'insuffisance cardiaque, autres évènements cardiovasculaires, accidents vasculaire cérébral, réactions immuno-allergiques ou infectieuses) ; les critères secondaires porteront sur le potentiel thérapeutique des VEs (statut fonctionnel évalué par le score de

la NYHA, qualité de vie, mesures de la LVEF et des volumes du VG, consommation maximale d'oxygène à l'effort, réponse immunitaire par la détection d'anticorps spécifiques des cellules du donneur après chaque perfusion et dosage des cytokines pro- et anti-inflammatoires).

Conclusions

Dans ce projet, nous avons cherché à établir si les VEs dérivées de CPC peuvent agir sur les principales anomalies chimio-induites et permettre ainsi d'améliorer la contractilité myocardique altérée par la chimiothérapie. En vue d'une transposition chez l'homme, l'étude préclinique de l'efficacité fonctionnelle des VEs de CPC dérivés de CSPi produites selon un protocole compatible avec les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) a aussi été un objectif de cette thèse.

La physiopathologie de la cardiomyopathie induite par les anthracyclines fait encore l'objet de débats, mais il existe des preuves irréfutables qu'elle implique un mélange de dommages oxydatifs, de dysfonctionnement mitochondrial, d'apoptose, d'inflammation et de fibrose (27,129,191-193). Le fait que ces mécanismes soient, au moins en partie, contrôlés par les VEs a été étayé par trois séries de preuves :

- 1) chez les souris et les rats, les VEs ont préservé la fonction du ventricule gauche par rapport aux témoins ayant reçu une injection placebo; leurs effets sur la déformation sont particulièrement pertinents sur le plan clinique, étant donné l'effet prédictif de cet indice sur l'évolution des patients (56,57). En particulier, la déformation circonférentielle a été rapportée comme une mesure importante pour le suivi à long terme (62,174);
- 2) les taux d'ATP intracellulaires ont également tendance à être mieux maintenus lorsque les CM humains stressés par la DOX sont exposés aux EV-CPC, suggérant que ces dernières aident au maintien du métabolisme énergétique puisque l'ATP sert de principale source énergétique pour de nombreux processus biologiques et est un élément d'échange fondamental au carrefour des voies d'anabolisme et de catabolisme ;
- 3) les changements dans les voies de signalisation impliquant des gènes dont l'expression était régulée à la hausse dans les cœurs de souris traités par les EV-CPC sont cohérents avec la nature du cargo protéique des EV-CPC puisqu'ils indiquent globalement un effet protecteur des EV-CPC contre l'altération du métabolisme énergétique et le dysfonctionnement des cardiomyocytes. Ces changements complètent nos données sur la

capacité des cellules à générer de l'énergie *in vitro* et sont également conformes à l'observation que les CM dérivés de CSPi générés à partir de patients de l'essai SENECA et exposés *in vitro* à la DOX ont une meilleure viabilité après traitement par des EV-CPC enrichis en mitochondries (194).

La mise en relation de l'effet cardioprotecteur des VEs de CPC injectées par voie intraveineuse avec une immunomodulation à distance signe d'une communication croisée entre organes, constitue la perspective à court terme de cette thèse. L'évaluation de la sécurité d'injections intraveineuses répétées de VEs dérivées de CPC de grade clinique au cours d'un essai clinique de Phase I est la perspective à moyen terme de cette thèse.

Malgré les limites précédemment décrites, l'étude fournit donc une preuve de principe que des administrations intraveineuses répétées d'EV-CPC ou de GMP-EV peuvent être efficaces pour améliorer la cardiomyopathie induite par la DOX. Cela est le cas dès les premiers stades de développement de la maladie (c'est-à-dire dès que le strain est modifié) et justifie une exploration plus approfondie de la thérapie vésiculaire comme moyen de prévenir et/ou d'inverser le stress énergétique et le remodelage cardiaque induits par la chimiothérapie avant une dysfonction cardiaque manifeste.

Avec les réserves inhérentes à tous les modèles de petits animaux, cette stratégie pourrait, à long terme, trouver sa place dans l'arsenal thérapeutique actuel et notamment aider à guider la décision d'arrêter ou de réduire les doses des traitements anti-cancéreux, avec leur corollaire négatif sur l'évolution de la pathologie tumorale causale.

Contributions au projet et financements

Nous souhaitons remercier tout particulièrement l'ensemble des personnes de l'équipe et proches collaborateurs ayant contribué à ce travail pour leur aide précieuse et leur investissement au cours de ce projet de thèse :

- Dr Bruna Lima Correa
- Dr Nadia el Harane
- Dr Chloé Pezzana
- Madame Valérie Bellamy
- Madame Laetitia Pidial
- Madame Chloé Guillas
- Dr Céline Marigny
- Madame Rose Guesdon
- Madame Keirththana Kamaleswaran
- Madame Line Legac
- Madame Eirini Kiriakopoulou
- Madame Claire Nougier
- Madame Ashley Peuffier
- Dr Jean Sébastien Silvestre
- Dr José Vilar
- Dr Nisa Renault
- Dr Emilie Baron
- Dr Thomas Hamada
- Dr Onnik Agbulut
- Dr Pierre Joanne
- Dr Pierre Croisille
- Dr Lorena Petrusca
- Dr Gwennhael Autret
- Pr Albert Hagege

Ce travail a été permis grâce aux financements des fonds attribués par l'Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM), du Fonds Marion Elizabeth BRANCHER (Bourse doctorale Manon Desgres), de la Fondation de l'Avenir (AP-RM- 18 017), de l'AFM-théléthon (EVEDOX #22378), du LabEx REVIVE (ANR 10-LABX-0073) et de la FRM (PME20180639496).

Valorisation scientifique

Articles revus par les pairs :

1. *Therapeutic potential of extracellular vesicles derived from cardiac progenitor cells in rodent models of chemotherapy-induced cardiomyopathy.*

Manon DESGRES, Bruna Lima Correa, Lorena Petrusca, Gwennhael Autret, Chloé Pezzana, Céline Marigny, Chloé Guillas, Valérie Bellamy, José Vilar, Ashley Peuffier, Antonio Alberdi, Marie-Cécile Perier, Michael Richard, Florent Dingli, Damarys Loew, Camille Humbert, Jérôme Larghero, Guillaume Churlaud, Nisa Renault, Pierre Croisille, Albert Hagège, Jean-Sébastien Silvestre, Philippe Menasché.

Soumis.

1er auteur

2. *Biomaterial-embedded extracellular vesicles improve recovery of the dysfunctional myocardium*

Chloé Pezzana, Audrey Cras, Fanny Simelière, Rose Guesdon, **Manon Desgres**, Bruna Lima Correa, Ashley Peuffier, Valérie Bellamy, Sara Gouarderes, Antonio Alberdi, Marie-Cécile Perier, Laetitia Pidial, Florence Agnely, Amélie Bochot, Albert Hagège, Jean-Sébastien Silvestre, Philippe Menasché.

Soumis

5eme auteur

3. *Clinical Translation of Pluripotent Stem Cell Therapies: Challenges and Considerations.*

Desgres M, Menasché P.

Cell Stem Cell. 2019 Nov 7;25(5):594-606.

doi: 10.1016/j.stem.2019.10.001.

1er auteur

4. *Extracellular vesicles fail to trigger the generation of new cardiomyocytes in chronically infarcted hearts.*

Lima Correa B, El Harane N, **Desgres M**, Perotto M, Alayrac P, Guillas C, Pidial L, Bellamy V, Baron E, Autret G, Kamaleswaran K, Pezzana C, Perier MC, Vilar J, Alberdi A, Brisson A, Renault N, Gneccchi M, Silvestre JS, Menasché P.

Theranostics. 2021 Nov 2;11(20):10114-10124. doi: 10.7150/thno.62304.

3eme auteur

5. *Extracellular vesicles from human cardiovascular progenitors trigger a reparative immune response in infarcted hearts.*

Lima Correa B, El Harane N, Gomez I, Rachid H, Vilar J, **Desgres M**, Bellamy V, Keirththana K, Guillas C, Perotto M, Pidial L, Alayrac P, Tran T, Tan S, Hamada T, Charron D, Brisson A, Renault NK, Al-Daccak R, Menasché P, Silvestre JS.

Cardiovasc Res. 2021 Jan 1;117(1):292-307. doi: 10.1093/cvr/cvaa028. 6eme auteur

Présentations en congrès :

1. Abstract Poster: *Effects of Intravenously Delivered Extracellular Vesicles on Cardiac Function in Chemotherapy-Induced Cardiomyopathy.*

Manon Desgres, Gwennhael Autret, Lorena Petrusca, Bruna Lima Correa, Céline Marigny, Line Le Gac, Chloé Guillas, Bertrand Tavitian, Pierre Croisille, Jean-Sébastien Silvestre and Philippe Menasche.

Circulation. 2021;144: A12755

2. Abstract Poster: *The protective effects of the extracellular vesicles-enriched secretome of human iPS-derived cardiovascular progenitors in ischemic heart failure are not mediated by the induction of cardiomyocyte proliferation.*

Manon Desgres, Nadia El Harane, Bruna Lima Correa, Maria Perotto, Laetitia Pidial, Valerie Bellamy, Emilie Baron, Nisa Renault, Jean-Sebastien Silvestre, and Philippe Menasché.

2nd Congress FSEV 2019: Extracellular Vesicles in Health & Disease ».

Obtention du Prix « Congress Poster Communication Awards » de la part du comité de lecture

3. Abstract Poster: *Extracellular Vesicles from human iPS-derived cardiovascular progenitors do not trigger an immune response in the infarcted heart*

Manon Desgres, Nadia El Harane, Bruna Lima Correa, Ingrid Gomez, Hocine Rachid, José Vilar, Valérie Bellamy, Laetitia Pidial, Keirththana Kamaleswaran, Paul Alayrac, Chloé Guillas, Maria Perotto, Nisa Renault, Dominique Charron, Reem Al-Daccak, Jean-Sébastien Silvestre, Philippe Menasché

« **2019 IBPS International Symposium** – Paris; Building, repairing, replacing organs »

Non Revus par les pairs :

Les cellules souches pluripotentes dans le traitement de l'insuffisance cardiaque - Statut actuel, problèmes et perspectives

Desgres M, Menasché P.

Med Sci (Paris). 2019 Oct;35(10):771-778. French. doi: 10.1051/medsci/2019155.

1er auteur

Tables des illustrations

Figure 1: Graphique représentant le nombre de publications référencées dans PubMed portant la mention « cardio-oncology » depuis la naissance de cette discipline jusqu'à aujourd'hui.	9
Figure 2 : Formules topologiques des anthracyclines	12
Figure 3 : Génération de radicaux libres à partir des anthracyclines via des réactions d'oxydo-réduction dans la membrane mitochondriale	17
Figure 4 : Diagramme schématisé des mécanismes responsables de la toxicité cardiaque	19
Figure 5 : Remodelage métabolique et transcriptionnel dans l'insuffisance cardiaque. Les flèches rouges indiquent des changements dans l'insuffisance cardiaque. Les lignes pointillées relient les intermédiaires métaboliques à la régulation de l'expression génique	21
Figure 6 : Différences dans les définitions de cardiotoxicité	24
Figure 7 : Stratégies de prise en charge selon la classe de toxicité myocardique du Royal Brompton Hospital	25
Figure 8 : Stratégies de prévention et de traitement en fonction de la progression des altérations fonctionnelles cardiaques	26
Figure 9 : Représentation schématisée des remodelages ventriculaires concentrique ou excentrique	29
Figure 10 : Organisation des fibres myocardiques et mouvements cardiaques	35
Figure 11 : Déformations myocardiques mesurées par les indices de déformabilité appelés strain	35
Figure 12 : Schéma représentant les facteurs de stress sélectionnés pour induire une dysfonction ventriculaire gauche des modèles de petits animaux	38
Figure 13 : Stratégies de cellules souches possibles qui maintiennent un équilibre des cellules souches et descendance différenciée	44
Figure 14 : Cardiogénèse in vivo et in vitro	46
Figure 15 : Diversité de classes de vésicules, de biogénèse et de d'interactions avec les cellules cibles	53
Figure 16 : Principe schématisé de l'ultrafiltration à flux vertical et à force centrifuge	63
Figure 17 : Principe schématisé de la cryomicroscopie électronique à transmission (cryoMET)	66
Figure 18 : Schéma des principales étapes de l'analyse protéomique	69
Figure 19 : Protocole d'expositions répétées à la DOX et aux EV-CPC	75
Figure 20 : Schéma des protocoles expérimentaux des modèles animaux de cardiopathie à la chimiothérapie et administration des EV-CPC et GMP-EV	78
Figure 21 : Schéma des étapes principales des analyses transcriptomiques sur puces	85
Figure 22 : Méthode d'analyse comparative des expériences de transcriptomiques réalisées sur les cœurs de souris	86
Figure 23 : Caractérisation du sécrétome EV-CPC en termes de distribution de taille des particules isolées par analyse NTA	91
Figure 24 : Résolution cryoMET des doubles membranes lipidiques des EV-CPC et marquage CD81+avec des nanobilles d'or	92
Figure 25 : Preuve protéique de la présence d'une bicouche lipidique dans les EV-CPC	93
Figure 26 : Bio-activité des EV-CPC et GMP-EV	96
Figure 27 : Caractérisation phénotypique des CM par cytométrie en flux.	98
Figure 28 : Caractérisation phénotypique des CM par immunofluorescence	99
Figure 29 : Concentration d'ATP intracellulaire au jour 6, au jour 8 et au jour 10	100
Figure 30 : Consommation en oxygène et acidification du milieu au jour 6	100
Figure 31 : Consommation en oxygène et acidification du milieu au jour 8	101
Figure 32 : Courbes de survie Kaplan Meier avec test d'analyse du Log rank	103
Figure 33 : Validation du modèle murin de cardiomyopathie induite par la DOX	104
Figure 34 : Effet de la DOX sur l'activité cardiaque électrique et le débit cardiaque	105
Figure 35 : Validation du modèle de cardiopathie à la DOX chez la souris	107
Figure 36 : Évaluation IRM des paramètres cardiaques chez la souris	108
Figure 37 : Expression relative dans les cœurs de souris de l'ARNm Gal3, CCN2, Myh6/Myh7 et NPPA	110
Figure 38 : Validation du modèle de cardiomyopathie induite par la DOX chez le rat	111
Figure 39 : Effets fonctionnels des GMP-EV sur la fonction cardiaque dans le modèle de cardiomyopathie induite par la DOX chez le rat.	112
Figure 40 : Caractérisation des cargos protéiques des EV-CPC par rapport à des VEs de fibroblastes	113
Figure 41 : Signature moléculaire des cœurs traités par les EV-CPC	115

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Classification de l'insuffisance cardiaque selon la NYHA</i>	31
<i>Tableau 2 : Preuve protéique de l'encapsulation de matériel intracellulaire dans les EV-CPC</i>	94

Table des figures annexes

<i>Annexe Figure 1 : Répartition des groupes de traitement en fonction de la clinique des animaux</i>	<u>151</u>
<i>Annexe Figure 2 : Preuve protéique de l'encapsulation de matériel intracellulaire dans les EV-CPC</i>	<u>151</u>
<i>Annexe Figure 3 : Paramètres cardiaques volumétriques avec inclusion des muscles papillaires dans la segmentation du diamètre interne</i>	<u>152</u>

Liste des tableaux annexes

<i>Annexe Tableau 1 : Liste des primers utilisés pour les analyses en qRT-PCR</i>	153
<i>Annexe Tableau 2 : Analyse transcriptomique des cœurs de souris</i>	157

Bibliographie

1. Banke A, Schou M, Videbæk L, Møller JE, Torp-Pedersen C, Gustafsson F, et al. Incidence of cancer in patients with chronic heart failure: a long-term follow-up study. *European Journal of Heart Failure*. 2016;18(3):260–6.
2. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*. 2020 Oct 17;396(10258):1204–22.
3. Felker GM, Thompson RE, Hare JM, Hruban RH, Clemetson DE, Howard DL, et al. Underlying Causes and Long-Term Survival in Patients with Initially Unexplained Cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2000 Apr 13;342(15):1077–84.
4. López-Sendón J, Álvarez-Ortega C, Zamora Auñón P, Buño Soto A, Lyon AR, Farmakis D, et al. Classification, prevalence, and outcomes of anticancer therapy-induced cardiotoxicity: the CARDIOTOX registry. *European Heart Journal*. 2020 May 7;41(18):1720–9.
5. Zamorano JL, Lancellotti P, Rodriguez Muñoz D, Aboyans V, Asteggiano R, Galderisi M, et al. 2016 ESC Position Paper on cancer treatments and cardiovascular toxicity developed under the auspices of the ESC Committee for Practice Guidelines: The Task Force for cancer treatments and cardiovascular toxicity of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2016 Sep 21;37(36):2768–801.
6. Moslehi JJ. Cardiovascular Toxic Effects of Targeted Cancer Therapies. Longo DL, editor. *N Engl J Med*. 2016 Oct 13;375(15):1457–67.
7. Alexandre J, Cautela J, Ederhy S, Damaj GL, Salem J, Barlesi F, et al. Cardiovascular Toxicity Related to Cancer Treatment: A Pragmatic Approach to the American and European Cardio-Oncology Guidelines. *JAHA*. 2020 Sep 15;9(18):e018403.
8. Herrmann J (Chair), Lenihan D (Co-chair), Armenian S, Barac A, Blaes A, Cardinale D, et al. Defining cardiovascular toxicities of cancer therapies: an International Cardio-Oncology Society (IC-OS) consensus statement. *European Heart Journal*. 2022 Jan 21;43(4):280–99.
9. Krohn K, editor. *Anthracycline Chemistry and Biology II* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2008 [cited 2022 Sep 21]. (Topics in Current Chemistry; vol. 283). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-75813-6>
10. Takemura G, Fujiwara H. Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 2007 Mar;49(5):330–52.
11. Keizer HG, Pinedo HM, Schuurhuis GJ, Joenje H. Doxorubicin (adriamycin): A critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacology & Therapeutics*. 1990 Jan;47(2):219–31.
12. Lyu YL, Kerrigan JE, Lin CP, Azarova AM, Tsai YC, Ban Y, et al. Topoisomerase II β -Mediated DNA Double-Strand Breaks: Implications in Doxorubicin Cardiotoxicity and Prevention by Dexrazoxane. *Cancer Research*. 2007 Sep 15;67(18):8839–46.

13. Zhang S, Liu X, Bawa-Khalfe T, Lu LS, Lyu YL, Liu LF, et al. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med.* 2012 Nov;18(11):1639–42.
14. Vejpongsa P, Yeh E. Topoisomerase 2 β : A Promising Molecular Target for Primary Prevention of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity. *Clinical Pharmacology & Therapeutics.* 2014;95(1):45–52.
15. Lebrecht D, Kokkori A, Ketelsen UP, Setzer B, Walker UA. Tissue-specific mtDNA lesions and radical-associated mitochondrial dysfunction in human hearts exposed to doxorubicin. *J Pathol.* 2005 Dec;207(4):436–44.
16. Horenstein MS, Vander Heide RS, L'Ecuyer TJ. Molecular Basis of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity and Its Prevention. *Molecular Genetics and Metabolism.* 2000 Sep;71(1–2):436–44.
17. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V. Energy metabolism in heart failure. *J Physiol.* 2004 Feb 15;555(Pt 1):1–13.
18. Wallace KB, Sardão VA, Oliveira PJ. Mitochondrial Determinants of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. *Circ Res.* 2020 Mar 27;126(7):926–41.
19. Zhou S, Palmeira CM, Wallace KB. Doxorubicin-induced persistent oxidative stress to cardiac myocytes. *Toxicology Letters.* 2001 May;121(3):151–7.
20. Liu J, Mao W, Ding B, Liang C seng. ERKs/p53 signal transduction pathway is involved in doxorubicin-induced apoptosis in H9c2 cells and cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008 Nov;295(5):H1956–65.
21. Pillai VB, Bindu S, Sharp W, Fang YH, Kim G, Gupta M, et al. Sirt3 protects mitochondrial DNA damage and blocks the development of doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* 2016 Apr 15;310(8):H962–72.
22. Tadokoro T, Ikeda M, Ide T, Deguchi H, Ikeda S, Okabe K, et al. Mitochondria-dependent ferroptosis plays a pivotal role in doxorubicin cardiotoxicity. *JCI Insight.* 2020 May 7;5(9):e132747.
23. Wu BB, Leung KT, Poon ENY. Mitochondrial-Targeted Therapy for Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *IJMS.* 2022 Feb 9;23(3):1912.
24. Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial Substrate Metabolism in the Normal and Failing Heart. *Physiological Reviews.* 2005 Jul;85(3):1093–129.
25. Bertero E, Maack C. Metabolic remodelling in heart failure. *Nat Rev Cardiol.* 2018 Aug;15(8):457–70.
26. Zhang L, Jaswal JS, Ussher JR, Sankaralingam S, Wagg C, Zaugg M, et al. Cardiac Insulin-Resistance and Decreased Mitochondrial Energy Production Precede the Development of Systolic Heart Failure After Pressure-Overload Hypertrophy. *Circulation: Heart Failure.* 2013 Sep;6(5):1039–48.

27. Tokarska-Schlattner M, Zaugg M, Zuppinger C, Wallimann T, Schlattner U. New insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: The critical role of cellular energetics. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2006 Sep 1;41(3):389–405.
28. Russo M, Della Sala A, Tocchetti CG, Porporato PE, Ghigo A. Metabolic Aspects of Anthracycline Cardiotoxicity. *Curr Treat Options Oncol*. 2021;22(2):18.
29. Wojnowski L, Kulle B, Schirmer M, Schlüter G, Schmidt A, Rosenberger A, et al. NAD(P)H Oxidase and Multidrug Resistance Protein Genetic Polymorphisms Are Associated With Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Circulation*. 2005 Dec 13;112(24):3754–62.
30. Garcia-Pavia P, Kim Y, Restrepo-Cordoba MA, Lunde IG, Wakimoto H, Smith AM, et al. Genetic Variants Associated With Cancer Therapy-Induced Cardiomyopathy. *Circulation*. 2019 Jul 2;140(1):31–41.
31. McNally EM, Mestroni L. Dilated cardiomyopathy: genetic determinants and mechanisms. *Circ Res*. 2017 Sep 15;121(7):731–48.
32. Cardinale D, Colombo A, Bacchiani G, Tedeschi I, Meroni CA, Veglia F, et al. Early Detection of Anthracycline Cardiotoxicity and Improvement With Heart Failure Therapy. *Circulation*. 2015 Jun 2;131(22):1981–8.
33. Steinherz LJ, Steinherz PG, Tan CTC, Heller G, Murphy ML. Cardiac Toxicity 4 to 20 Years After Completing Anthracycline Therapy. *JAMA*. 1991 Sep 25;266(12):1672–7.
34. Galán-Arriola C, Lobo M, Vílchez-Tschischke JP, López GJ, de Molina-Iracheta A, Pérez-Martínez C, et al. Serial Magnetic Resonance Imaging to Identify Early Stages of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity. *Journal of the American College of Cardiology*. 2019 Feb;73(7):779–91.
35. Garbern JC, Lee RT. Cardiac Stem Cell Therapy and the Promise of Heart Regeneration. *Cell Stem Cell*. 2013 Jun;12(6):689–98.
36. Ewer MS, Lippman SM. Type II Chemotherapy-Related Cardiac Dysfunction: Time to Recognize a New Entity. *JCO*. 2005 May 1;23(13):2900–2.
37. Čelutkienė J, Pudil R, López-Fernández T, Grapsa J, Nihoyannopoulos P, Bergler-Klein J, et al. Role of cardiovascular imaging in cancer patients receiving cardiotoxic therapies: a position statement on behalf of the Heart Failure Association (HFA), the European Association of Cardiovascular Imaging (EACVI) and the Cardio-Oncology Council of the European Society of Cardiology (ESC). *European Journal of Heart Failure*. 2020;22(9):1504–24.
38. Plana JC, Galderisi M, Barac A, Ewer MS, Ky B, Scherrer-Crosbie M, et al. Expert Consensus for Multimodality Imaging Evaluation of Adult Patients during and after Cancer Therapy: A Report from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *Journal of the American Society of Echocardiography*. 2014 Sep;27(9):911–39.
39. Pareek N, Cevallos J, Moliner P, Shah M, Tan LL, Chambers V, et al. Activity and outcomes of a cardio-oncology service in the United Kingdom—a five-year experience. *European Journal of Heart Failure*. 2018;20(12):1721–31.

40. Ferreira de Souza T, Quinaglia A.C. Silva T, Osorio Costa F, Shah R, Neilan TG, Velloso L, et al. Anthracycline Therapy Is Associated With Cardiomyocyte Atrophy and Preclinical Manifestations of Heart Disease. *JACC: Cardiovascular Imaging*. 2018 Aug;11(8):1045–55.
41. Cardinale D, Iacopo F, Cipolla CM. Cardiotoxicity of Anthracyclines. *Front Cardiovasc Med*. 2020 Mar 18;7:26.
42. Cardinale D, Colombo A, Lamantia G, Colombo N, Civelli M, De Giacomi G, et al. Anthracycline-Induced Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*. 2010 Jan;55(3):213–20.
43. Chow EJ, Chen Y, Kremer LC, Breslow NE, Hudson MM, Armstrong GT, et al. Individual Prediction of Heart Failure Among Childhood Cancer Survivors. *J Clin Oncol*. 2015 Feb 10;33(5):394–402.
44. Lipshultz SE, Karnik R, Sambatakos P, Franco VI, Ross SW, Miller TL. Anthracycline-related cardiotoxicity in childhood cancer survivors. *Current Opinion in Cardiology*. 2014 Jan;29(1):103–12.
45. Pudil R, Mueller C, Čelutkienė J, Henriksen PA, Lenihan D, Dent S, et al. Role of serum biomarkers in cancer patients receiving cardiotoxic cancer therapies: a position statement from the Cardio-Oncology Study Group of the Heart Failure Association and the Cardio-Oncology Council of the European Society of Cardiology. *European Journal of Heart Failure*. 2020;22(11):1966–83.
46. Sandri MT, Salvatici M, Cardinale D, Zorzino L, Passerini R, Lentati P, et al. N-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide after High-Dose Chemotherapy: A Marker Predictive of Cardiac Dysfunction? *Clinical Chemistry*. 2005 Aug 1;51(8):1405–10.
47. Cardinale D, Sandri MT, Martinoni A, Tricca LabTech A, Civelli M, Lamantia G, et al. Left ventricular dysfunction predicted by early troponin I release after high-dose chemotherapy. *Journal of the American College of Cardiology*. 2000 Aug;36(2):517–22.
48. Spaich S, Katus HA, Backs J. Ongoing controversies surrounding cardiac remodeling: is it black and white—or rather fifty shades of gray? *Front Physiol*. 2015 Jul 22;6:202.
49. Eghbali M, Deva R, Alioua A, Minosyan TY, Ruan H, Wang Y, et al. Molecular and Functional Signature of Heart Hypertrophy During Pregnancy. *Circulation Research*. 2005 Jun 10;96(11):1208–16.
50. Grossman W, Jones D, McLaurin LP. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest*. 1975 Jul;56(1):56–64.
51. Bornstein AB, Rao SS, Marwaha K. Left Ventricular Hypertrophy [Internet]. *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing; 2022 [cited 2022 Sep 21]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557534/>
52. Münch J, Abdelilah-Seyfried S. Sensing and Responding of Cardiomyocytes to Changes of Tissue Stiffness in the Diseased Heart. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Feb 26;9:642840.

53. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Böhm M, et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *European Heart Journal*. 2021 Sep 21;42(36):3599–726.
54. Thavendiranathan P, Grant AD, Negishi T, Plana JC, Popović ZB, Marwick TH. Reproducibility of Echocardiographic Techniques for Sequential Assessment of Left Ventricular Ejection Fraction and Volumes. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013 Jan;61(1):77–84.
55. Grothues F, Smith GC, Moon JCC, Bellenger NG, Collins P, Klein HU, et al. Comparison of Interstudy Reproducibility of Cardiovascular Magnetic Resonance With Two-Dimensional Echocardiography in Normal Subjects and in Patients With Heart Failure or Left Ventricular Hypertrophy. :6.
56. Zhang KW, French B, May Khan A, Plappert T, Fang JC, Sweitzer NK, et al. Strain Improves Risk Prediction Beyond Ejection Fraction in Chronic Systolic Heart Failure. *J Am Heart Assoc*. 2014 Feb 28;3(1):e000550.
57. Cho GY, Marwick TH, Kim HS, Kim MK, Hong KS, Oh DJ. Global 2-Dimensional Strain as a New Prognosticator in Patients With Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009 Aug;54(7):618–24.
58. Negishi K, Negishi T, Haluska BA, Hare JL, Plana JC, Marwick TH. Use of speckle strain to assess left ventricular responses to cardiotoxic chemotherapy and cardioprotection. *European Heart Journal - Cardiovascular Imaging*. 2014 Mar 1;15(3):324–31.
59. Thavendiranathan P, Negishi T, Somerset E, Negishi K, Penicka M, Lemieux J, et al. Strain-Guided Management of Potentially Cardiotoxic Cancer Therapy. *Journal of the American College of Cardiology*. 2021 Feb;77(4):392–401.
60. Zhang KW, Finkelman BS, Gulati G, Narayan HK, Upshaw J, Narayan V, et al. Abnormalities in Three-Dimensional Left Ventricular Mechanics with Anthracycline Chemotherapy Are Associated with Systolic and Diastolic Dysfunction. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2018 Aug;11(8):1059–68.
61. Muraru D, Niero A, Rodriguez-Zanella H, Cherata D, Badano L. Three-dimensional speckle-tracking echocardiography: benefits and limitations of integrating myocardial mechanics with three-dimensional imaging. *Cardiovasc Diagn Ther*. 2018 Feb;8(1):101–17.
62. Quinaglia T, Gongora C, Awadalla M, Hassan MZO, Zafar A, Drobni ZD, et al. Global Circumferential and Radial Strain Among Patients With Immune Checkpoint Inhibitor Myocarditis. *JACC: Cardiovascular Imaging*. 2022 Sep;S1936878X22004053.
63. Riehle C, Bauersachs J. Small animal models of heart failure. *Cardiovasc Res*. 2019 Nov 1;115(13):1838–49.
64. Open Science Collaboration. Estimating the reproducibility of psychological science. *Science*. 2015 Aug 28;349(6251):aac4716.
65. Freedman LP, Cockburn IM, Simcoe TS. The Economics of Reproducibility in Preclinical Research. *PLoS Biol*. 2015 Jun 9;13(6):e1002165.

66. Leonard RCF, Williams S, Tulpule A, Levine AM, Oliveros S. Improving the therapeutic index of anthracycline chemotherapy: Focus on liposomal doxorubicin (Myocet™). *The Breast*. 2009 Aug;18(4):218–24.
67. Gabizon AA, Patil Y, La-Beck NM. New insights and evolving role of pegylated liposomal doxorubicin in cancer therapy. *Drug Resistance Updates*. 2016 Nov;29:90–106.
68. Avila MS, Ayub-Ferreira SM, de Barros Wanderley MR, das Dores Cruz F, Gonçalves Brandão SM, Rigaud VOC, et al. Carvedilol for Prevention of Chemotherapy-Related Cardiotoxicity. *Journal of the American College of Cardiology*. 2018 May;71(20):2281–90.
69. Henriksen PA. Anthracycline cardiotoxicity: an update on mechanisms, monitoring and prevention. *Heart*. 2018 Jun;104(12):971–7.
70. Bisceglia I, Canale ML, Cartoni D, Matera S, Petrolati S. Prevention of chemotherapy-induced left ventricular dysfunction. *Eur Heart J Suppl*. 2021 Oct 8;23(Suppl E):E28–32.
71. Eneh C, Lekkala MR. Dexrazoxane [Internet]. *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing; 2021 [cited 2022 Jul 11]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560559/>
72. Tanaka E, Reddien PW. The cellular basis for animal regeneration. *Dev Cell*. 2011 Jul 19;21(1):172–85.
73. Becker AJ, McCULLOCH EA, Till JE. Cytological Demonstration of the Clonal Nature of Spleen Colonies Derived from Transplanted Mouse Marrow Cells. *Nature*. 1963 Feb;197(4866):452–4.
74. Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*. 2006 Jun;441(7097):1068–74.
75. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature*. 2001 Nov;414(6859):98–104.
76. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006 Aug;126(4):663–76.
77. Jopling C, Boue S, Belmonte JCI. Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 Feb;12(2):79–89.
78. Kamps JA, Krenning G. Micromanaging cardiac regeneration: Targeted delivery of microRNAs for cardiac repair and regeneration. *World J Cardiol*. 2016 Feb 26;8(2):163–79.
79. Menasché P, Alfieri O, Janssens S, McKenna W, Reichenspurner H, Trinquart L, et al. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) Trial: First Randomized Placebo-Controlled Study of Myoblast Transplantation. *Circulation*. 2008 Mar 4;117(9):1189–200.

80. Noiseux N, Mansour S, Weisel R, Stevens LM, Der Sarkissian S, Tsang K, et al. The IMPACT-CABG trial: A multicenter, randomized clinical trial of CD133+ stem cell therapy during coronary artery bypass grafting for ischemic cardiomyopathy. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2016 Dec;152(6):1582-1588.e2.
81. Fisher S, Doree C, Taggart D, Mathur A, Martin-Rendon E. Cell therapy for heart disease: Trial sequential analyses of two Cochrane reviews. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2016;100(1):88-101.
82. Spees JL, Lee RH, Gregory CA. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Res Ther*. 2016 Aug 31;7(1):125.
83. Bolli R, Perin EC, Willerson JT, Yang PC, Traverse JH, Henry TD, et al. Allogeneic Mesenchymal Cell Therapy in Anthracycline-Induced Cardiomyopathy Heart Failure Patients. *JACC CardioOncol*. 2020 Sep 30;2(4):581-95.
84. Li TS, Cheng K, Malliaras K, Smith RR, Zhang Y, Sun B, et al. Direct Comparison of Different Stem Cell Types and Subpopulations Reveals Superior Paracrine Potency and Myocardial Repair Efficacy With Cardiosphere-Derived Cells. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012 Mar;59(10):942-53.
85. van Berlo JH, Kanisicak O, Maillet M, Vagnozzi RJ, Karch J, Lin SCJ, et al. c-kit+ Cells Minimally Contribute Cardiomyocytes to the Heart. *Nature*. 2014 May 15;509(7500):337-41.
86. Zaruba MM, Soonpaa M, Reuter S, Field LJ. Cardiomyogenic potential of c-kit+ expressing cells derived from neonatal and adult mouse hearts. *Circulation*. 2010 May 11;121(18):1992-2000.
87. Sultana N, Zhang L, Yan J, Chen J, Cai W, Razzaque S, et al. Resident c-kit+ cells in the heart are not cardiac stem cells. *Nat Commun*. 2015 Dec;6(1):8701.
88. Makkar RR, Kereiakes DJ, Aguirre F, Kowalchuk G, Chakravarty T, Malliaras K, et al. Intracoronary ALLogeneic heart STem cells to Achieve myocardial Regeneration (ALLSTAR): a randomized, placebo-controlled, double-blinded trial. *European Heart Journal*. 2020 Sep 21;41(36):3451-8.
89. Bartunek J, Davison B, Sherman W, Povsic T, Henry TD, Gersh B, et al. Congestive Heart Failure Cardiopoietic Regenerative Therapy (CHART-1) trial design. *Eur J Heart Fail*. 2016 Feb;18(2):160-8.
90. Bolli R, Mitrani RD, Hare JM, Pepine CJ, Perin EC, Willerson JT, et al. A Phase II study of autologous mesenchymal stromal cells and c-kit positive cardiac cells, alone or in combination, in patients with ischaemic heart failure: the CCTRNCONCERT-HF trial. *Eur J Heart Fail*. 2021 Apr;23(4):661-74.
91. Menasché P, Vanneaux V, Hagege A, Bel A, Cholley B, Parouchev A, et al. Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiovascular Progenitors for Severe Ischemic Left Ventricular Dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2018 Jan;71(4):429-38.
92. Liu YW, Chen B, Yang X, Fugate JA, Kalucki FA, Futakuchi-Tsuchida A, et al. Human ESC-Derived Cardiomyocytes Restore Function in Infarcted Hearts of Non-Human Primates. *Nat Biotechnol*. 2018 Aug;36(7):597-605.

93. Ye J, Gaur M, Zhang Y, Sievers RE, Woods BJ, Aurigui J, et al. Treatment with hESC-Derived Myocardial Precursors Improves Cardiac Function after a Myocardial Infarction. *PLoS One*. 2015 Jul 31;10(7):e0131123.
94. Agarwal U, George A, Bhutani S, Ghosh-Choudary S, Maxwell J, Brown ME, et al. Experimental, Systems and Computational Approaches to Understanding the MicroRNA-Mediated Reparative Potential of Cardiac Progenitor Cell-Derived Exosomes From Pediatric Patients. *Circ Res*. 2017 Feb 17;120(4):701–12.
95. Ben-David U, Benvenisty N. The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat Rev Cancer*. 2011 Apr;11(4):268–77.
96. Desgres M, Menasché P. Clinical Translation of Pluripotent Stem Cell Therapies: Challenges and Considerations. *Cell Stem Cell*. 2019 Nov;25(5):594–606.
97. Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G, DiFede Velazquez DL, Zambrano JP, Suncion VY, et al. Comparison of Allogeneic vs Autologous Bone Marrow–Derived Mesenchymal Stem Cells Delivered by Transendocardial Injection in Patients With Ischemic Cardiomyopathy. *JAMA*. 2012 Dec 12;308(22):2369–79.
98. Bellamy V, Vanneaux V, Bel A, Nemetalla H, Emmanuelle Boitard S, Farouz Y, et al. Long-term functional benefits of human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors embedded into a fibrin scaffold. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2015 Sep;34(9):1198–207.
99. Sharma S, Mishra R, Bigham GE, Wehman B, Khan MM, Xu H, et al. A Deep Proteome Analysis Identifies the Complete Secretome as the Functional Unit of Human Cardiac Progenitor Cells. *Circ Res*. 2017 Mar 3;120(5):816–34.
100. Gnecci M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res*. 2008 Nov 21;103(11):1204–19.
101. Loyer X, Vion AC, Tedgui A, Boulanger CM. Microvesicles as Cell–Cell Messengers in Cardiovascular Diseases. *Circ Res*. 2014 Jan 17;114(2):345–53.
102. Cheng L, Hill AF. Therapeutically harnessing extracellular vesicles. *Nat Rev Drug Discov*. 2022 May;21(5):379–99.
103. van Niel G, D’Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018 Apr;19(4):213–28.
104. Munir J, Yoon JK, Ryu S. Therapeutic miRNA-Enriched Extracellular Vesicles: Current Approaches and Future Prospects. *Cells*. 2020 Oct 11;9(10):2271.
105. Ouyang Z, Wei K. miRNA in cardiac development and regeneration. *Cell Regen*. 2021 Dec;10(1):14.
106. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. 2018 Nov 23;7(1):1535750.

107. Yuan F, Li YM, Wang Z. Preserving extracellular vesicles for biomedical applications: consideration of storage stability before and after isolation. *Drug Deliv.* 28(1):1501–9.
108. Lima Correa B, El Harane N, Gomez I, Rachid Hocine H, Vilar J, Desgres M, et al. Extracellular vesicles from human cardiovascular progenitors trigger a reparative immune response in infarcted hearts. *Cardiovascular Research.* 2021 Jan 1;117(1):292–307.
109. Zhu X, Badawi M, Pomeroy S, Sutaria DS, Xie Z, Baek A, et al. Comprehensive toxicity and immunogenicity studies reveal minimal effects in mice following sustained dosing of extracellular vesicles derived from HEK293T cells. *Journal of Extracellular Vesicles.* 2017 Dec 1;6(1):1324730.
110. Ibrahim AGE, Cheng K, Marbán E. Exosomes as Critical Agents of Cardiac Regeneration Triggered by Cell Therapy. *Stem Cell Reports.* 2014 May 8;2(5):606–19.
111. El Harane N, Kervadec A, Bellamy V, Pidial L, Neametalla HJ, Perier MC, et al. Acellular therapeutic approach for heart failure: in vitro production of extracellular vesicles from human cardiovascular progenitors. *Eur Heart J.* 2018 May 21;39(20):1835–47.
112. Lai RC, Arslan F, Lee MM, Sze NSK, Choo A, Chen TS, et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Research.* 2010 May;4(3):214–22.
113. Khan M, Nickoloff E, Abramova T, Johnson J, Verma SK, Krishnamurthy P, et al. Embryonic Stem Cell-Derived Exosomes Promote Endogenous Repair Mechanisms and Enhance Cardiac Function Following Myocardial Infarction. *Circ Res.* 2015 Jun 19;117(1):52–64.
114. Sun SJ, Wei R, Li F, Liao SY, Tse HF. Mesenchymal stromal cell-derived exosomes in cardiac regeneration and repair. *Stem Cell Reports.* 2021 Jun 10;16(7):1662–73.
115. Sahoo S, Losordo DW. Exosomes and Cardiac Repair After Myocardial Infarction. *Circ Res.* 2014 Jan 17;114(2):333–44.
116. Amosse J, Carmen Martinez M, Le Lay S. Extracellular vesicles and cardiovascular disease therapy. *Stem Cell Investig.* 2017 Dec 20;4(12):102–102.
117. Lima Correa B, El Harane N, Desgres M, Perotto M, Alayrac P, Guillas C, et al. Extracellular vesicles fail to trigger the generation of new cardiomyocytes in chronically infarcted hearts. *Theranostics.* 2021 Nov 2;11(20):10114–24.
118. Kompa AR, Greening DW, Kong AM, McMillan PJ, Fang H, Saxena R, et al. Sustained subcutaneous delivery of secretome of human cardiac stem cells promotes cardiac repair following myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2020 Apr 6;117(3):918–29.
119. Wiklander OPB, Nordin JZ, O’Loughlin A, Gustafsson Y, Corso G, Mäger I, et al. Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting. *J Extracell Vesicles.* 2015 Apr 20;4:10.3402/jev.v4.26316.

120. Milano G, Biemmi V, Lazzarini E, Balbi C, Ciullo A, Bolis S, et al. Intravenous administration of cardiac progenitor cell-derived exosomes protects against doxorubicin/trastuzumab-induced cardiac toxicity. *Cardiovascular Research*. 2019 Apr 30;cvz108.
121. Vandergriff AC, de Andrade JBM, Tang J, Hensley MT, Piedrahita JA, Caranasos TG, et al. Intravenous Cardiac Stem Cell-Derived Exosomes Ameliorate Cardiac Dysfunction in Doxorubicin Induced Dilated Cardiomyopathy. *Stem Cells International*. 2015;2015:1–8.
122. Sun X, Shan A, Wei Z, Xu B. Intravenous mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorate myocardial inflammation in the dilated cardiomyopathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2018 Sep 18;503(4):2611–8.
123. Lazzarini E, Balbi C, Altieri P, Pfeffer U, Gambini E, Canepa M, et al. The human amniotic fluid stem cell secretome effectively counteracts doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Sci Rep*. 2016 Jul 21;6:29994.
124. Kervadec A, Bellamy V, El Harane N, Arakélian L, Vanneaux V, Cacciapuoti I, et al. Cardiovascular progenitor-derived extracellular vesicles recapitulate the beneficial effects of their parent cells in the treatment of chronic heart failure. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2016 Jun;35(6):795–807.
125. Barile L, Cervio E, Lionetti V, Milano G, Ciullo A, Biemmi V, et al. Cardioprotection by cardiac progenitor cell-secreted exosomes: role of pregnancy-associated plasma protein-A. *Cardiovasc Res*. 2018 Jun 1;114(7):992–1005.
126. Walravens AS, Smolgovsky S, Li L, Kelly L, Antes T, Peck K, et al. Mechanistic and therapeutic distinctions between cardiosphere-derived cell and mesenchymal stem cell extracellular vesicle non-coding RNA. *Sci Rep*. 2021 Dec;11(1):8666.
127. Saha P, Sharma S, Korutla L, Datla SR, Shoja-Taheri F, Mishra R, et al. Circulating exosomes derived from transplanted progenitor cells aid the functional recovery of ischemic myocardium. *Sci Transl Med*. 2019 May 22;11(493):eaau1168.
128. Malik ZA, Kott KS, Poe AJ, Kuo T, Chen L, Ferrara KW, et al. Cardiac myocyte exosomes: stability, HSP60, and proteomics. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013 Apr 1;304(7):H954–65.
129. Nishi M, Wang P yuan, Hwang PM. Cardiotoxicity of Cancer Treatments: Focus on Anthracycline Cardiomyopathy. *ATVB*. 2021 Nov;41(11):2648–60.
130. Niemelä J, Ylänen K, Suominen A, Pushparajah K, Mathur S, Sarkola T, et al. Cardiac Function After Cardiotoxic Treatments for Childhood Cancer—Left Ventricular Longitudinal Strain in Screening. *Front Cardiovasc Med*. 2021 Oct 18;8:715953.
131. Wysoczynki M, Khan A, Bolli R. New Paradigms in Cell Therapy: Repeated Dosing, Intravenous Delivery, Immunomodulatory Actions, and New Cell Types. *Circ Res*. 2018 Jul 6;123(2):138–58.
132. Reich H, Tseliou E, de Couto G, Angert D, Valle J, Kubota Y, et al. Repeated transplantation of allogeneic cardiosphere-derived cells boosts therapeutic benefits without immune sensitization in a rat model of myocardial infarction. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2016 Nov;35(11):1348–57.

133. Tang XL, Nakamura S, Li Q, Wysoczynski M, Gumpert AM, Wu WJ, et al. Repeated Administrations of Cardiac Progenitor Cells Are Superior to a Single Administration of an Equivalent Cumulative Dose. *J Am Heart Assoc.* 2018 Feb 13;7(4).
134. Arraud N, Linares R, Tan S, Gounou C, Pasquet JM, Mornet S, et al. Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2014;12(5):614–27.
135. Pouillet P, Carpentier S, Barillot E. myProMS, a web server for management and validation of mass spectrometry-based proteomic data. *PROTEOMICS.* 2007;7(15):2553–6.
136. The M, MacCoss MJ, Noble WS, Käll L. Fast and Accurate Protein False Discovery Rates on Large-Scale Proteomics Data Sets with Percolator 3.0. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2016;27(11):1719–27.
137. Valot B, Langella O, Nano E, Zivy M. MassChroQ: A versatile tool for mass spectrometry quantification. *PROTEOMICS.* 2011;11(17):3572–7.
138. Silva JC, Gorenstein MV, Li GZ, Vissers JPC, Geromanos SJ. Absolute Quantification of Proteins by LCMSE. *Molecular & Cellular Proteomics.* 2006 Jan;5(1):144–56.
139. Ahrné E, Molzahn L, Glatter T, Schmidt A. Critical assessment of proteome-wide label-free absolute abundance estimation strategies. *PROTEOMICS.* 2013;13(17):2567–78.
140. Perez-Riverol Y, Csordas A, Bai J, Bernal-Llinares M, Hewapathirana S, Kundu DJ, et al. The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jan 8;47(Database issue):D442–50.
141. Chaudhari U, Ellis JK, Wagh V, Nemade H, Hescheler J, Keun HC, et al. Metabolite signatures of doxorubicin induced toxicity in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Amino Acids.* 2017;49(12):1955–63.
142. Li M, Sala V, De Santis MC, Cimino J, Cappello P, Pianca N, et al. Phosphoinositide 3-Kinase Gamma Inhibition Protects From Anthracycline Cardiotoxicity and Reduces Tumor Growth. *Circulation.* 2018 Aug 14;138(7):696–711.
143. Altomare C, Lodrini AM, Milano G, Biemmi V, Lazzarini E, Bolis S, et al. Structural and Electrophysiological Changes in a Model of Cardiotoxicity Induced by Anthracycline Combined With Trastuzumab. *Front Physiol.* 2021 Apr 7;12:658790.
144. Zhou Y, Zhou B, Pache L, Chang M, Khodabakhshi AH, Tanaseichuk O, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat Commun.* 2019 Apr 3;10:1523.
145. Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Feb 23;113(8):E968–77.
146. Nie S, Wang X, Sivakumaran P, Chong MMW, Liu X, Karnezis T, et al. Biologically active constituents of the secretome of human W8B2+ cardiac stem cells. *Sci Rep.* 2018 Jan 25;8:1579.

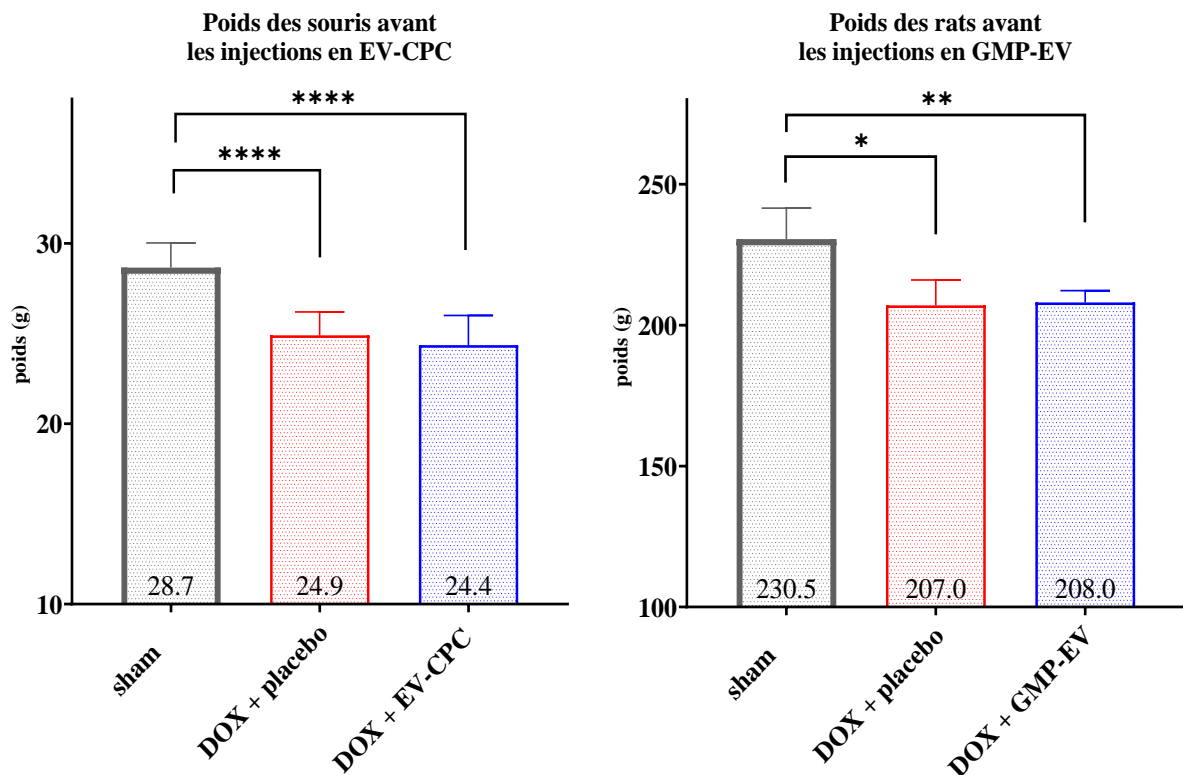
147. Rajan TS, Giacoppo S, Diomede F, Ballerini P, Paolantonio M, Marchisio M, et al. The secretome of periodontal ligament stem cells from MS patients protects against EAE. *Sci Rep*. 2016 Dec 7;6:38743.
148. Dinh PUC, Paudel D, Brochu H, Popowski KD, Gracieux MC, Cores J, et al. Inhalation of lung spheroid cell secretome and exosomes promotes lung repair in pulmonary fibrosis. *Nat Commun*. 2020 Feb 28;11:1064.
149. Cruz FF, Borg ZD, Goodwin M, Sokocevic D, Wagner DE, Coffey A, et al. Systemic Administration of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cell Extracellular Vesicles Ameliorates Aspergillus Hyphal Extract-Induced Allergic Airway Inflammation in Immunocompetent Mice. *Stem Cells Transl Med*. 2015 Nov;4(11):1302–16.
150. Zhao H, Li S, He L, Tang F, Han X, Deng W, et al. Ameliorating Effect of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in a Human Induced Pluripotent Stem Cell Model of Dravet Syndrome. *Mol Neurobiol*. 2022 Feb;59(2):748–61.
151. Kinoshita T, Yuzawa H, Natori K, Wada R, Yao S, Yano K, et al. Early electrocardiographic indices for predicting chronic doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Journal of Cardiology*. 2021 Apr;77(4):388–94.
152. Lewinter C, Nielsen TH, Edfors LR, Linde C, Bland JM, LeWinter M, et al. A systematic review and meta-analysis of beta-blockers and renin–angiotensin system inhibitors for preventing left ventricular dysfunction due to anthracyclines or trastuzumab in patients with breast cancer. *European Heart Journal*. 2022 Jul 14;43(27):2562–9.
153. Jeyaram A, Jay SM. Preservation and Storage Stability of Extracellular Vesicles for Therapeutic Applications. *AAPS J*. 2017 Nov 27;20(1):1.
154. Adamiak M, Cheng G, Bobis-Wozowicz S, Zhao L, Kedracka-Krok S, Samanta A, et al. Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)-Derived Extracellular Vesicles Are Safer and More Effective for Cardiac Repair than iPSCs. *Circ Res*. 2018 Jan 19;122(2):296–309.
155. Maji S, Yan IK, Parasramka M, Mohankumar S, Matsuda A, Patel T. In vitro toxicology studies of extracellular vesicles. *Journal of Applied Toxicology*. 2017;37(3):310–8.
156. Lener T, Gimona M, Aigner L, Börger V, Buzas E, Camussi G, et al. Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials – an ISEV position paper. *J Extracell Vesicles*. 2015 Dec 31;4:10.3402/jev.v4.30087.
157. Torán JL, López JA, Gomes-Alves P, Aguilar S, Torroja C, Trevisan-Herraz M, et al. Definition of a cell surface signature for human cardiac progenitor cells after comprehensive comparative transcriptomic and proteomic characterization. *Sci Rep*. 2019 Dec;9(1):4647.
158. Webb RL, Kaiser EE, Scoville SL, Thompson TA, Fatima S, Pandya C, et al. Human Neural Stem Cell Extracellular Vesicles Improve Tissue and Functional Recovery in the Murine Thromboembolic Stroke Model. *Transl Stroke Res*. 2018;9(5):530–9.
159. Aminzadeh MA, Rogers RG, Fournier M, Tobin RE, Guan X, Childers MK, et al. Exosome-Mediated Benefits of Cell Therapy in Mouse and Human Models of Duchenne Muscular Dystrophy. *Stem Cell Reports*. 2018 Mar 1;10(3):942–55.

160. Yi YW, Lee JH, Kim SY, Pack CG, Ha DH, Park SR, et al. Advances in Analysis of Biodistribution of Exosomes by Molecular Imaging. *Int J Mol Sci.* 2020 Jan 19;21(2):665.
161. Patel S, Schmidt KF, Farhoud M, Zi T, Jang SC, Dooley K, et al. In vivo tracking of [⁸⁹Zr]Zr-labeled engineered extracellular vesicles by PET reveals organ-specific biodistribution based upon the route of administration. *Nuclear Medicine and Biology.* 2022 Sep;112–113:20–30.
162. Singla DK, Ahmed A, Singla R, Yan B. Embryonic Stem Cells Improve Cardiac Function in Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy Mediated through Multiple Mechanisms. *Cell Transplant.* 2012;21(9):1919–30.
163. Hare JM, Traverse JH, Henry TD, Dib N, Strumpf RK, Schulman SP, et al. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Dose-Escalation Study of Intravenous Adult Human Mesenchymal Stem Cells (Prochymal) After Acute Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2009 Dec 8;54(24):2277–86.
164. Bartolucci J, Verdugo FJ, González PL, Larrea RE, Abarzua E, Goset C, et al. Safety and Efficacy of the Intravenous Infusion of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Patients With Heart Failure. *Circ Res.* 2017 Oct 27;121(10):1192–204.
165. Butler J, Epstein SE, Greene SJ, Quyyumi AA, Sikora S, Kim RJ, et al. Intravenous Allogeneic Mesenchymal Stem Cells for Nonischemic Cardiomyopathy: Safety and Efficacy Results of a Phase II-A Randomized Trial. *Circ Res.* 2017 Jan 20;120(2):332–40.
166. McDonald CM, Marbán E, Hendrix S, Hogan N, Ruckdeschel Smith R, Eagle M, et al. Repeated intravenous cardiosphere-derived cell therapy in late-stage Duchenne muscular dystrophy (HOPE-2): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *The Lancet.* 2022 Mar;399(10329):1049–58.
167. van Koppen A, Joles JA, van Balkom BWM, Lim SK, de Kleijn D, Giles RH, et al. Human Embryonic Mesenchymal Stem Cell-Derived Conditioned Medium Rescues Kidney Function in Rats with Established Chronic Kidney Disease. Dussaule JC, editor. *PLoS ONE.* 2012 Jun 19;7(6):e38746.
168. Mansouri N, Willis GR, Fernandez-Gonzalez A, Reis M, Nassiri S, Mitsialis SA, et al. Mesenchymal stromal cell exosomes prevent and revert experimental pulmonary fibrosis through modulation of monocyte phenotypes. *JCI Insight.* 2019 Nov 1;4(21):e128060.
169. Yao J, Zheng J, Cai J, Zeng K, Zhou C, Zhang J, et al. Extracellular vesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate rat hepatic ischemia-reperfusion injury by suppressing oxidative stress and neutrophil inflammatory response. *FASEB j.* 2019 Feb;33(2):1695–710.
170. Williams AM, Denny IS, Bhatti UF, Halaweish I, Xiong Y, Chang P, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Provide Neuroprotection and Improve Long-Term Neurologic Outcomes in a Swine Model of Traumatic Brain Injury and Hemorrhagic Shock. *Journal of Neurotrauma.* 2019 Jan;36(1):54–60.
171. Hou D, Youssef EAS, Brinton TJ, Zhang P, Rogers P, Price ET, et al. Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde

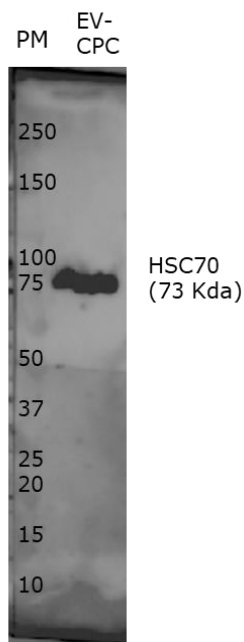
- coronary venous delivery: implications for current clinical trials. *Circulation*. 2005 Aug 30;112(9 Suppl):I150-156.
172. Yang L, Zhu J, Zhang C, Wang J, Yue F, Jia X, et al. Stem cell-derived extracellular vesicles for myocardial infarction: a meta-analysis of controlled animal studies. *Aging (Albany NY)*. 2019 Feb 21;11(4):1129–50.
173. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, Rodrigues G, Hashimoto A, Mark MT, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature*. 2015 Nov 19;527(7578):329–35.
174. Tuzovic M, Wu PT, Kianmahd S, Nguyen KL. Natural History of Myocardial Deformation in Children, Adolescents and Young Adults Exposed to Anthracyclines: Systematic Review and Meta-Analysis. *Echocardiography*. 2018 Jul;35(7):922–34.
175. Ewer MS, Ewer SM. Cardiotoxicity of anticancer treatments. *Nat Rev Cardiol*. 2015 Sep;12(9):547–58.
176. Nair AB, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J Basic Clin Pharm*. 2016 Mar;7(2):27–31.
177. de Abreu RC, Fernandes H, da Costa Martins PA, Sahoo S, Emanuelli C, Ferreira L. Native and engineered extracellular vesicles for cardiovascular therapeutics. *Nat Rev Cardiol*. 2020 Nov;17(11):685–97.
178. Antes TJ, Middleton RC, Luther KM, Ijichi T, Peck KA, Liu WJ, et al. Targeting extracellular vesicles to injured tissue using membrane cloaking and surface display. *J Nanobiotechnology*. 2018 Aug 30;16:61.
179. Lo CY, Weil BR, Palka BA, Momeni A, Canty JM, Neelamegham S. Cell surface glycoengineering improves selectin-mediated adhesion of mesenchymal stem cells (MSCs) and cardiosphere-derived cells (CDCs): pilot validation in porcine ischemia-reperfusion model. *Biomaterials*. 2016 Jan;74:19–30.
180. Vilquin JT, Etienne J. Thérapies cellulaires des cardiopathies: Évolution du paradigme. *Med Sci (Paris)*. 2016 Nov;32:30–9.
181. Pezzana C, Agnely F, Bochot A, Siepmann J, Menasché P. Extracellular Vesicles and Biomaterial Design: New Therapies for Cardiac Repair. *Trends in Molecular Medicine*. 2021 Mar;27(3):231–47.
182. Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell*. 2009 Jul 2;5(1):54–63.
183. Huang A, Liu Y, Qi X, Chen S, Huang H, Zhang J, et al. Intravenously transplanted mesenchymal stromal cells: a new endocrine reservoir for cardioprotection. *Stem Cell Res Ther*. 2022 Dec;13(1):253.
184. Shimamura Y, Furuhashi K, Tanaka A, Karasawa M, Nozaki T, Komatsu S, et al. Mesenchymal stem cells exert renoprotection via extracellular vesicle-mediated modulation of M2 macrophages and spleen-kidney network. *Commun Biol*. 2022 Dec;5(1):753.

185. Robbins PD, Morelli AE. Regulation of Immune Responses by Extracellular Vesicles. *Nat Rev Immunol*. 2014 Mar;14(3):195–208.
186. You MJ, Bang M, Park HS, Yang B, Jang KB, Yoo J, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells alleviate schizophrenia-relevant behaviors in amphetamine-sensitized mice by inhibiting neuroinflammation. *Transl Psychiatry*. 2020 Apr 27;10:123.
187. Willis GR, Fernandez-Gonzalez A, Anastas J, Vitali SH, Liu X, Ericsson M, et al. Mesenchymal Stromal Cell Exosomes Ameliorate Experimental Bronchopulmonary Dysplasia and Restore Lung Function through Macrophage Immunomodulation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018 Jan 1;197(1):104–16.
188. Wang C, Börger V, Sardari M, Murke F, Skuljec J, Pul R, et al. Mesenchymal Stromal Cell-Derived Small Extracellular Vesicles Induce Ischemic Neuroprotection by Modulating Leukocytes and Specifically Neutrophils. *Stroke*. 2020 Jun;51(6):1825–34.
189. Rong Y, Liu W, Wang J, Fan J, Luo Y, Li L, et al. Neural stem cell-derived small extracellular vesicles attenuate apoptosis and neuroinflammation after traumatic spinal cord injury by activating autophagy. *Cell Death Dis*. 2019 Apr 18;10(5):340.
190. Rogers RG, Fournier M, Sanchez L, Ibrahim AG, Aminzadeh MA, Lewis MI, et al. Disease-modifying bioactivity of intravenous cardiosphere-derived cells and exosomes in mdx mice. *JCI Insight*. 2019 Apr 4;4(7):e125754.
191. Fabiani I, Aimò A, Grigoratos C, Castiglione V, Gentile F, Saccaro LF, et al. Oxidative stress and inflammation: determinants of anthracycline cardiotoxicity and possible therapeutic targets. *Heart Fail Rev*. 2021 Jul;26(4):881–90.
192. Chan BYH, Roczowski A, Cho WJ, Poirier M, Sergi C, Keschrums V, et al. MMP inhibitors attenuate doxorubicin cardiotoxicity by preventing intracellular and extracellular matrix remodelling. *Cardiovascular Research*. 2021 Jan 1;117(1):188–200.
193. Wu R, Wang HL, Yu HL, Cui XH, Xu MT, Xu X, et al. Doxorubicin toxicity changes myocardial energy metabolism in rats. *Chemico-Biological Interactions*. 2016 Jan;244:149–58.
194. O'Brien CG, Ozen MO, Ikeda G, Vaskova E, Jung JH, Bayardo N, et al. Mitochondria-Rich Extracellular Vesicles Rescue Patient-Specific Cardiomyocytes From Doxorubicin Injury. *JACC CardioOncol*. 2021 Jul 27;3(3):428–40.

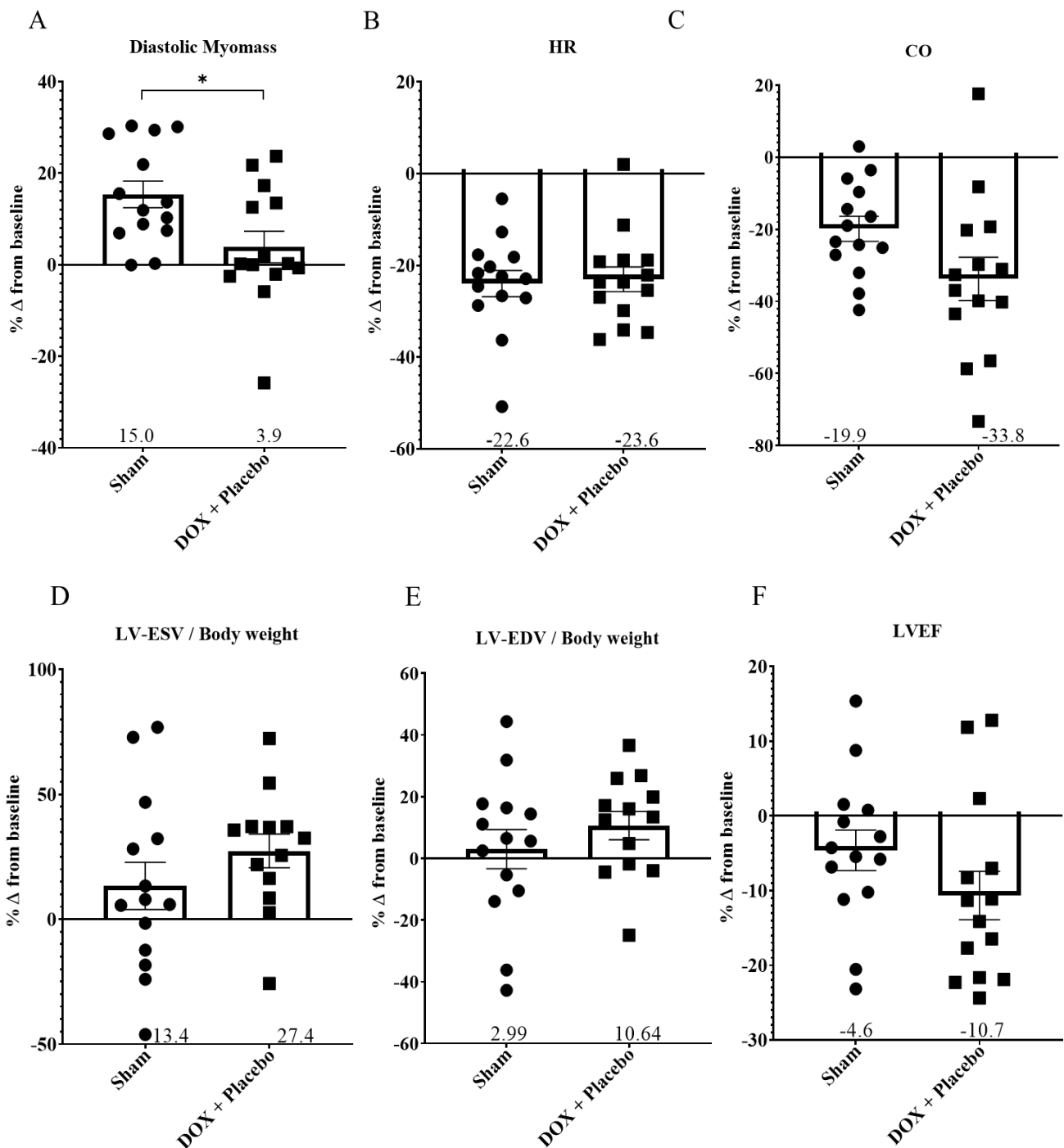
Annexes



Annexe Figure 1 : Répartition des groupes de traitement en fonction de la clinique des animaux. Afin d'éviter les biais de sélection et d'assurer la comparabilité des mesures, les animaux traités à la DOX (souris et rats) ont été répartis entre les groupes d'EV-CPC (ou GMP-EV) et de contrôles (DOX+placebo) sur la base de leur état clinique à la fin de la chimiothérapie, principalement via leur poids. (Median +/-IQR). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, **** $p \leq 0.0001$



Annexe Figure 2 : Preuve protéique de l'encapsulation de matériel intracellulaire dans les EV-CPC. Western Blot anti-HSC70 sur les EV-CPC. MW, PM : poids moléculaire



Annexe Figure 3 : Paramètres cardiaques volumétriques avec inclusion des muscles papillaires dans la segmentation du diamètre interne. (A) Myomasse diastolique en pourcentage de variation par rapport aux valeurs basales (moyenne+/-SEM), (B) Fréquence cardiaque en pourcentage de variation par rapport aux valeurs basales (moyenne+/-SEM), (C) débit cardiaque en pourcentage de variation par rapport aux valeurs basales, (D) et (E) VTS et VTD normalisés par le poids corporel en pourcentage de changement par rapport aux valeurs basales (Moyenne+/-SEM), et (F) FEVG en pourcentage de variation par rapport aux valeurs basales (Moyenne+/-SEM). (Sham : n=14 ; DOX+Placebo : n=14) ; *p≤0,05. *Myomasse : masse ventriculaire diastolique musculaire, LV-ESF/LV-EDV : fonction systolique/diastolique ventriculaire gauche (%), LVEF : fraction d'éjection ventriculaire gauche (%)*

gene	Sequence Forward (5' => 3')	Sequence Reverse (5' => 3')	annealing temperature (°C)
NPPA	AGTGCGGTGTCCAACACAGATCTGA	GCGGCCCTGCTTCCTCAGTC	64,1
Timp1	GGGCCGCCTAAGGAACGGAAATTTG	GGGCCCAAGGGATCTCCAGGTG	64,5
Myh6	CACCGGGAAAATCTGAACAAGCTGA	CAGCGCACAAAGTGAGGGTGG	58,4
Myh7	AGCGCAGAGACTCCCTGCTGATT	TGCGGCGAGCCTCAGACTTCTCTA	63,9
Col1a1	TGCCCTCCTGACGCATGGCCAAGA	CCTCGGGTTTCCACGTCTCACCATT	62,8
CCN2	GCTGCGAGGAGTGGGTGTGTGACGA	GAGGCGGCTCTGCTTCTCCAGT	65,7
POSTN	GCGGCAAGACAAGCGCTTTAGCA	CCGGGCTGTGTCAGGAGATCTTT	61,0
HPRT	AGCAGTACAGCCCCAAAATGGTT	CTGGCCTGTATCCAACACTTCGACA	59,2

Annexe Tableau 1 : Liste des primers utilisés pour les analyses en qRT-PCR

Gene Symbol	Description	Nature
Sult1a1	sulfotransferase family 1A, phenol-preferring, member 1	Coding
Fmo2	flavin containing monooxygenase 2	Multiple_Complex
Xdh	xanthine dehydrogenase; xanthine dehydrogenase (Xdh), mRNA.	Multiple_Complex
Vmn1r238	vomer nasal 1 receptor, 238	Coding
Fah	fumarylacetoacetate hydrolase	Multiple_Complex
Prepl	prolyl endopeptidase-like	Multiple_Complex
Gnl2	guanine nucleotide binding protein-like 2 (nucleolar)	Multiple_Complex
Myom2	myomesin 2	Multiple_Complex
Steap4	STEAP family member 4	Coding
Pnp2	purine-nucleoside phosphorylase 2	Coding
Tbc1d15	TBC1 domain family, member 15	Multiple_Complex
Nnt	nicotinamide nucleotide transhydrogenase; nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt), transcript variant 2, long non-coding RNA.	Multiple_Complex
Slc6a6	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6	Coding
Idh2	isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial	Multiple_Complex
Lepr	leptin receptor	Multiple_Complex
Bckdhb	branched chain ketoacid dehydrogenase E1, beta polypeptide	Coding
Nrap	nebulin-related anchoring protein; nebulin-related anchoring protein (Nrap), transcript variant 1, mRNA.	Coding
Hnrnpa1; Gm5643; Gm10052	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1; predicted gene 5643 (Gm5643), non-coding RNA.; heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 pseudogene; predicted pseudogene 10052 (Gm10052), non-coding RNA.; heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (Hnrnpa1), transcript variant 2,	Multiple_Complex

	mRNA.; heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (Hnrnpa1), transcript variant 1, mRNA.	
Aldh9a1	aldehyde dehydrogenase 9, subfamily A1	Coding
Pde2a	phosphodiesterase 2A, cGMP-stimulated	Coding
Pkp2	plakophilin 2	Coding
Tcp11l2	t-complex 11 (mouse) like 2	Multiple_Complex
Dtna	dystrobrevin alpha; dystrobrevin alpha (Dtna), transcript variant 1, mRNA.	Multiple_Complex
Tcaim	T cell activation inhibitor, mitochondrial	Multiple_Complex
Hsd17b10	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 10	Multiple_Complex
Nop56; Snord57	NOP56 ribonucleoprotein; small nucleolar RNA, C/D box 57	Multiple_Complex
Tm9sf2	transmembrane 9 superfamily member 2	Coding
Psmc11	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 11	Multiple_Complex
Prosc	proline synthetase co-transcribed	Coding
Stx7	syntaxin 7	Coding
Nuak1	NUAK family, SNF1-like kinase, 1	Multiple_Complex
Nufip1	nuclear fragile X mental retardation protein interacting protein 1	Coding
Ap3b1	adaptor-related protein complex 3, beta 1 subunit	Coding
Gm6568	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9 pseudogene; predicted pseudogene 6568 (Gm6568), non-coding RNA.	Multiple_Complex
Txnip	thioredoxin interacting protein	Multiple_Complex
Sema3g	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3G	Multiple_Complex
Anxa6	annexin A6	Multiple_Complex
Gk	glycerol kinase	Multiple_Complex
Pdcd6	programmed cell death 6	Coding
Rab11a	RAB11A, member RAS oncogene family; RAB11a, member RAS oncogene family	Multiple_Complex
Ypel3	yippee-like 3 (Drosophila); Synthetic construct Mus musculus clone IMAGE:100016496, MGC:184571 yippee-like 3 (Drosophila) (Ypel3) mRNA, encodes complete protein.	Multiple_Complex
Cish	cytokine inducible SH2-containing protein	Multiple_Complex
Mbnl2	muscleblind-like 2	Multiple_Complex
Plekhj1	pleckstrin homology domain containing, family J member 1	Coding
Snx4	sorting nexin 4	Multiple_Complex
Akap8l	A kinase (PRKA) anchor protein 8-like	Coding
Cry2	cryptochrome 2 (photolyase-like)	Multiple_Complex
Ehhadh	enoyl-Coenzyme A, hydratase/3-hydroxyacyl Coenzyme A dehydrogenase	Coding
Acad12	acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member 12	Coding
Bmp6	bone morphogenetic protein 6	Coding
Eci2	enoyl-Coenzyme A delta isomerase 2	Multiple_Complex
Rlim	ring finger protein, LIM domain interacting	Multiple_Complex
Nadk2	NAD kinase 2, mitochondrial	Multiple_Complex
Rnf19a; Mir8097	ring finger protein 19A; microRNA 8097	Multiple_Complex
Snrpn; Snurf	small nuclear ribonucleoprotein N; SNRPN upstream reading frame	Coding
Pvr	poliovirus receptor	Multiple_Complex
Arell	apoptosis resistant E3 ubiquitin protein ligase 1	Multiple_Complex
Gcdh	glutaryl-Coenzyme A dehydrogenase	Multiple_Complex

Med7	mediator complex subunit 7	Multiple_Complex
Zdhhc4	zinc finger, DHHC domain containing 4	Multiple_Complex
Amy1	amylase 1, salivary	Multiple_Complex
Atp6v1b2	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V1 subunit B2	Multiple_Complex
Gart	phosphoribosylglycinamide formyltransferase	Multiple_Complex
Mut	methylmalonyl-Coenzyme A mutase	Coding
Npat	nuclear protein in the AT region; Synthetic construct Mus musculus clone IMAGE:100069484, MGC:199386 nuclear protein in the AT region (Npat) mRNA, encodes complete protein.	Multiple_Complex
Npm1	nucleophosmin 1	Multiple_Complex
Rbm24	RNA binding motif protein 24	Coding
Twistnb	twist basic helix-loop-helix transcription factor 1 neighbor; TWIST neighbor	Coding
Usp54	ubiquitin specific peptidase 54	Multiple_Complex
Mrps18b	mitochondrial ribosomal protein S18B	Multiple_Complex
Pcdhb17	protocadherin beta 17	Coding
Supt5	suppressor of Ty 5	Multiple_Complex
Wdr45	WD repeat domain 45	Multiple_Complex
Wdr70	WD repeat domain 70	Multiple_Complex
Zfp612	zinc finger protein 612	Multiple_Complex
Ddx52	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 52	Multiple_Complex
Fam126b	family with sequence similarity 126, member B	Multiple_Complex
Rfc4	replication factor C (activator 1) 4	Multiple_Complex
Taf9b	TAF9B RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor	Coding
Trim23	tripartite motif-containing 23	Multiple_Complex
Uri1	URI1, prefoldin-like chaperone	Multiple_Complex
Cdc16	CDC16 cell division cycle 16	Multiple_Complex
Srfbp1	serum response factor binding protein 1	Coding
Tns2	tensin 2	Coding
Fam58b	family with sequence similarity 58, member B	Coding
Rpl7a	ribosomal protein L7A	Multiple_Complex
Vps16	vacuolar protein sorting 16 (yeast)	Multiple_Complex
2700097O09Rik	RIKEN cDNA 2700097O09 gene	Multiple_Complex
Hmgb1-ps6	high mobility group box 1, pseudogene 6	Multiple_Complex
Hmgb1-ps9; Gm6115	high mobility group box 1, pseudogene 9 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:96115]; PREDICTED: predicted gene 6115 (Gm6115), mRNA.	Multiple_Complex
Pdlim5	PDZ and LIM domain 5	Multiple_Complex
Pwp1	PWP1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	Multiple_Complex
Timm17b	translocase of inner mitochondrial membrane 17b	Multiple_Complex
Tmem161b	transmembrane protein 161B	Multiple_Complex
Trdmt1	tRNA aspartic acid methyltransferase 1	Multiple_Complex
Zfp810	zinc finger protein 810	Multiple_Complex
Csnk1g3	casein kinase 1, gamma 3	Multiple_Complex
F3	coagulation factor III	Coding
Hnrnpf	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	Coding
Ilf2	interleukin enhancer binding factor 2	Coding
Ptpmt1	protein tyrosine phosphatase, mitochondrial 1	Multiple_Complex
Scn7a	sodium channel, voltage-gated, type VII, alpha	Coding
Txndc9	thioredoxin domain containing 9	Multiple_Complex

Atg4b	autophagy related 4B, cysteine peptidase	Multiple_Complex
Atxn7l3b	ataxin 7-like 3B	Multiple_Complex
Cpt1b	carnitine palmitoyltransferase 1b, muscle	Multiple_Complex
Gm5643	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 pseudogene	Multiple_Complex
Gsta3	glutathione S-transferase, alpha 3	Multiple_Complex
Ighv2-2	immunoglobulin heavy variable 2-2	Coding
Olfml2b	olfactomedin-like 2B	Multiple_Complex
Orc3	origin recognition complex, subunit 3	Multiple_Complex
Pccb	propionyl Coenzyme A carboxylase, beta polypeptide	Multiple_Complex
Ppp1r11	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 11	Coding
Vps36	vacuolar protein sorting 36 (yeast)	Multiple_Complex
Dimt1	DIM1 dimethyladenosine transferase 1-like (<i>S. cerevisiae</i>)	Coding
Grx	glutaredoxin	Coding
Kdm3a	lysine (K)-specific demethylase 3A	Coding
Rps3; Snord15b	ribosomal protein S3; small nucleolar RNA, C/D box 14B	Multiple_Complex
Tmx4	thioredoxin-related transmembrane protein 4	Multiple_Complex
9030025P20Rik	RIKEN cDNA 9030025P20 gene	Coding
Abcb1a	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1A	Multiple_Complex
Adap2	ArfGAP with dual PH domains 2	Coding
Ddrk1	DDRGK domain containing 1	Multiple_Complex
Itpril1	inositol 1,4,5-triphosphate receptor interacting protein-like 1	Coding
Me3	malic enzyme 3, NADP(+)-dependent, mitochondrial	Multiple_Complex
Mfn2	mitofusin 2	Multiple_Complex
Pln	phospholamban	Coding
Rbm7	RNA binding motif protein 7	Multiple_Complex
Srp54a	signal recognition particle 54A	Multiple_Complex
Trpc4ap	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4 associated protein	Multiple_Complex
Vps41	vacuolar protein sorting 41 (yeast)	Multiple_Complex
Zfp868	zinc finger protein 868	Multiple_Complex
Ddx18	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 18	Multiple_Complex
Sec61a2	Sec61, alpha subunit 2 (<i>S. cerevisiae</i>)	Multiple_Complex
Ube2q2	ubiquitin-conjugating enzyme E2Q (putative) 2	Multiple_Complex
Wdr41	WD repeat domain 41	Coding
Xpa	xeroderma pigmentosum, complementation group A	Multiple_Complex
9930038B18Rik	RIKEN cDNA 9930038B18 gene	Multiple_Complex
Hcn4	hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated K⁺ 4; Synthetic construct Mus musculus clone IMAGE:100068371, MGC:195915 hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated K⁺ 4 (Hcn4) mRNA, encodes complete protein.	Coding
Olfr426; Olfr427	olfactory receptor 426; olfactory receptor 427	Coding
Ttc39d	tetratricopeptide repeat domain 39D	Coding
Cabs1	calcium binding protein, spermatid specific 1	Coding
Snrpd3	small nuclear ribonucleoprotein D3	Coding
Tas2r131	taste receptor, type 2, member 131	Coding
Rd3l	retinal degeneration 3-like	Multiple_Complex
Sowahc	sosondowah ankyrin repeat domain family member C	Multiple_Complex
Olfr1100	olfactory receptor 1100	Coding
Olfr349-ps1	olfactory receptor 349, pseudogene 1	Multiple_Complex
Vmn1r199	vomer nasal 1 receptor 199	Coding

4933428M09Rik	RIKEN cDNA 4933428M09 gene	Coding
Ear-ps7	eosinophil-associated, ribonuclease A family, pseudogene 7	Multiple_Complex
Olfr1129	olfactory receptor 1129	Coding
Krtap4-2	keratin associated protein 4-2; Synthetic construct Mus musculus clone IMAGE:100062146, MGC:190382 keratin associated protein 4-2 (Krtap4-2) mRNA, encodes complete protein.	Coding
Olfr392	olfactory receptor 392	Coding
Traj3	T cell receptor alpha joining 3	Multiple_Complex
Cdrt4	CMT1A duplicated region transcript 4	Coding
Clca4c-ps	chloride channel accessory 4C, pseudogene	Coding
Olfr1170	olfactory receptor 1170	Coding
Olfr584	olfactory receptor 584	Coding
Gzma	granzyme A	Coding
Cyp2j7-ps3	cytochrome P450, family 2, subfamily j, polypeptide 7, pseudogene 3 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:3651269]	Multiple_Complex
Taok1	TAO kinase 1; Synthetic construct Mus musculus clone IMAGE:100069464, MGC:199366 TAO kinase 1 (Taok1) mRNA, encodes complete protein.	Multiple_Complex
Magea9-ps	melanoma antigen, family A, 9, pseudogene	Multiple_Complex
Olfr148	olfactory receptor 148	Coding
Igkv1-35	immunoglobulin kappa variable 1-35	Coding
Fam78a	family with sequence similarity 78, member A	Multiple_Complex
Krtap19-5	keratin associated protein 19-5	Coding
Ppp2r5a	protein phosphatase 2, regulatory subunit B, alpha; protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), alpha isoform; protein phosphatase 2, regulatory subunit B', alpha	Multiple_Complex
Nes	nestin	Multiple_Complex
Olfr974	olfactory receptor 974	Coding
Mir5125	microRNA 5125	Multiple_Complex
Olfr653	olfactory receptor 653	Coding
Olfr145	olfactory receptor 145	Coding

Annexe Tableau 2 : Analyse transcriptomique des cœurs de souris. Liste complète des 173 gènes spécifiquement modifiés par le traitement par les EV-CPC : les gènes régulés à la hausse et à la baisse sont respectivement sur fonds rouge et bleu. Les gènes pertinents mentionnés dans le texte sont en gras.

Résumés

Titre : Utilisation de vésicules extracellulaires dérivées de cellules cardiaques progénitrices pour le traitement des cardiopathies induites par chimiothérapie

Résumé :

Au cours des dernières années, le pronostic de nombreux cancers s'est nettement amélioré mais l'une des rançons de ce succès est la survenue possible chez les survivants d'une cardiomyopathie induite par la chimiothérapie, souvent sévère et pouvant advenir à distance du traitement. La cardio-oncologie à l'interface entre ces deux pathologies est donc une discipline transversale dont le but est la facilitation des thérapies efficaces contre le cancer tout en minimisant leurs séquelles cardiovasculaires. Les résultats inconstants des médicaments classiques dans ces pathologies justifient d'explorer de nouvelles approches thérapeutiques parmi lesquelles la thérapie cellulaire. Il est aujourd'hui acquis que les actions cardio-protectrices attribuées à certaines cellules ne sont pas dépendantes de leur intégration à long terme dans le myocarde mais relèvent d'effets paracrines largement médiés par la libération in situ du sécrétome enrichi en vésicules extracellulaires (VEs). Ces VEs sont internalisées dans les cellules cibles du tissu cardiaque où elles libèrent leur contenu (essentiellement composé de protéines, lipides et acides nucléiques) induisant ainsi des changements transcriptionnels de voies de signalisation impliquées dans la régulation de la fonction cardiaque et qui peuvent ainsi contribuer à sa préservation. Par rapport à la thérapie cellulaire, l'utilisation du sécrétome cellulaire produit *ex vivo* présente plusieurs avantages : il est stable s'il est cryo-préservé, il est peu immunogène et des procédés de fabrication standardisés de type pharmaceutique sont possibles.

Après avoir documenté les effets cardio-protecteurs de ces VEs dans un modèle murin de cardiopathie ischémique (par diminution de la fibrose et modulation locale et systémique de l'inflammation), notre équipe cherche actuellement à établir si les VEs peuvent aussi agir sur les principales anomalies chimio-induites (stress oxydatif et métabolique et perte de force contractile).

In vitro nous avons mis en évidence que les VEs pouvaient améliorer la capacité des cardiomyocytes à produire l'énergie nécessaire à leur contraction. *In vivo*, sur des modèles murins, nous avons mis au point des protocoles expérimentaux proches des stratégies cliniques sous forme d'une administration intraveineuse et donc répétable des VEs et un suivi précis des atteintes myocardiques par Imagerie par Résonance Magnétique adaptée au petit animal. Les nouvelles recommandations des sociétés savantes actent que des marqueurs précoces de la dégradation fonctionnelle cardiaque doivent être recherchés ; tel est le cas de la déformabilité myocardique évaluée par la mesure du strain que nous avons choisi de privilégier dans ce projet. Par ailleurs, l'analyse du cargo protéique des VEs a montré son effet protecteur contre l'altération du métabolisme énergétique, ce qui est en accord avec la nature des voies de signalisations impactées *in vivo*. Finalement, en vue d'une application chez l'homme, l'étude préclinique de l'efficacité fonctionnelle des VEs produites selon un protocole compatible avec les Bonnes Pratiques de Fabrication a été le dernier objectif de cette thèse. Le but à long terme est de mettre à disposition des cliniciens un médicament biologique dérivé de cellules et susceptible d'améliorer le pronostic des cardiopathies post-chimiothérapie dont la gravité peut compromettre le bénéfice d'un traitement anti-cancéreux pourtant efficace sur la maladie causale.

Mots clefs : progéniteur cardiaque, sécrétome, cardiomyopathie induite par la chimiothérapie, déformabilité myocardique, métabolisme énergétique

Title : Use of cardiac progenitor cell-derived extracellular vesicles for the treatment of chemotherapy-induced cardiomyopathies

Abstract :

Over the recent years, the prognosis of many cancers has improved significantly, but one of the consequences of this success is the possible occurrence of chemotherapy-induced cardiomyopathy in survivors, which is often severe and may take place long after the treatment. Cardio-oncology at the interface between these two diseases is therefore a cross-disciplinary field whose goal is to facilitate effective cancer therapies while minimizing their cardiovascular sequelae. The inconsistent results of classical drugs in these pathologies justify the exploration of new therapeutic approaches, including cell therapy. It is now known that the cardio-protective actions attributed to some cells are not dependent on their long-term integration in the myocardium but are more likely due to paracrine effects largely mediated by the *in situ* release of the extracellular-vesicle-enriched-secretome (EVs). These EVs are internalized into the target cells of the cardiac tissue where they release their content (mainly proteins, lipids and nucleic acids), thus inducing transcriptional changes in signaling pathways involved in the regulation of cardiac function and as such, they may contribute to its preservation. Compared to cell therapy, the use of the *ex vivo* produced cell-secretome has distinct advantages: it is stable if cryopreserved, it is not immunogenic and standardized pharmaceutical-type manufacturing processes are possible.

After having documented the cardio-protective effects of these EVs in a mouse model of ischemic heart disease (by decreased fibrosis and modulation of local and systemic inflammation), our team is currently assessing whether EVs can also act on the main chemo-induced abnormalities (oxidative and metabolic stress and loss of contractile strength).

In vitro, we have demonstrated that EVs could improve the capacity of cardiomyocytes to produce the energy necessary for their contraction. *In vivo*, in murine models, we have developed experimental protocols close to clinical strategies under the form of an intravenous, and thus repeatable, administration of EVs and a precise follow-up of the myocardial damage by Magnetic Resonance Imaging adapted to the small animal. The new recommendations of the scientific societies state that markers of cardiac functional degradation should be detected early; such is the case for myocardial deformability assessed by the measurement of strain that we have selected to privilege in this project. Moreover, the analysis of the EV protein cargo shows its protective effect against the alteration of energy metabolism, which is in agreement with the nature of the signaling pathways involved *in vivo*. Finally, in view of a translation to humans, the pre-clinical study of the functional efficacy of EVs produced according to a protocol consistent with Good Manufacturing Practices has been the last objective of this thesis. The long-term goal is to provide clinicians with a cell-derived biological drug which could improve the prognosis of chemotherapy-induced cardiomyopathy, the severity of which may compromise the benefit of anti-cancer treatment, even though it has been effective against the causative disease.

Keywords : cardiac progenitor, secretome, chemotherapy-induced cardiomyopathy, cardiac strain, energetic metabolism

Publication annexe

Contenu sous droits.

Contenu sous droits.

Contenu sous droits.

Contenu sous droits.

Contenu sous droits.

Contenu sous droits.

Contenu sous droits.

Contenu sous droits.

Contenu sous droits.

Contenu sous droits.

Contenu sous droits.

Contenu sous droits.

Contenu sous droits.

Liste des éléments sous droits



Liste de **tous les éléments retirés** de la version complète de la thèse
faute d'en détenir les droits

Document à intégrer dans la version partielle de la thèse

Illustrations, figures, images...

Légende de l'image	N° de l'image	Page(s) dans la thèse

Articles, chapitres, entretiens cliniques...

Titre du document	N° (si numéroté)	Page(s) dans la thèse
Publication Annexe: Clinical Translation of Pluripotent Stem Cell Therapies: Challenges and Considerations		160 à 172