



HAL
open science

Interaction épigénétique et régulation métabolique dans les modèles des populations stromales mésenchymateuses et des cellules tumorales circulantes

Virginie Jacques

► **To cite this version:**

Virginie Jacques. Interaction épigénétique et régulation métabolique dans les modèles des populations stromales mésenchymateuses et des cellules tumorales circulantes. Médecine humaine et pathologie. Université de Toulouse, 2024. Français. NNT : 2024TLSES015 . tel-04672892

HAL Id: tel-04672892

<https://theses.hal.science/tel-04672892v1>

Submitted on 19 Aug 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.

Doctorat de l'Université de Toulouse

préparé à l'Université Toulouse III - Paul Sabatier

Interaction épigénétique et régulation métabolique dans les
modèles des populations stromales mésenchymateuses et
des cellules tumorales circulantes

Thèse présentée et soutenue, le 19 mars 2024 par

Virginie JACQUES

École doctorale

BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies

Spécialité

MALADIES METABOLIQUES ET CARDIOVASCULAIRES

Unité de recherche

I2MC - Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires

Thèse dirigée par

Frédérique SAVAGNER

Composition du jury

Mme Aurélie BEDEL, Rapporteur, Université de Bordeaux

M. Régis Pierre GUIEU, Rapporteur, CHU de Marseille

M. Franck STURTZ, Rapporteur, CHU de Limoges

M. Jérôme RONCALLI, Examineur, CHU de Toulouse - Hôpital de Rangueil

Mme Frédérique SAVAGNER, Directrice de thèse, Université Toulouse III - Paul Sabatier - Hôpital de Purpan

**Université Toulouse III - Paul Sabatier
Laboratoire I2MC - UMR1048**

THÈSE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
Spécialité Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires

**Interaction épigénétique et régulation métabolique dans les
modèles de populations stromales mésenchymateuses et
de cellules tumorales circulantes**

Virginie JACQUES

Présentée et soutenue publiquement
Le 19/03/2024

DIRECTRICE DE RECHERCHE
Pr Frédérique SAVAGNER, PU-PH

JURY
Mme Aurélie BEDEL, Rapporteur
M. Régis Pierre GUIEU, Rapporteur
M. Franck STURTZ, Rapporteur
M. Jérôme RONCALLI, Examineur
Mme Frédérique SAVAGNER, Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

A Madame le Docteur Aurélie BEDEL,

Je vous remercie de me faire l'honneur de siéger parmi les membres de ce jury en tant que rapporteure et de juger ce travail de thèse. Je vous prie d'accepter l'expression de toute ma considération et de ma plus profonde estime.

A Monsieur le Professeur Régis Pierre GUIEU,

Je vous remercie de me faire l'honneur d'être membre de ce jury en tant que rapporteur et de participer à la critique de ce travail de thèse. Je vous prie d'accepter l'expression de toute ma considération et de ma plus profonde estime.

A Monsieur le Professeur Franck STURTZ,

Je vous remercie d'avoir accepté, malgré un timing extrêmement serré, d'être membre de ce jury et de l'intérêt que vous avez bien voulu porter à mon travail. Je vous prie d'accepter l'expression de toute ma considération et de ma plus profonde estime.

A Monsieur le Professeur Jérôme RONCALLI,

Je vous remercie de me faire l'honneur de siéger parmi les membres de ce jury, et de participer à la critique de ce travail de thèse. Je vous prie d'accepter l'expression de toute ma considération et de ma plus profonde estime.

A Madame le Professeur Frédérique SAVAGNER,

Je vous remercie de m'avoir proposé ce travail de thèse, d'avoir à nouveau cru en mes capacités et de m'avoir accompagnée pour mener à bien ce projet. Je vous remercie pour la confiance que vous m'accordez depuis votre arrivée au CHU de Toulouse et le début de notre collaboration. Je vous remercie pour ce travail collaboratif que nous menons de front au quotidien et pour toutes ces victoires. Je vous remercie pour vos encouragements dans les moments de doute, votre soutien indéfectible et votre bienveillance. Je vous remercie pour tout ce savoir que vous m'avez transmis et les connaissances que vous partagez lors de chacun de nos échanges. Je vous remercie pour votre enthousiasme communicatif. C'est un réel plaisir et un grand honneur de travailler avec vous au quotidien.

A Monsieur le Professeur Hugues CHAP, à Madame le Docteur Anne Sophie LIA BALDINI,

Je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de mon Comité de Thèse. Je vous remercie pour vos conseils et vos remarques bienveillantes. Je vous remercie d'avoir su apprécier les différentes étapes de de projet.

Au Docteur Oxana KOUNDOUZOVA, au Professeur Angelo PARINI,

Je vous remercie de m'avoir accueillie au sein de l'équipe de l'I2MC et de m'avoir permis de réaliser ce travail de thèse.

Au Docteur Nathalie PIZZINAT, au Docteur Varravaddheay ONG-MEANG,

Je vous remercie pour vos conseils et votre disponibilité (même très matinale).

Au Docteur Thomas FARGE,

Je te remercie pour tes remarques pertinentes, avisées et pointues. Je te remercie de m'avoir permis d'appréhender certaines questions sous un nouvel angle.

A Sabrina BENAOUADI,

Je te remercie d'avoir partagé ce projet avec moi et de m'avoir si bien encadrée et épaulée. Je te remercie pour la disponibilité dont tu as fait preuve et pour tous tes conseils. Je te remercie pour les moments passés autour d'un « café ».

A Carla PINTO, à Alexandre BOUDET, à Dimitri MARSAL, à Salwa SOUSSI, à Lésia SAVCHENKO,

Je vous remercie pour les bons moments passés en votre compagnie.

Au Docteur Frédéric BOAL, au Docteur Daniel CUSSAC, au Docteur Véréna POINSOT, au Docteur Yannis SAINTE-MARIE, au Docteur Hélène TRONCHERE, à Audrey SWIADER,

Je vous remercie pour votre accueil et les moments de convivialité passés en votre compagnie.


A Emeline LHUILLIER et Anne-Alicia GONZALEZ du plateau technique de Génomique et Transcriptomique, à Elodie Riant et Alexia ZAKAROFF-GIRARD du plateau technique de Cytométrie et Tri cellulaire, à Rémy FLORES du plateau technique d'Imagerie,

Je vous remercie pour cette collaboration et l'expertise du travail réalisé avec vous. Je vous remercie pour le temps passé en formations diverses qui m'ont permis d'accéder à de nouvelles compétences.

Au Docteur Nicolas ESPAGNOLLE, à Jean-Gérard DECAMPS, au Docteur Lavinia VIJA,

Je vous remercie pour mon intégration dans ces projets collaboratifs.

A Elisa THOA, à Valérie RANTIERE, à Vera DA SILVA BAPTISTA, à Elise SOUBKI, à Mathieu JIMENEZ, à Nina VARSI,

Par ordre d'arrivée au laboratoire puis dans mon cœur, je vous remercie d'être présents au quotidien. Je vous remercie pour tout le travail que vous fournissez au sein du SBMGC1 mais surtout pour cette confiance que vous m'accordez. Je vous remercie d'accepter mon franc-parler et de laisser le jugement aux autres. Je vous remercie pour tous ces moments de vie, de partage, de pleurs et de rires (surtout !). Je vous remercie de m'apporter votre soutien et vos encouragements. Je vous remercie pour votre honnêteté, votre bienveillance et vos conseils. Je vous remercie pour ces réunions du mardi matin (8h10, heure du « changement »), dont le compte-rendu ne saurait rendre grâce à l'éclectisme (c'est un euphémisme...) des sujets abordés ! MERCI ! 

A Lucie DOMINGUES, à Annaëlle HOARAU,

Je vous remercie toutes les deux pour votre gentillesse et votre soutien. Je vous remercie pour la douceur dont vous faites preuve qui apaise mon esprit (malgré moi).

A Emilie BELONDRADE, à Delphine PARGALA, à Laurent FERNANDEZ,

Je vous remercie pour votre soutien depuis mes premiers stages et mon arrivée en Biochimie comme technicienne. Je vous remercie pour vos petits mots d'encouragement (entre deux portes ou dans les vestiaires).

A Jessie FOY, à Anne FONTOVA,

Je vous remercie de partager avec moi ce bureau « girly » qui sent bon les épices et la vanille. Je vous remercie pour vos encouragements (et le chocolat) ...

A Cathy TARDIEU, à Marie-Laure BLATTE, à Annie GARCIA,

Je vous remercie pour votre bienveillance au quotidien. Je vous remercie pour ces conversations professionnelles qui dérivent bien souvent. Je vous remercie pour vos conseils et notre collaboration.

A Benoît DOGNY, à Thibault FILIOL,

Je vous remercie d'être présent chaque fois que les soucis se profilent. Je vous remercie pour votre écoute et le soutien que vous nous portez qu'il soit technique ou humain.

A Gaël GASCOIN,

Je vous remercie pour votre soutien et votre accompagnement au quotidien.

A Madame Françoise ESTRIER,

Je vous remercie d'avoir cru en moi depuis mon premier stage de technicienne au CHU en 2007. Je vous remercie d'avoir suivi mon parcours depuis mon embauche en octobre 2009 et de n'avoir eu de cesse de m'encourager dans mes démarches d'évolution personnelle. Je vous remercie d'avoir joué pour ce rôle de pilier et de soutien. Je vous remercie pour votre clairvoyance, votre bienveillance et

toute l'aide que vous m'avez apportée. Je vous remercie d'avoir été présente dans les moments difficiles.

Au Professeur Thierry LEVADE, au Docteur Isabelle GENNERO, au Docteur Annelise GENOUX, au Docteur Stéphanie TRUDEL,

Je vous remercie pour votre soutien dans mes projets d'évolution professionnelle. Je vous remercie d'avoir cru en mes capacités de pouvoir tout mener de front.

A Guigui, à Pierre, à Steph, à Chacha,

La team Be Unit, je vous remercie d'avoir pris aussi souvent de nouvelles de l'avancée de cette thèse. Je vous remercie d'être là pour me changer les idées et m'aider à lâcher-prise même si ce n'est que le temps du WOD.

A Math et Seb,

Mes CrossFitters in love, je vous remercie de faire partie de ma team. Je vous remercie pour le réconfort et le soutien que vous m'apportez mais aussi pour la facilité avec laquelle il est possible de parler d'absolument tout (et surtout de n'importe quoi...). Je vous remercie aussi d'être là quand la pression se relâche et de me sentir suffisamment en confiance pour me le permettre.

A Lili et Juju,

Ma team « La Toul' », je vous remercie de faire partie de ma vie depuis toutes ces années. Je vous remercie de toujours répondre présents même si je ne vous demande rien. Je vous remercie de m'entendre et de me comprendre sans que je n'aie besoin de parler. Je vous remercie de me permettre d'être moi, sans filtres ni remparts. Je vous remercie d'apporter de la douceur dans ce monde de brutes.

A ma sœur,

« Ma grosse », que te dire que tu ne saches déjà... Je te remercie d'être toujours aussi proche malgré la distance. Je te remercie de toujours être là pour moi. Toutes les deux ça coule comme du vin et ça pétille comme du champagne...T'aime !

A mon meilleur ami, mon colocataire, mon « team-mate », mon associé, l'homme qui partage ma vie,

Chéri, je te remercie de m'aider à croire un peu plus en moi chaque jour. Je te remercie de m'aider à sortir de ma zone de confort. Je te remercie d'accepter que je sois moi-même, sans filtre, directe et de ne pas m'en tenir rigueur ni jamais me juger. Je te remercie d'arriver à voir au-delà de ma carapace. Je te remercie de te rendre toujours disponible pour moi, à chaque instant, que ce soit pour une bouillotte

en pleine nuit ou pour venir me chercher à 400km parce que mon train est annulé. Je te remercie de me suivre, que ce soit dans nos périples à l'autre bout du monde ou dans toutes mes délires de rénovation. Je peux me lancer dans n'importe quoi car je sais que tu seras là pour me ramasser si je tombe ! Vivement notre prochain projet (mais raisonnable cette fois !) ...

A mon grand-père,

Papi, je te remercie de me soutenir et de faire toujours de ton mieux pour m'aider. Je sais que tu ne me laisseras jamais tomber... Sinon, de toute façon, mamie viendrait te hanter !

A ma grand-mère,

Mamie, je te remercie pour toutes les valeurs que tu m'as inculquées, toutes les connaissances que tu m'as transmises et pour toute cette force que tu m'as donnée et qui m'ont amenée là où j'en suis aujourd'hui. Je pense à toi chaque jour et tu me manques toujours autant. J'espère que tu es fière de moi... Je t'aime (Ta souris).

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	10
LISTE DES ABREVIATIONS, ACRONYMES ET SIGLES	13
PARTIE I : INTERACTION EPIGENETIQUE ET REGULATION METABOLIQUE DANS LE MODELE DES POPULATIONS STROMALES MESENCHYMATEUSES	1
CONTEXTE SCIENTIFIQUE.....	2
<i>Epidémiologie de l'insuffisance cardiaque.....</i>	<i>2</i>
<i>Physiopathologie et Mécanismes compensatoires.....</i>	<i>3</i>
<i>Cellules souches.....</i>	<i>8</i>
<i>Thérapies Cellulaire et Génique</i>	<i>11</i>
Thérapies cellulaires basées sur les cellules souches	11
Thérapies cellulaires non basées sur les cellules souches	16
Mode d'administration.....	17
Thérapie génique.....	20
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	23
<i>I. Cellules Stromales Mésoenchymateuses.....</i>	<i>23</i>
I.1. Définition et caractéristiques.....	23
I.2. Mécanismes d'action	25
I.2.1 Sécrotome	27
I.2.2 Microvésicules.....	30
<i>II. Cellules Stromales Mésoenchymateuses et Thérapeutique</i>	<i>32</i>
<i>III. Cellules Stromales Mésoenchymateuses et Métabolisme.....</i>	<i>39</i>
III.1. Chaîne respiratoire	39
III.2. Métabolisme énergétique	45
III.3. Biogenèse mitochondriale	50
III.3.1. Les facteurs de transcription nucléaires.....	51
III.3.2. Les corégulateurs transcriptionnels	56
III.4. Dynamique mitochondriale	60
III.5. Régulation et Switch métabolique des Cellules Stromales Mésoenchymateuses	67
III.5.1. Facteur de régulation HIF	68
III.5.2. Autres facteurs de régulation.....	72
<i>IV. Régulation Epigénétique des Cellules Stromales Mésoenchymateuses</i>	<i>79</i>

IV.1.	Méthylation de l'ADN	82
IV.2.	Modifications post-traductionnelles des histones.....	84
IV.2.1.	Acétylation des histones.....	87
IV.2.2.	Méthylation des histones	88
IV.3.	Remodelage de la chromatine	91
IV.4.	ARNnc	93
V.4.1.	miARN.....	95
V.4.2.	ARNlnc	99
V.4.3.	ARNcirc	100
IV.5.	Impact des régulations Epigenétiques	101
V.	<i>Lien Métabolisme et Epigénétique</i>	106
	OBJECTIF SCIENTIFIQUE	117
	RÉSULTATS.....	120
	<i>Metabolic conditioning enhances human bmMSC cell therapy of doxorubicin-induced heart failure</i>	120
	DISCUSSION	150

PARTIE II : INTERACTION EPIGENETIQUE ET REGULATION METABOLIQUE DANS LE MODELE DES CELLULES

TUMORALES CIRCULANTES 156

	CONTEXTE SCIENTIFIQUE.....	157
	<i>Epidémiologie des Néoplasies Neuroendocrines</i>	157
	<i>Radiothérapie métabolique</i>	162
	INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	164
I.	<i>Définition et classification des Tumeurs Neuroendocrines</i>	164
I.1.	Origine et site anatomique	164
I.2.	Manifestations cliniques	166
I.3.	Classification	168
II.	<i>Diagnostic des Tumeurs Neuroendocrines</i>	170
II.1.	Imagerie médicale	170
II.1.1.	Techniques conventionnelles	171
II.1.2.	Techniques moléculaires	171
II.2.	Biomarqueurs	174
II.2.1.	Chromogranine A	174
II.2.2.	Acide 5-hydroxy indole acétique	176
II.2.3.	Biomarqueurs moléculaires.....	176
II.3.	Anatomo-pathologie.....	181
III.	<i>Traitement des Tumeurs Neuroendocrines</i>	182
III.1.	Rôle de la somatostatine	182
III.1.1.	Somatostatine et analogues	182
III.1.2.	Récepteurs de la Somatostatine.....	183
III.2.	Traitement des Tumeurs Neuroendocrines intestinales.....	185
III.2.1.	Chirurgie	185

III.2.2. PRRT au ¹⁷⁷ Lu-DOTATATE	186
OBJECTIF SCIENTIFIQUE	195
RÉSULTATS.....	201
<i>Evaluation of a blood miRNA/mRNA signature to follow-up Lu-PRRT therapy for G1/G2 intestinal neuroendocrine tumors</i>	201
DISCUSSION	221
PARTIE III : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	224
<i>Discussion générale</i>	225
<i>Perspectives</i>	229
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	231
PROJETS ANNEXES.....	261
<i>Targeted Next-Generation Sequencing of Congenital Hypothyroidism-Causative Genes Reveals Unexpected Thyroglobulin Gene Variants in Patients with Iodide Transport Defect</i>	262
Contexte	262
Article	263
<i>Genetic biomarkers of life-threatening pheochromocytoma-induced cardiomyopathy</i>	272
Contexte	272
Article	274
<i>Next-Generation Sequencing Analysis Reveals Frequent Familial Origin and Oligogenism in Congenital Hypothyroidism With Dyshormonogenesis</i>	280
Contexte	280
Article	281

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 Physiopathologie de la MIRI (He et al. 2022)	6
Figure 2 Modalités de délivrance des cellules (Vilquin et Etienne 2016)	18
Figure 3 Différenciation des MSC (Bhaskar et al. 2014)	24
Figure 4 Activité paracrine des MSC (Jimenez-Puerta et al. 2020)	26
Figure 5 Rôle des exosomes excrétés par les MSC dans la communication cellule/cellule et effets thérapeutiques (Jimenez-Puerta et al. 2020)	31
Figure 6 Thérapies cellulaires et intérêts de la reprogrammation métabolique (Rigaud et al. 2020) ...	33
Figure 7 Nouvelles approches de pré-conditionnement des MSC et leurs principaux impacts (Matta et al. 2022).....	36
Figure 8 Organigramme essai MESAMI I (Guijarro et al. 2016)	37
Figure 9 Représentation schématique du système OXPHOS (Dudkina et al. 2010)	39
Figure 10 Transduction de l'énergie au niveau de la sous-unité motrice F1 de l'ATP synthase (H. Wang et Oster 1998).....	42
Figure 11 Schéma d'une mitochondrie et des divers interactions entre OXPHOS, la production d'ATP et la génération de ROS (Wallace 1999).....	44
Figure 12 Représentation du métabolisme mitochondrial (Khacho et Slack 2017)	47
Figure 13 Génération du flux d'électrons et de protons au niveau de l'ETC (R.-Z. Zhao et al. 2019) ..	48
Figure 14 Métabolisme des cellules souches (Kyoko Ito et Ito 2016)	49
Figure 15 Réseau transcriptionnel influençant le métabolisme mitochondrial (Hock et Kralli 2009)	51
Figure 16 Contrôle des fonctions mitochondriales par NRF-1 et NRF-2 (Scarpulla 2008).....	53
Figure 17 Voies médiées par PGC-1 α médiant la biogénèse et les fonctions mitochondriales	57
Figure 18 Arrangement des domaines conservés des coactivateurs PGC-1 α/β et PRC (Scarpulla 2011)	58
Figure 19 Modèle d'intégration des fonctions mitochondriales et de régulation de la croissance par PRC (Scarpulla 2011)	59
Figure 20 Dysfonctionnements mitochondriaux provoqués par le vieillissement (Seo et al. 2010)	62
Figure 21 Mécanismes moléculaires impliqués dans le transport mitochondrial (Morin, Moindjie, et Nahmias 2022)	66
Figure 22 Métabolisme et différenciation (Kubli et Sussman 2017).....	68
Figure 23 Reprogrammation des cellules liée au switch métabolique (Rigaud et al. 2020)	68
Figure 24 Modulation dynamique du métabolisme des cellules souches (Rigaud et al. 2020)	69
Figure 25 Mécanisme d'action de HIF sous normoxie et hypoxie (Z. Luo et al. 2022)	70
Figure 26 Mécanismes de suppression de l'activité mitochondriale et activation de l'OXPHOS lors de la différenciation (Khacho et Slack 2017).....	72

Figure 27 Signalisation mitochondriale et devenir des cellules souches via la modulation de l'expression des gènes et des phénomènes épigénétiques (Khacho et Slack 2017)	75
Figure 28 Régulation de l'activité enzymatique de SIRT1 (Rodgers et al. 2008)	76
Figure 29 Axe de régulation SIRT1/AMPK (Haigis et Sinclair 2010)	77
Figure 30 Structuration de la chromatine (Im et Shin 2015)	80
Figure 31 Marqueurs épigénétiques régulant la structure de la chromatine (Ozkul et Galderisi 2016)	81
Figure 32 Régulation épigénétique des MSC dans l'homéostasie tissulaire (Sui et al. 2020)	82
Figure 33 Sites et modifications des Histones (Im et Shin 2015)	84
Figure 34 Lecteurs de PTM au niveau des Histones (Musselman et al. 2012)	85
Figure 35 Principales modifications des Histones et leurs effets (J. Ren et al. 2020)	86
Figure 36 Remodelage structurel de la chromatine au cours du vieillissement (K. Wang et al. 2022a)	87
Figure 37 Processus de méthylation des Histones (Gong et Miller 2019)	89
Figure 38 Domaines de lecture des Méthylations (Gong et Miller 2019)	89
Figure 39 Lecture combinatoire des PTM (Musselman et al. 2012)	90
Figure 40 Structure bivalente de la chromatine régulée à travers les complexes PcG et TrxG (Im et Shin 2015)	92
Figure 41 Modification des ARN dans les CVD et leurs effets (Mongelli et al. 2020)	95
Figure 42 Mécanismes de fonctionnement des miARN (Im et Shin 2015)	96
Figure 43 Rôle des miRNA dans l'infarctus du myocarde (Fadaei et al. 2022)	98
Figure 44 Modifications clés des histones influençant l'expression des gènes (Bassett et Barnett 2014)	101
Figure 45 Inhibiteurs épigénétiques stimulant l'expression des TE dans les cellules cancéreuses (Barrero 2020)	103
Figure 46 Déméthylation FAD-dépendante médiée par LSD1 des lysines méthylées (Y. Fang, Liao, et Yu 2019)	103
Figure 47 Déméthylation Fe ²⁺ /2-OG-dépendante médiée par JmjC des lysines méthylées (Y. Fang, Liao, et Yu 2019)	104
Figure 48 Impact des intermédiaires métaboliques sur les modifications de la chromatine (Wiese et Bannister 2020)	107
Figure 49 Différenciation des MSC associée aux modifications épigénétiques des Histones intervenant au niveau de gènes spécifiques de lignées (J. Ren et al. 2020)	108
Figure 50 Rôle des enzymes modifiant les Histones dans la différenciation des MSC (J. Ren et al. 2020)	108
Figure 51 Mécanismes transcriptionnels de HIF1 sous hypoxie (Bahir et al. 2020)	112
Figure 52 Action bénéfique de la MT sur l'action de réparation des MSC dans différents organes (Hu et Li 2019b)	114
Figure 53 Mécanismes sous-jacent aux effets protecteurs du RSV sur les MSC (Hu et Li 2019a)	116
Figure 54 Incidence des NNE selon la base de données du SEER (J. C. Yao et al. 2008)	158
Figure 55 Incidence des NNE selon leur localisation (J. C. Yao et al. 2008)	160

Figure 56 Incidence des NNED en fonction du site anatomique, selon la base de données du SEER	161
Figure 57 Origine embryologique des NNE (Bournaud-Salinas, s. d.)	166
Figure 58 Principaux syndromes sécrétoires des NNE fonctionnelles.....	167
Figure 59 Classification 2022 des Néoplasies Neuroendocrines selon l'OMS. Adapté et modifié d'après (Rindi et al. 2022)	168
Figure 60 Classification TNM des NNE du jéjunum/iléum d'après l'UICC 2022 (« TNM Classification of Malignant Tumors, 8th Edition UICC », s. d.).....	169
Figure 61 Exemple d'imagerie moléculaire utilisant les aSST radiomarqués (« Imagerie TEP aux analogues de la somatostatine marqués au 68 Ga dans les Tumeurs endocrines digestives bien différenciées - PDF Free Download », s. d.).....	173
Figure 62 Diagramme de Kaplan-Meier comparant la survie de patients atteints de NNED en fonction du taux de CgA (R et al. 2008)	175
Figure 63 Identification des 51 marqueurs moléculaires des NNE (Irvin M. Modlin, Drozdov, et Kidd 2013a).....	177
Figure 64 Principe du NETest (Irvin M. Modlin et al. 2018b)	179
Figure 65 Profil d'expression de certains miRNA dans les NNED	180
Figure 66 Modes d'action de la SST (Harris 1994)	182
Figure 67 Mécanismes directs et indirects de l'activité antitumorale des aSST dans les NNED (Mestier et al. 2014).....	183
Figure 68 Structure des SSTR avec l'exemple du sous-type SST2A (Weckbecker et al. 2003).....	184
Figure 69 Caractéristiques des NNE et options thérapeutiques (« Référence Tumeurs neuroendocrines du grêle », s. d.).....	186
Figure 70 Arbre décisionnel d'aide à la prise en charge des NNE intestinales métastatiques (selon TNCD SNFGE 2023 et PRRT)	187
Figure 71 Résultats de l'essai clinique de phase III NETTER-1 illustrant le gain de survie sans progression apporté par le traitement ¹⁷⁷ Lu-DOTATATE (J. Strosberg et al. 2017, 3)	188
Figure 72 Systèmes DDR.....	191
Figure 73 Mécanismes de réparation par excision de l'ADN pour des lésions causées par les ROS (Lee et Kang 2019)	192
Figure 74 Composition de la solution d'acides-aminés administrée	197
Figure 75 Chronologie du protocole GENEbioLuNET	199

LISTE DES ABREVIATIONS, ACRONYMES ET SIGLES

AAV : <i>Adeno associated virus</i>	ARNcirc : ARN circulaire
Ac : Acétylation	ARNInc : Long ARN non codant
Acétyl-CoA : Acétyl co-enzyme A	ARNm : ARN messenger
ACLY : ATP-citrate lyase	ARNnc : ARN non codant
ACSS1/2 : <i>Acyl-CoA synthetase short-chain family member 1/2</i>	ARN Pol II/III : <i>ARN polymerase II/III</i>
ADD : <i>ATRX-DNMT3-DNMT3L</i>	ARNr : ARN ribosomal
ADN : Acide desoxyribo nucléique	ARNsnc : Petit ARN non codant
ADNmt : ADN mitochondrial	ARNt : ARN de transfert
ADP : Adénosine di-phosphate	AROS : <i>Active regulator of SIRT1</i>
AIRE : <i>Auto-immune regulator</i>	ARP : <i>Actin-related protein</i>
AKT : <i>Serine-threonine protein kinase B</i>	ASC : <i>Adult stem cells</i>
AKT/mTOR : <i>Protein kinase B/mammalian target of rapamycin</i>	aSST : Analogue de la somatostatine
ALA synthase : <i>5-Amino-levulinate synthase</i>	ATG7 : <i>Autophagy related 7</i>
α-KG : <i>Alpha-ketoglutarate</i>	ATP : Adénosine tri phosphate
α-KGDH : <i>αKG dehydrogenase</i>	ATP6V1H : <i>V-type proton ATPase subunit H</i>
AMM : Autorisation de mise sur le marché	ATRX : <i>Alpha-thalassemia/mental retardation, X-linked</i>
AMP : Adénosine monophosphate	ATU : Autorisation temporaire d'utilisation
AMPc : AMP cyclique	BAT : <i>Brown adipose tissue</i>
AMPK : <i>AMP-activated protein kinase</i>	BAX : <i>Bcl-2-associated X</i>
ANT : <i>Adenine nucleotide translocator</i>	BCA : <i>Bi-cinchoninique acide</i>
ANRIL : <i>Antisense non-coding RNA in the cyclin-dependent kinase inhibitors locus</i>	BCL-2 : <i>B-cell lymphoma 2</i>
A/P : Apurinique/aprimidinique	BD : <i>Benzodiazepine receptor</i>
APAF-1 : <i>Apoptotic peptidase activating Factor 1</i>	BER : <i>Base-excision repair</i>
APE1 : <i>Apurinic/aprimidinic endonuclease 1</i>	bFGF : <i>Basic fibroblast growth factor</i>
APUD : <i>Amine precursor uptake and decarboxylation</i>	BIF1 : <i>Endophilin 1</i>
AR : <i>Androgene receptor</i>	BMI1 : <i>B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog</i>
Arg : Arginine	bmMSC : <i>Bone-marrow mesenchymal stromal cells</i>
ARN : Acide ribo nucléique	BPF : Bonnes pratiques de fabrication
	BrDT : <i>Bromodomain testis associated</i>

BRAF : *B-Raf proto-oncogene*

BRG1 : *Brahma-related gene 1 (SMARCA4)*

BSA : *Bovine serum albumin*

1-C : Cycle à 1 Carbone

Ca²⁺ : Ion calcium

5-caC : *5-carboxylcytosine*

cAMP : *Adenosine mono-phosphate cyclique*

CAR T : *Chimeric antigenic receptor T*

CAS : *CRISPR associated protein*

CASP8 : *Caspase 8*

CBP : *cAMP response element binding protein (CREB-binding protein)*

CD : *Cluster of differentiation*

CEBP α : *CCAAT/enhancer-binding protein alpha*

C-FLIP : *Cellular FLICE-like inhibitory protein*

2-CG : *2-cétoglutarate*

CgA : *Chromogranine A*

CHD : *Chromodomain helicase DNA binding*

CHF : *Chronic heart failure*

CHU : *Centre hospitalier universitaire*

CIRIMAT : *Centre interuniversitaire de recherche et d'ingénierie des matériaux*

cKIT : *Tyrosine-protein kinase Kit (CD117)*

CLR4 : *H3 methyl-transferase*

cMSC : *Cardiac mesenchymal stromal cells*

c-MYC : *Cellular myelocytomatosis oncogene*

CNE : *Carcinome neuro-endocrine*

CNS : *Central nervous system*

CoQ : *Coenzyme Q10*

CoREST : *Co-repressor of repressor element-1 silencing transcription*

COX17 : *Cytochrome C oxydase Copper chaperone 17*

COX5A/8A : *COX Subunit 5A/8A*

CPR : *Cardiomyocyte Proliferation Regulator*

CR : *Caloric restriction*

CRE : *cAMP response element*

CREB : *CRE binding protein*

CRISPR : *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated protein*

Cross-link : *Fixer de façon covalente les protéines liées à l'ADN*

CSA : *Cardiac cross-sectional area*

CSC : *Cancer stem cells*

CtBP : *C-terminal binding protein*

CTD : *C-terminal domain*

CTNNB1 : *Beta-catenin 1*

CUT & RUN : *Cleavage under targets & release using nuclease*

CVD : *Cardiovascular disease*

CyCA : *Cyclophilin A*

Cys : *Cystéine*

CytC : *Cytochrome C*

CXCL14 : *C-X-C motif chemokine ligand 14 (ou BRAK)*

3D : *Tridimensionnel*

DAP3 : *Death associated protein 3*

DBC1 : *Deleted in breast cancer-1*

DC : *Dendritic cells*

dcSAM : *Decarboxylated S-adenosyl methionine*

DDB2 : *Damage-specific DNA binding protein 2*

DDR : *DNA damage response*

Demodifiers : *Dé-modificateurs*

DFG : *Débit de filtration glomérulaire*

DICER : *Drosophila dynein regulatory complex subunit 1 (DRC1) homolog (Ribonuclease III)*

DNM1p : *Dynammin-related GTPase*

DNMT : *DNA methyltransferases*

DOPA : *Di-hydroxy- phénylalanine*

DOTA : *Acide tétra-acétique de tétra-azacyclo-dodécane*

5'-dRP : *5'-2-désoxyribose-5'-phosphate*

DRP1 : *Dynammin-related protein 1*

DSBR : *Double-strand base repair*

dsRNA : *Double strand ribo-nucleic acid*

e⁻ : *électrons*

E2F1 : *Adenoviral early region 2 binding factor 1*

ECAR : *Extra-cellular acidification rate*

ECL : *Electrochemiluminescence*

EED : *Embryonic development protein*

EFS : *Etablissement français du sang*

EGFR : *Epithelial growth factor receptor*

EGM2 : *Endothelial cell growth medium 2*

EIG : *Événements indésirables graves*

EIM : *Espace intermembranaire*

ELISA : *Enzyme linked immuno-sorbant assay*

ENETS : *European neuro endocrine tumor society*
EPO : *Erythropoietin*
ER : *Estrogen receptor*
Eraser : *Effaceur*
ERK 1/2 : *Extracellular signal-regulated kinase 1/2*
ERRα/β : *Estrogen-related receptor alpha (ou GABPα) / beta*
ERS : *Endoplasmic reticulum stress*
ESC : *Embryonic stem cell*
ET-1 : *Endotheline-1*
ETC : *Electrons transport chain*
EV : *Extracellular vesicles*
EZH2 : *Enhancer of zeste homolog 2*
FA : *Fatty acid*
FACS : *Fluorescence-activated cell sorting*
FAD : *Flavine adénine dinucléotide oxydée*
FADD : *Fas-associated death domain*
FADH2 : *Flavine adénine dinucléotide réduite*
5-fC : *5-Formylcytosine*
FDA : *Food and drug administration*
FDG : *Fluoro désoxy-glucose*
FE : *Fraction d'éjection*
FEN1 : *Flap endonuclease 1*
Fe-S : *Fer - Soufre*
FEZ1 : *Fasciculation and elongation zeta protein 1*
FHL2 : *Four and a half LIM domains protein 2*
FIS1 : *Fission protein 1*
FOX : *Forkhead box transcription factors*
FOXO : *FOX subgroup O*
FOXO1 : *FOXO subunit 1*
FZO : *Fuzzy onion*
GABP : *GA-binding protein*
⁶⁸Ga-DOTANOC : [⁶⁸Ga-DOTA⁰-¹NaI³] octreotide
⁶⁸Ga-DOTATATE : [⁶⁸Ga-DOTA⁰-Tyr³] octreotate
⁶⁸Ga-DOTATOC : [⁶⁸Ga-DOTA⁰-Tyr³] octreotide
GAPDH : *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*
GCN5 : *Lysine acetyl-transferase 2A*
GDAP1 : *Ganglioside induced differentiation associated protein 1*

GED : *Guanosine tri-phosphatase effector domain*
GeneArray : *Supports solides sur lesquels un ensemble d'acides nucléiques spécifiques d'un gène a été placé à des emplacements définis*
GEP : *Gastro-entero-pancréatique*
GFR : *Growth factor receptor*
GHRH : *Growth hormone releasing hormone*
GI : *Gastrointestinal*
GLUT : *Glucose transporter*
GLUT1 : *Glucose transporter 1*
GNAT : *N-acétyltransférase liée à GCN5*
GPx : *Glutathione peroxidase*
GPS2 : *G-protein pathway suppressor 2*
Grading : *Grade*
GSK : *GlaxoSmithKline*
GSK-LSD1 : *GSK-Lysine Specific demethylase 1*
GTE : *Groupe d'étude des tumeurs endocrines*
GTP : *Guanosine tri-phosphate*
GTPase : *Guanosine tri-phosphatase*
H : *Heavy*
H⁺ : *Proton*
H2/3/4 : *Histone 2/3/4*
H2A/2B : *Histone 2 sous-unité A/B*
γH2AX : *Phospho-histone gamma H2A Sérine 139*
H3K4me3 : *Histone 3 tri méthylée sur la Lysine 4*
H3K9me/me3 : *Histone 3 mono/tri méthylée sur la Lysine 9*
H3K27me/me2/me3 : *Histone 3 mono/di/tri-méthylée sur la Lysine 27*
H3K36me3 : *Histone 3 tri méthylée sur la Lysine 36*
H₂O : *Eau*
H₂O₂ : *Peroxyde d'hydrogène*
Hazard ratio : *Rapport de risque*
HAT : *Histones acetyl-transferase*
HCF : *Host cell factor*
HCF1 : *Host cell factor 1*
HDAC : *Histone deacetylase*
HDM : *Histone demethylase*
HFSC : *Hair follicle stem cells*
2-HG : *2-hydroxy-glutarate*

HGF : *Hepatocyte growth factor*
HHGE : Heritable human genome editing
5-HIAA : Acide 5-hydroxy-indole acétique
HIF : *Hypoxia induiced factor*
His : Histidine
HLA-DR : *Human leukocyte antigen DR*
5-hmC : *5-hydroxymethylcytosine*
HMG : *High mobility group*
HMT : *Histone methyl-transferase*
HNF4α : *Hepatocyte nuclear factor 4 homeobox A*
HP1 : *Heterochromatine 1*
HPLC : Chromatographie en phase Liquide à haute performance
HR : *Hazard ratio*
HRE : *Hypoxia-responsive elements*
HRP : *Horse radish peroxidase*
HSC : *Hematopoietic stromal cells*
HSP : *Heavy-strand promotor*
HSS : *Hand-sant-slide*
IAP : Survivine
IC : Insuffisance cardiaque
IC95 : Intervalle de confiance à 95%
ICP : Intervention coronarienne percutanée
IDH 1/2 : *Isocitrate dehydrogenase 1/2*
IDH3G : *IDH (NAD (+)) 3 Non-Catalytic Subunit Gamma*
IDO : Indoleamine
IF1 : *ATPase inhibitory factor 1*
IGF1 : *Insulin-like growth factor 1*
¹³¹I-mIBG : Méta-iodo-benzyl-guanidine
INF_γ : Interféron gamma
INK4 : *Cyclin-dependent kinase inhibitors*
IPP : Inhibiteurs de la pompe à protons
iPSC : *Induced pluripotent stem cells*
IRM : Imagerie par raisonnance magnétique
ISCT : *International society for cellular therapy*
ISL1 : *ISL LIM homeobox 1 (LIM-homeodomain transcription factor)*
ISWI : *Imitation SWItch*
IV : Intra-veineuse
JAK : Janus kinase
JMJC : *Jumonji C*
JMJD : *Jumonji C domain-containing histone demethylase*
JMJD1C : *Jumonji Domain containing 1C*
JNK : *Jun N-terminal kinase*
K4/9/16/20/27/36 : Lysine 4/9/16/20/27/36
KDa : Kilo Dalton
KDM : *Histone lysine demethylase*
KEAP1 : *Kelch-like ECH-associated protein 1*
KIF5 : *Kinesin 1*
KLF4 : *Kruppel like factor 4*
KMT : *Histone lysine methyl-transferase*
L : *Light*
LDHA : *Lactate dehydrogenase*
LIGIII : *DNA ligase III*
Lin : *Lineage marker*
LIN28 : *Ribo-nucleic acid -binding protein Lin28*
lncRNA : *Long non-coding ribo nucleic acid*
LKB1 : *Liver kinase B1*
LSD : *Lysine specific histone demethylase*
LSD1 : *Lysine specific demethylase 1 (KDM1A)*
LSP : *Light-strand promotor*
LuPRRT : ¹⁷⁷Lu-oxodotrétide
¹⁷⁷Lu : ¹⁷⁷ Lutécium
¹⁷⁷Lu-DOTATATE : ¹⁷⁷Lutetium- [DOTA°, Tyr³] octreotate (oxodotrétide de lutétium)
LXXLL : Leucine XX leucine leucine
LXR : *Liver X receptor*
M : Mois
MAP7 : *Microtubule-associated protein 7*
MAPK : *Mitogen-activated protein kinase*
MBD : *Methyl-Binding Domain*
MBD4 : *Methyl-binding domain glycosylase 4*
5-mC : *5-methyl-cytosine*
MCM3 : *Minichromosomal maintenance 3*
MCP1 : *Monocyte chemotactic protein 1*
MCU : *Mitochondrial calcium uniporter*
Me : Méthylation
MEC : *Matrice extra-cellulaire*
MEF-2 : *Myocyte enhancer factor-2*
MEM : *Membrane externe mitochondriale*
MEMα : *Minimum essential medium alpha*
MeV : Méga electron volt
MFN-1/2 : *Mitofusin 1/2*

MGM1p : *Intramitochondrial dynamin-related GTPase*

MIM : Membrane interne mitochondriale

miARN : Micro ARN

Micro-Array: Puce à ADN

MIR : *Myocardial ischemia reperfusion*

MIRI : *MIR injury*

miRNA : *Micro ribo-nucleic acid*

MLKL : *Mixed lineage kinase domain-like protein*

MM : Membrane mitochondriale

MMR : *Mismatch repair*

MnSOD : Manganèse super oxyde dismutase

MOF : *Lysine acetyl-transferase 8*

MPC : *Mitochondrial pyruvate carrier*

MPG : *Methyl-purine glycosylase*

mPTP : *Mitochondrial permeability transition pore*

mRNA : *Messenger ribo-nucleic acid*

MSC : *Mesenchymal stromal cells*

MT : *Melatonin*

MTA : *5'-Methylthio-adenosine*

MTCH2 : *Mitochondrial carrier homologue 2*

mTERF : *Mitochondrial transfection TERmination factor*

MTI : Médicament de thérapie innovante

mTOR : *Mammalian target of rapamycin*

mTORC1 : *Mechanistic target of rapamycin complex 1*

MTP1 : *Mitochondrial fission process protein 1 (ou MTFP1)*

mtPTP : *Mitochondrial permeability transition pore*

MV : Microvésicule

MYH : *MutY homolog DNA glycosylase*

Myo : *Myosin*

MYST : *MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2, Tip60*

NAD⁺ : Nicotinamide adénine dinucléotide oxydé

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide Hydrogéné réduit

NADIR : Taux le plus bas de globules blancs sanguins

Nal : Iodure de sodium

NAM / NAMPT : *Nicotinamide phospho-ribosyl transferase*

NANOG : *NK2-family homeobox transcription factor*

NCOR : *Nuclear co-repressor*

ncRNA : *Non-coding ribonucleic acid*

ND 1/2/3/4/5/6 : *NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1/2/3/4/5/6*

NEIL 1 : *Endonuclease VIII-like glycosylase*

NER : *Nucleotide excision repair*

NFATc1 : *Nuclear factor of activated T cells 1*

NF-κB : *Nuclear factor kappa B*

NK : *Natural killer*

NLRP3 : *Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3*

Nmat : *Nuclear-encoded maturase-related*

NMN : *Nicotinamide Mono-nucleotide*

NMNAT1/2/3 : *Nicotinamide mono-nucleotide adenylyl transferase 1/2/3*

NNE : Néoplasie neuro-endocrine

NNED : NNE digestive

NNT : *Nicotinamide nucleotide trans-hydrogenase*

NRF-1/2 : *Nuclear respiratory factor1 / 2*

NSC : *Neural stem cells*

NSUN2 : *NOP2/Sun domain family member 2*

NTH1 : *Endonuclease III-like*

O₂ : Dioxygène

O₂⁻ : Anion superoxyde

OAA : Oxaloacetate

OCR : *Oxygen consumption rate*

OCT 3/4 : *Octamer-binding transcription factor 3/4*

2-OG : 2 Oxoglutarate

α-OGDH : *Alpha oxoglutarate dehydrogenase*

OGG1 : *8-oxoguanine DNA glycosylase 1*

OH[•] : Radical hydroxyle

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OPA1 : *Optic atrophy 1*

ORF : *Open reading frame*

OS : *Overall survival*

OSX : *Osterix (ou Sp7)*

8-oxoG : 8-oxo-7,8-dihydroguanine

OXPHOS : *Oxydative phosphorylation*

p : *p-value*

P1 à 8 : Prélèvements 1 à 8

p300 : E1A Binding protein P300

pA-MNase : Protein A - micrococcal nuclease fusion

PARP1 : Poly (ADP-ribose) polymerase-1

PC2 : Polycomb 2 protein

PCAF : p300/ (CREB binding protein) associated factor

PcG : Polycomb group proteins

PcGF2 : Polycomb group ring finger 2

PCR : Polymerase chain reaction

PDC : Pyruvate dehydrogenase complex

PDH : Pyruvate dehydrogenase

PDK : PDH kinase

PFS : Progression free survival

PGC-1 α /1 β : Peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PPAR γ Coactivator 1) / 1 beta

PGE2 : Prostaglandin E synthase 2

PHD : Proline hydroxylase family

Pi : Phosphate inositol

piARN : Piwi-interacting ribo-nucleic acid

PIC : Pre-initiation complex

PI3K : Phosphatidylinositol-3-kinase

PI3K-mTOR : PI3K-Mammalian target of rapamycin

PI3K-AKT-mTOR : PI3K- protein kinase B-mTOR

PIM-1 : Serin-threonin kinase

PKA/B : Protein kinase A/B

PKM2 : Pyruvate kinase M2 isoform

PNC1 : Mitochondrial pyrimidine nucleotide carrier 1

PNPase : Polynucleotide phosphorylase

POL β : DNA polymerase- β

POLRMT : Mitochondrial ribo-nucleic acid polymerase

p38 MAP kinase : p38 Mitogen-activated Protein kinase

PPAR : Peroxisome proliferator-activated receptor

PPQ : Peptide receptor radionuclide therapy predictive quotient

PRC : PGC-1 related coactivator (PPRC1 gene)

PRC 1/2 : Polycomb repressive complexe 1/2

PRMT : Protein arginine methyltransferase

PRT-K : Programme de recherche translationnelle en cancérologie

Pro : Proline

PRRT : Peptide receptor radionuclide therapy

PSC : Pluripotent stem cell

PTGS : Prostaglandine-endoperoxyde synthase

PTM : Post-translational modification

PVDF : Polyvinylidene fluoride membrane

pVHL : Von Hippel-Lindau protein

PWWP : Pro-Trp-Trp-Pro

qRT-PCR : Quantitative real time-PCR

RAG2 : Recombination activating gene 2

RanBP2 : RAN-binding protein 2

RB : Retinoblastoma tumor suppressor

RCP : Réunion de concertation pluridisciplinaire

Reader : Lecteur

RECIST : Response evaluation criteria in solid tumors

Redox : Oxydo-réduction

Remodeller : Remodeleur

RENATEN : Réseau national de référence de prise en charge des tumeurs neuroendocrines malignes sporadiques et héréditaires

RING1 : Ring finger protein 1

RIP140 : Receptor-interacting protein 140

RIPK : RIP kinase

RISC : Ribo-nucleic acid-induced silencing complex

RIV : Radiothérapie interne vectorisée

ROS : Reactive oxygen species

RNA : Ribo-Nucleic Acid

RNS : Reactive Nitrogen Species

RNU6-1 : RNA, U6 small nuclear 1

rRNA : Ribosomal RNA

RSV : Resveratrol

RT : Reverse transcription

RTK : Récepteur à tyrosine kinase

RT-qPCR : RT quantitative PCR

RUNX3 : Runt related transcription factor 3

RXR : Retinoïd X receptor

SAE : Serious adverse events

SAH : *S-adenosyl homocysteine*

SAM : *S-adenosyl methionine*

SCF : *Stem cell factor*

SDF-1 : *Stromal cell-derived factor 1*

SDHA : *Succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A*

SDHAF1/2 : *Succinate dehydrogenase complex assembly factor 1/2*

SEER : *Surveillance, epidemiology, and end results program*

Ser : *Sérine*

SERCA2 : *Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase*

SETDB1 : *SET domain bifurcated protein 1*

shRNA : *Short hairpin RNA*

siRNA : *Small interfering RNA*

SIR1 : *Silent information regulator protein 1*

SIRT : *Sirtuin histone deacetylase*

SIRT1 : *Sirtuin 1*

SMD : *Syndrôme myélo-dysplasique*

SMUG1 : *Single-strand-specific monofunctional uracil DNA glycosylase*

SNFGE : *Société nationale française de gastro-entérologie*

SNP : *Single nucleotide polymorphism*

SNPH : *Syntaphiline*

SOD : *Superoxyde dismutase*

SOD2 : *SOD 2*

SOX2 : *SRY-box transcription factor 2*

SP1 : *Specificity protein 1*

SR : *Motif sérine/arginine*

SRC1 : *Steroid receptor coactivator-1*

SSC : *Skin stem cells*

SST : *Somatostatine*

SSTR : *Récepteur à la SST*

SST 1 à 5 : *Récepteur à la SST de type 1 à 5*

Staging : *Stade*

STAT3 : *Signal transducer and activator of transcription 3*

Succinyl CoA : *Succinyl CoA*

SUV39H1 : *Histone-lysine N-methyltransferase*

SUZ12 : *Suppressor of zeste 12*

SVF : *Sérum de veau fœtal*

SWI/SNF : *SWItch/sucrose non-fermentable*

TAF3 : *TATA-box binding protein associated factor 3*

TALEN : *Transcription activator-like effector nucleases*

TBP : *Protein binding TATA box*

TBS : *Tris buffered saline*

TCA : *Tri-carboxylic acid cycle*

TCL1 : *T cell leukemia/lymphoma protein 1*

TCL1B1 : *TCL1 subunit B*

TDG : *Thymine DNA glycosylase*

TDM : *Tomodensitométrie*

TE : *Transposable element*

TEMP : *Tomographie par émission mono-photonique*

TENgen : *Réseau national d'expertise pour le diagnostic génétique des néoplasies neuro-endocrines*

TENpath : *Réseau national d'expertise pour le diagnostic anatomopathologique des néoplasies neuro-endocrines*

TEP : *Tomographie par émission de positons*

TET : *Ten-eleven translocation DNA demethylase*

TFAM : *Mitochondrial transcription factor A*

TFB : *Mitochondrial transcription factor B*

TFB1M/B2M : *Mitochondrial transcription factor B1/B2*

TGF-β1 : *Transforming growth factor-beta 1*

TG-SDS : *Tris glycine - sodium dodecyl sulfate*

Th : *Lymphocyte T helper*

Thr : *Thréonine*

TIM : *Translocase of the inner membrane*

TIP60 : *Tat-interactiveprotein, 60 kDa*

TMRM : *Tetramethylrhodamine methyl ester*

TNCD : *Thésaurus national de cancérologie digestive*

TNF-α : *Tumor necrosis factor alpha*

TNFR : *TNF receptor*

TNM : *Tumor-nodes-metastasis*

TOMM : *Translocase of the outer mitochondrial membrane*

TRADD : *Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein*

TRAK1 : *Trafficking kinesin protein 1*

Transwell : Plaque à puits multiples avec inserts en membrane de polyester perméable

TRAP complex : *SMCC, DRIP, ARC, and NAT*

tRNA : *Transfert RNA*

Trp : *Tryptophane*

TrxG : *Trithorax group proteins*

Tumor score : Score de tumeur

Tyr : Tyrosyl

U2OS : *Human bone osteosarcoma Epithelial Cells*

Ub : Ubiquitination

UCP 1/2 : *Uncoupling protein 1/2*

UH2B : *Ubiquityl histone 2B lysine120*

UHRF1 : *Ubiquitin-like containing PHD and RING finger domains 1*

UICC : *Union for international cancer control*

UNG : *Uracil-N glycosylase*

3'-UTR : *3'-U-translated region*

V : Visite

VDAC : *Voltage-dependant anion chanel*

VEGF : *Vascular endothelial growth factor*

VG : Ventricule gauche

VIP : *Vasoactive intestinal peptide*

WAT : *White adipose tissue*

WD40 : *Beta-transducin repeats*

Writer : Ecrivain

XPC : *Xeroderma pigmentosum C*

XRCC1 : *X-ray repair cross-complementing group 1*

YY1 : Yin Yang 1

ZFN : *Zinc-finger nuclease*

Zn²⁺ : ion zinc

PARTIE I : INTERACTION
EPIGENETIQUE ET
REGULATION METABOLIQUE
DANS LE MODELE DES
POPULATIONS STROMALES
MESENCHYMATEUSES

CONTEXTE SCIENTIFIQUE

EPIDEMIOLOGIE DE L'INSUFFISANCE CARDIAQUE

Les maladies cardiovasculaires (CVD) restent la principale cause de mortalité et de morbidité à travers le monde selon les dernières données de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (Virani et al. 2020).

Elles regroupent un ensemble de pathologies touchant le cœur et les vaisseaux sanguins tels que l'athérosclérose aortique, l'hypertension artérielle ou l'insuffisance cardiaque (Azevedo et al. 2016).

En 2019, l'OMS a recensé 17,9 millions de décès dus aux CVD, soit 32% de la mortalité totale.

L'insuffisance cardiaque touche 64 millions de personnes dans le monde (Savarese et al. 2023), dont 1,5 millions en France.

Elle survient à la suite d'une perte importante de cellules myocardiques fonctionnelles en lien avec l'hypertension, les cardiopathies ischémiques ou encore le diabète et se caractérise principalement par une perturbation de la fonction contractile du cœur liée à la fibrose et conduisant à l'hypertrophie cardiaque suite à un défaut de perfusion.

Cette pathologie conduit dans 50% des cas au décès du patient dans les cinq ans suivant l'apparition de la pathologie (Azevedo et al. 2016; Mudd et Kass 2008).

Environ la moitié de tous les décès liés aux maladies cardiovasculaires sont causés par une cardiopathie ischémique, qui entraîne une perte de cardiomyocytes dans le myocarde, entraînant un dysfonctionnement ventriculaire et une insuffisance cardiaque (IC).

De nombreuses pharmacothérapies, dispositifs implantables et techniques chirurgicales ont été mis au point au cours des cinq dernières décennies pour préserver le myocarde et prévenir le remodelage pathologique, améliorant ainsi

considérablement les résultats et la qualité de vie des patients après le développement de l'IC (Virani et al. 2020; Jones et al. 2019).

Cependant, les taux de mortalité liés à l'IC ont commencé à plafonner (Roth et al. 2017), probablement parce que les interventions existantes ne font que ralentir la progression de la maladie mais sont incapables de l'inverser.

Cela découle du fait que les cœurs de mammifères adultes présentent une capacité de régénération minimale en raison de l'incapacité relative des cardiomyocytes dans le cœur adulte à réintégrer le cycle cellulaire et de l'absence apparente d'une population de cellules souches capable de repeupler tous les types de cellules dans le cœur après une blessure (Sadek et Olson 2020).

PHYSIOPATHOLOGIE ET MECANISMES COMPENSATOIRES

Le compartiment stromal est majoritaire dans le cœur normal (environ 80% des cellules) et est composé de différents types cellulaires :

- Cellules immuno- inflammatoires,
- Cellules endothéliales,
- Cellules musculaires lisses,
- Fibroblastes,
- Cellules stromales mésenchymateuses (MSC).

Ce stroma cardiaque, bien plus qu'un élément de soutien architectural, participe au maintien d'une fonction cardiaque normale et à la réparation de lésions éventuelles. Il est désormais admis que le cœur est un organe capable d'auto-renouvellement (Bergmann et al. 2009).

Les MSC adultes sont des cellules résidentes, censées soutenir l'homéostasie tissulaire et le renouvellement après une lésion (Wagers et Weissman 2004).

Dans les tissus sains, ces cellules vivent dans un état « latent » de quiescence au sein de niches hypoxiques mais conservent leur capacité à réintégrer le cycle cellulaire et à proliférer en réponse à des stimuli environnementaux (Shyh-Chang et Ng 2017).

Elles ont démontré une capacité à se différencier en cellules endothéliales et cellules musculaires lisses (Gambini et al. 2011; A. P. Beltrami et al. 2003). Le maintien de l'homéostasie cardiaque *via* cette différenciation est donc primordial.

En condition ischémique, les cardiomyocytes présentent une capacité limitée à proliférer et le tissu fibreux non contractile s'étend, entraînant une altération fonctionnelle progressant vers l'insuffisance cardiaque.

Dans le cadre d'un stress cardiaque aigu comme l'infarctus du myocarde, le traitement précoce rétablit l'apport sanguin du myocarde ischémique et diminue le risque de mortalité.

Cependant, lorsque l'apport sanguin myocardique interrompu est rétabli dans un certain laps de temps, cela provoque des dommages plus graves au myocarde ischémique d'origine.

Pendant l'ischémie/reperfusion myocardique (MIR), l'ischémie et la reperfusion provoqueraient toutes deux des lésions du myocarde ischémique. C'est ce que l'on appelle une lésion d'ischémie/reperfusion myocardique (MIRI) (He et al. 2022).

Les mécanismes physiopathologiques conduisant à une MIRI sont associés :

- Au stress oxydatif,
- A la surcharge calcique intracellulaire,
- Aux troubles du métabolisme énergétique,
- A l'apoptose,
- Au stress du réticulum endoplasmique,
- A l'autophagie,
- A la pyroptose,
- A la nécroptose,
- A la ferroptose.

Ceux-ci interagissent les uns avec les autres et conduisent directement ou indirectement à une aggravation de l'effet.

Par conséquent, la reperfusion myocardique peut majorer la mort des cardiomyocytes ischémiques chez les patients présentant un infarctus du myocarde (Hausenloy et Yellon 2013).

Cette MIRI provoque quatre types de lésions (He et al. 2022):

- L'étourdissement myocardique,
- Le phénomène de non-reflux,
- L'arythmie de reperfusion,
- Les lésions mortelles de reperfusion.

Les deux premières formes sont réversibles tandis que les autres sont irréversibles.

Cliniquement, l'intervention coronarienne percutanée (ICP) et la thérapie antiplaquettaire et anticoagulante sont principalement utilisées chez les patients exposés à ces deux derniers types de lésions afin de maintenir la perméabilité de l'artère coronaire.

Pendant la reperfusion myocardique, une restauration rapide et efficace du flux sanguin ne peut pas prévenir efficacement la MIRI.

Au cours de l'ischémie, les cardiomyocytes subissent un métabolisme anaérobie, ce qui entraîne une diminution des niveaux d'adénosine triphosphate (ATP) et du pH, ce qui augmente les niveaux de sodium (Na^+) et de (Ca^{2+}) intracellulaires.

La reperfusion entraîne une augmentation supplémentaire du Ca^{2+} intracellulaire et des espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui provoquent la MIRI (**Figure 1**).

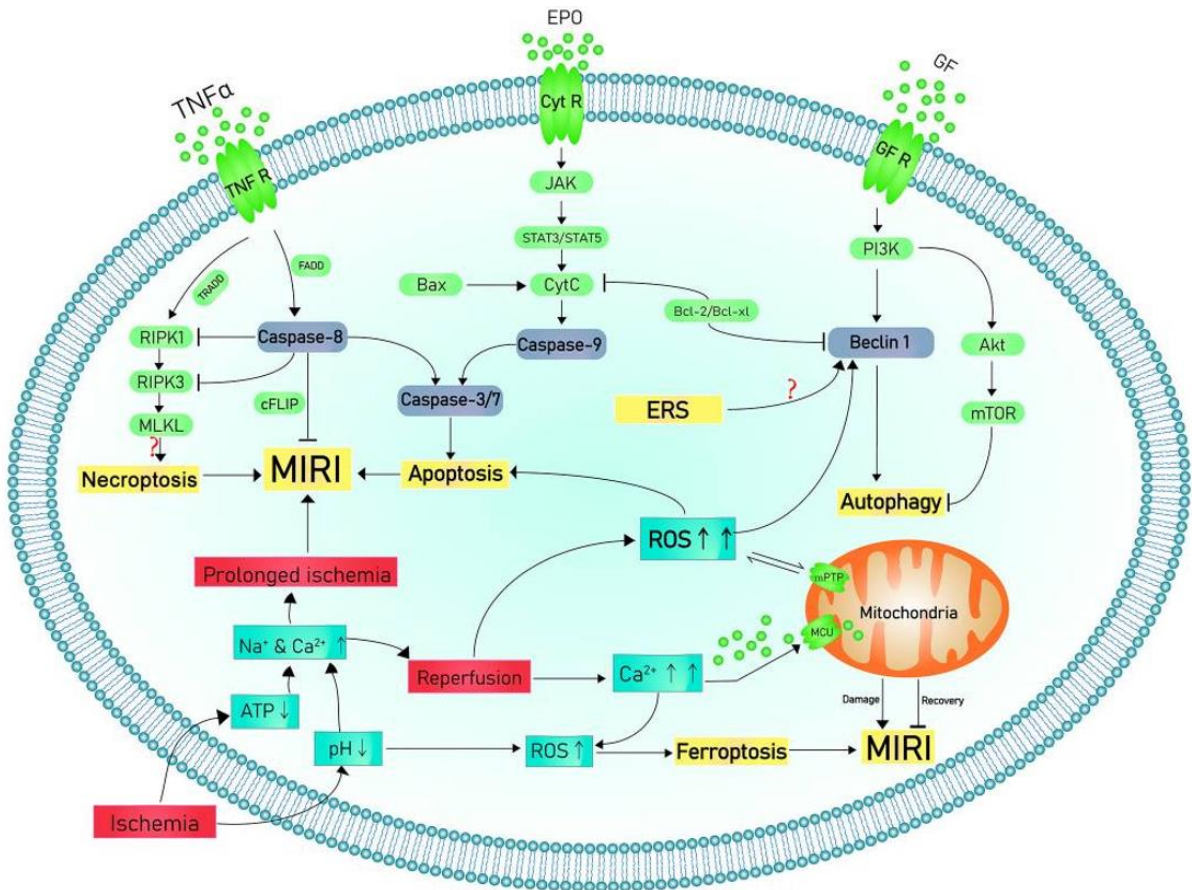


Figure 1 Physiopathologie de la MIRI (He et al. 2022)

Les principales voies de signalisation de l'apoptose sont les voies intrinsèque (mitochondriale) et extrinsèque (récepteur de mort cellulaire).

La voie intrinsèque est induite par la libération de cytochrome C (CytC), qui est régulée par les protéines de la famille *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) ; quant à la voie extrinsèque, elle est déclenchée par des récepteurs de mort tels que le *tumor necrosis factor receptor* (TNFR) qui activent la caspase-8.

Au cours de l'ischémie et de la reperfusion précoce, l'acidose cellulaire, l'instabilité environnementale interne et d'autres facteurs favorisent la libération d'ions ferrivalents ou ferreux par les enzymes, activant ainsi la réaction de Fenton et entraînant par conséquent une augmentation des ROS, ce qui conduit à la ferroptose des cardiomyocytes (He et al. 2022).

Ainsi, des mécanismes compensatoires tels que l'augmentation de la fréquence cardiaque ou encore le rétrécissement des vaisseaux sanguins permettent de pallier au défaut d'approvisionnement en maintenant une tension artérielle élevée.

Sur le long terme, ces mécanismes ne sont pas suffisants et il se produit un remodelage cardiaque entraînant l'apoptose des cardiomyocytes, l'hypertrophie et la fibrose cardiaque ayant pour conséquence la diminution de la fraction d'éjection ventriculaire.

Ce remodelage est consécutif à la mise en place d'une inflammation chronique et d'un stress oxydant générant la production de ROS liées à la dysfonction mitochondriale à l'origine de la mort cellulaire, notamment par la création de dommages à l'acide désoxyribonucléique (ADN).

Il a en effet été démontré que la production de ROS était à l'origine de l'activation de kinases, de facteurs de transcription hypertrophiant et de métalloprotéases de la matrice extracellulaire (MEC), mais sont aussi stimulant de la prolifération des fibroblastes cardiaques (Tsutsui, Kinugawa, et Matsushima 2011) et de la synthèse de collagène (Mudd et Kass 2008).

Ces modifications génèrent une hypertrophie et une fibrose cardiaque conduisant à l'installation d'une insuffisance cardiaque.

Lors d'un stress cardiaque chronique lié au vieillissement, la diminution des cardiomyocytes n'est pas compensée et s'accompagne d'une modification du contenu stromal avec une accumulation d'adipocytes ainsi qu'une fibrose importante, ce qui engendre une fonction contractile moins efficace (Benjamin et al. 2019; Keller et Howlett 2016).

Le développement de l'approche de médecine régénérative et la thérapie cellulaire sont les pistes thérapeutiques prometteuses dans le traitement de l'insuffisance cardiaque (Chien et al. 2019).

En effet, les mécanismes endogènes de régénération ne sont pas suffisants pour assurer la réparation de myocarde massivement endommagé, et cette constatation a amené de nombreuses équipes à tenter des approches de médecine régénérative, visant à repeupler ou revitaliser par des cellules des zones myocardiques lésées.

CELLULES SOUCHES

Les cellules souches sont des cellules non spécialisées du corps humain, capables de se différencier en n'importe quelle cellule d'un organisme et ayant la capacité de s'auto-renouveler.

La classification traditionnelle des cellules souches est basée sur leur plasticité ou leur versatilité développementale.

Ainsi il existe différents types de cellules souches et plusieurs étapes de spécialisation avec une potentialisation de développement réduite à chaque étape :

➤ **Les cellules souches totipotentes**

Ces cellules sont capables de se diviser et de se différencier en cellules de tout l'organisme.

La totipotence possède le potentiel de différenciation le plus élevé et permet aux cellules de former à la fois des structures embryonnaires et extra-embryonnaires.

Un exemple de cellule totipotente est le zygote.

➤ **Les cellules souches pluripotentes (PSC)**

Ces cellules forment des cellules de toutes les couches germinales mais pas de structures extra-embryonnaires comme le placenta.

Les cellules souches embryonnaires (ESC) ou encore les cellules souches pluripotentes induites (iPSC), dérivées de la couche épiblastique des embryons implantés en sont un exemple.

Leur pluripotence est un continuum, partant de cellules complètement pluripotentes telles que les ESC et les iPSC et se terminant par des représentants moins puissants : cellules multi-, oligo- ou unipotentes.

➤ **Les cellules souches multipotentes**

Ces dernières possèdent un spectre de différenciation plus étroit que les PSC, mais elles peuvent se spécialiser dans des cellules de lignées cellulaires spécifiques.

Ainsi, les cellules souches mésenchymateuses (MSC) stromales peuvent se développer en différents types de cellulaires tels que les adipocytes, les cellules endothéliales ou encore les ostéoblastes.

Après différenciation, une MSC devient une cellule oligopotente, ses capacités de différenciation sont alors restreintes aux cellules de sa lignée.

➤ **Les cellules souches oligopotentes**

Ces cellules peuvent se différencier en plusieurs types cellulaires.

Une cellule souche myéloïde est un exemple qui peut se diviser en globules blancs mais pas en globules rouges.

➤ **Les cellules souches unipotentes**

Elles se caractérisent par les capacités de différenciation les plus étroites et par la propriété particulière à se diviser de manière répétée.

Leur dernière caractéristique en fait un candidat prometteur pour une utilisation thérapeutique en médecine régénérative.

Les cellules souches peuvent également être classées selon leur origine :

- **Embryologique (ESC),**
- **Adulte (ASC).**

Les ESC humaines sont dérivées de la masse cellulaire interne. Au cours du processus d'embryogenèse, les cellules forment des agrégats appelés couches germinales : endoderme, mésoderme et ectoderme, chacune donnant finalement naissance à des cellules et tissus différenciés du fœtus et, plus tard, de l'organisme adulte (Sukoyan et al. 1993).

Une fois que les ESC humaines se sont différenciées en l'une des couches germinales, elles deviennent des cellules souches multipotentes, dont la puissance est limitée aux seules cellules de la couche germinale.

Après cela, les cellules souches pluripotentes sont présentes dans tout l'organisme sous forme de cellules indifférenciées, et leurs capacités clés sont la prolifération par

la formation de la génération suivante de cellules souches et la différenciation en cellules spécialisées dans certaines conditions physiologiques.

Les cellules souches somatiques ou adultes (ASC) sont indifférenciées et se retrouvent parmi les cellules différenciées de tout le corps après leur développement.

La fonction de ces cellules est de permettre la guérison, la croissance et le remplacement des cellules perdues chaque jour ; elles disposent d'une gamme restreinte d'options de différenciation.

Parmi de nombreux types, on distingue les suivants :

- **Les cellules souches mésenchymateuses** qui sont présentes dans de nombreux tissus.
Dans la moelle osseuse, ces cellules se différencient principalement en cellules osseuses, cartilagineuses et adipeuses.
En tant que cellules souches, elles constituent une exception car elles agissent de manière pluripotente et peuvent se spécialiser dans les cellules de n'importe quelle couche germinale.
- **Les cellules neurales** donnent naissance aux cellules nerveuses et à leurs cellules de soutien : les oligodendrocytes et les astrocytes.
- **Les cellules souches hématopoïétiques** forment toutes sortes de cellules sanguines : rouges, blanches et plaquettes.
- **Les cellules souches cutanées** forment, par exemple, les kératinocytes.

Il est possible de reprogrammer les cellules souches adultes vers leur état pluripotent (Zakrzewski et al. 2019).

Les cellules souches sont des cellules indifférenciées avec un potentiel élevé de différenciation, tandis que les cellules stromales sont des cellules différenciées présentes dans le tissu conjonctif, jouant un rôle de soutien et ayant un potentiel de différenciation plus restreint.

Au fur et à mesure de leur développement, ces cellules pluripotentes se transforment en cellules multipotentes, telles que les MSC.

Ces MSC ont une plasticité limitée, donnant naissance à des lignées cellulaires spécifiques, telles que les adipocytes, les cellules endothéliales et les ostéoblastes.

Cependant, elles conservent leur capacité à se spécialiser dans plusieurs types cellulaires connexes, tout en présentant des restrictions quant à leur différenciation, comme l'incapacité à générer des cellules cardiaques.

Comprendre cette transition cellulaire et la régulation précise des gènes impliqués dans la différenciation offre des perspectives prometteuses pour exploiter le potentiel thérapeutique des cellules souches dans le traitement de diverses affections et lésions tissulaires.

THERAPIES CELLULAIRE ET GENIQUE

THERAPIES CELLULAIRES BASEES SUR LES CELLULES

SOUCHES

Le tournant dans la thérapie par cellules souches est apparu en 2006, lorsque les scientifiques Shinya Yamanaka et Kazutoshi Takahashi ont découvert qu'il était possible de reprogrammer des cellules souches adultes multipotentes vers l'état pluripotent (Takahashi et Yamanaka 2013).

La transduction médiée par les rétrovirus de fibroblastes de souris avec quatre facteurs de transcription nommés les facteurs Yamanaka (Sommer et Mostoslavsky 2010), principalement exprimés dans les cellules souches embryonnaires :

- *Octamer-binding transcription factor (OCT-3/4),*
- *SRY-box transcription factor 2 (SOX2),*
- *Kruppel Like Factor 4 (KLF4),*
- *Cellular myelocytomatose oncogene (c-MYC),*

Pourrait inciter les fibroblastes à devenir pluripotents et ainsi améliorer les phénotypes cellulaires et physiologiques des souris vieillissant prématurément, notamment la perte

de cellules souches adultes, conduisant à une prolongation de la durée de vie ; cette nouvelle forme de cellules souches a été nommée iPSC.

Un an plus tard, l'expérience réussit également avec des cellules humaines (D. Shi et al. 2007).

Après ce succès, la méthode a ouvert un nouveau champ de recherche sur les cellules souches avec une génération de lignées iPSC personnalisables et biocompatibles avec le patient.

Récemment, des études se sont concentrées sur la réduction de la cancérogenèse et l'amélioration du système de conduction nerveuse ou cardiaque.

La thérapie cellulaire fait référence au transfert de matériel cellulaire autologue ou allogénique chez un patient à des fins médicales, elle vise à remplacer les tissus fibrosés par des équivalents possédant des propriétés d'élasticité et participant à :

- Restreindre le remodelage,
- Restaurer une contractilité myocardique,
- Augmenter l'angiogenèse,
- Améliorer les conditions de survie des cellules localement présentes,
- Moduler les réponses inflammatoires,
- Recruter des cellules progénitrices locales ou circulantes.

La thérapie cellulaire combine des thérapies unicellulaires ou multicellulaires basées sur des cellules souches et non-souches ; elle utilise généralement des cellules autologues ou allogéniques, peut impliquer du génie génétique ou des manipulations dans la formulation et peut être administrée par voie topique ou sous forme de produits injectables, de perfusions, de bio échafaudages ou de systèmes sans échafaudage (Mount et al. 2015).

Les cellules souches utilisées ou ciblées par la thérapie cellulaire peuvent être regroupées en trois catégories :

➤ **Les cellules souches pluripotentes (PSC)**

Les PSC donnent naissance à tous les types de cellules, à l'exception des cellules placentaires extra-embryonnaires.

Elles incluent :

- Les ESC, trouvées dans la masse cellulaire interne des blastocystes des embryons préimplantatoires,
- Les cellules souches épiblastiques (EpiSC)
- Les cellules germinales embryonnaires (EGC), trouvées dans les embryons post implantatoires,
- Les cellules iPSC, dérivées de la reprogrammation directe de cellules somatiques postnatales/adultes *in vitro* (Chu et al. 2020).

En général, l'utilisation clinique des PSC manque de preuves thérapeutiques et se limite à la médecine régénérative expérimentale, avec pour justification la différenciation cellulaire/la réparation des tissus dans différentes maladies, notamment la dégénérescence maculaire et l'infarctus du myocarde (Poulos 2018).

➤ **Les cellules souches adultes (ASC)**

Les cellules somatiques ou ASC sont des cellules rares et indifférenciées réparties parmi les cellules différenciées ou spécialisées dans les organes d'un organisme développé (Chagastelles et Nardi 2011).

Avec des potentiels d'auto-renouvellement et de différenciation plus limités que les PSC, les ASC reconstituent les cellules perdues ou contribuent à la guérison ou à la croissance des cellules en donnant naissance à des cellules précurseurs ou progénitrices et finalement à des cellules différenciées.

Les ASC comprennent (Gurusamy et al. 2018) :

- Les cellules souches hématopoïétiques (HSC),
- Les cellules souches cutanées (SSC),
- Les cellules souches neurales (NSC),
- Les cellules souches mésenchymateuses (MSC) :

Les MSC sont d'origine mésodermique non hématopoïétique et sont présentes dans plusieurs tissus, notamment la moëlle osseuse, le tissu adipeux, le sang périphérique et le placenta (Shammaa et al. 2020).

Elles peuvent se différencier en cellules osseuses, cartilagineuses et adipeuses, ainsi qu'en cellules de filiation ectodermique ou endodermique (Wei et al. 2013).

Au niveau moléculaire, les MSC devraient systématiquement exprimer un ensemble de marqueurs de surface (CD) sur leur membrane cellulaire composée de CD73, CD90 et CD105, qui ont été définis par la Société Internationale pour la Thérapie Cellulaire (ISCT) comme les marqueurs minimaux standard requis pour les MSC (Bourin et al. 2013).

En revanche, les MSC ne devraient pas exprimer les antigènes hématopoïétiques CD45, CD34, CD14 et CD19, qui les distinguent des HSC, souvent trouvées dans la même région.

De surcroit, ils sont négatifs pour CD11b, CD79a et HLA-DR (Karantalis et Hare 2015).

Ces critères ne sont cependant pas propres au MSC et des recherches continues sont nécessaires pour identifier les marqueurs de surface qui sont plus spécifiques à ce type de cellule stromale (Lv et al. 2014).

Les MSC ont des capacités de différenciation établies, qui ont suscité des études très avancées de leur potentiel régénératif (Mazo et al. 2008; Nagaya et al. 2005).

Elles sont également étudiées et utilisées pour leurs propriétés immunomodulatrices.

Enfin, lorsqu'elles ne se différencient pas de manière terminale, elles participent au soutien stromal, en sécrétant des facteurs trophiques de différentes natures : cytokines, protéines, acides ribonucléiques (ARN), solubles ou contenus dans des microvésicules (Karantalis et Hare 2015).

Contrairement aux ESC, qui sont principalement définies par leur origine dans les embryons à l'aide d'analyses moléculaires et fonctionnelles, les ASC ont des critères de définition variés, la morphologie cellulaire et les marqueurs de

surface étant les critères de référence dans la plupart des évaluations expérimentales ; cependant, la morphologie et les marqueurs de surface des ACS sont généralement impossibles à distinguer de ceux des cellules matures.

Par conséquent, les ASC ne peuvent pas être facilement isolées des tissus, mais enrichies à divers degrés de pureté dans des extraits de tissus (Chagastelles et Nardi 2011).

L'utilisation des ASC est principalement observée avec les HSC ou les MSC et englobe plusieurs domaines cliniques.

Ainsi, les MSC et les HSC sont largement utilisées dans des contextes de régénération, respectivement en tant que modalités expérimentales et établies dans le but de repeupler les cellules endommagées ou de réinitialiser l'homéostasie des tissus (Comella et al. 2016).

Dans les troubles du système immunitaire, les HSC et les MSC ont généralement été utilisées comme agents expérimentaux pour atténuer l'activité de la maladie grâce à leurs vastes mécanismes d'action, et ont montré des taux de réussite variables selon le type de maladie (Aly 2020).

Dans le cancer, les HSC constituent depuis longtemps le traitement standard des hémopathies malignes en raison de leur potentiel régénératif (Sharkis et al. 2012).

Les MSC ont également été étudiées dans le domaine du cancer en raison de leurs propriétés anti-tumorigènes (Shammaa et al. 2020), mais n'ont eu que des succès limités (Ruano et al. 2020; C.-L. Zhang et al. 2017).

➤ **Les cellules souches cancéreuses (CSC)**

Les CSC, ou cellules initiatrices de tumeurs, se trouvent dans les tumeurs solides et sanguines et proviennent de cellules souches normales ou de cellules progénitrices par plusieurs mécanismes proposés, tels que les mutations, le transfert de gènes, les altérations épigénétiques et les facteurs micro environnementaux (Codd et al. 2018; Soltanian et Matin 2011).

Les CSC possèdent des propriétés d'auto-renouvellement, de différenciation, de métastases et immunosuppressives et jouent un rôle important dans la

croissance du cancer, les métastases, les rechutes et la résistance à la chimiothérapie et à la radiothérapie (Atashzar et al. 2020).

Les critères d'identification des CSC comprennent généralement des marqueurs protéiques de surface (CD133, CD44, antigènes associés aux tumeurs) et des propriétés métaboliques/fonctionnelles (par exemple un métabolisme élevé ou encore une division cellulaire lente). Cependant, ils pourraient chevaucher ceux des cellules somatiques/germinales normales ou d'autres cellules souches (Chu et al. 2020).

Généralement, l'utilisation clinique des CSC se fait dans les contextes de cancer et implique le ciblage des CSC par différents agents interférant avec la voie de signalisation qui empêchent ensuite la croissance et la rechute du cancer (Lathia, Liu, et Matei 2020).

THERAPIES CELLULAIRES NON BASEES SUR LES CELLULES

SOUCHES

Ces thérapies cellulaires non basées sur les cellules souches impliquent généralement des cellules somatiques isolées du corps humain, propagées, développées, sélectionnées puis administrées aux patients à des fins curatives, préventives ou diagnostiques (Golchin et Farahany 2019).

Les thérapies cellulaires non basées sur les cellules souches comprennent les fibroblastes, les chondrocytes, les kératinocytes, les hépatocytes, les cellules des îlots pancréatiques et les cellules immunitaires, telles que les cellules T, les cellules dendritiques (DC), les cellules tueuses naturelles (NK) et les macrophages (El-Kadiry, Rafei, et Shammaa 2021).

MODE D'ADMINISTRATION

A l'origine, la thérapie cellulaire est autologue, les cellules sont prélevées chez le patient lui-même, éventuellement triées ou expandues *in vitro*, puis réinjectées à distance, ceci permettant de s'affranchir de toutes considérations immunologiques quant à un éventuel rejet.

Néanmoins la thérapie cellulaire autologue présente au moins deux inconvénients majeurs :

- La présence d'un délai entre le prélèvement des cellules et leur injection (2 à 3 semaines pour les MSC), empêchant toute possibilité de traitement en phase précoce en post-infarctus.
- La variabilité inter-individuelle des thérapeutiques reçues par chaque patient et donc leur efficacité (S. Jiang et al. 2008).

Chaque production est considérée comme un lot indépendant, qui doit être qualifié individuellement, et dont la qualité intrinsèque dépend de chaque donneur.

Les risques sont augmentés, ainsi que les difficultés logistiques et les coûts.

L'approche autologue est intéressante dans le cas où les cellules sont administrées plusieurs fois, justifiant la production en grandes quantités et générant des économies d'échelle.

Le concept de thérapie cellulaire allogénique a été introduit pour lever certaines limites selon les applications désirées.

Ce changement de stratégie a été facilité par la mise en évidence du caractère immuno-privilegié de certaines populations cellulaires, notamment les MSC, ceci lié à leurs propriétés immunomodulatrices (Malliaras, Kreke, et Marbán 2011).

Ainsi des études utilisant la thérapie cellulaire allogénique ont été mises en route chez l'Homme, avec pour espoir de gagner en reproductibilité des traitements administrés et en disponibilité, les cellules étant produites à grande échelle et constituant un lot unique faisant l'objet des contrôles de qualité (Hare et al. 2012).

Cependant, les cellules allogéniques sont, par définition, immunogènes pour le receveur, qui devra recevoir une immunosuppression coûteuse et contraignante pour en éviter le rejet.

Le développement d'une sensibilisation immunitaire du receveur, lors de la première injection, empêche les possibilités de ré-administration ultérieure des mêmes cellules allogéniques.

Outre les questions biologiques, la thérapie cellulaire se heurte à des questions de délivrance des cellules.

La technique de transfert de cellules la plus utilisée jusqu'à présent repose sur des injections en des sites multiples directement dans une zone ciblée plus ou moins étendue mais il existe différents modes d'administration (**Figure 2**) :

- L'injection par voie intra-coronaire réalisée en salle de cathétérisme cardiaque,
- L'injection intra-myocardique par voie trans-endocardique après cartographie du ventricule gauche,
- Les injections disséminées dans ou autour de la zone à traiter au cours d'une chirurgie thoracique,
- L'injection intra-veineuse périphérique ou intra-veineuse cardiaque.

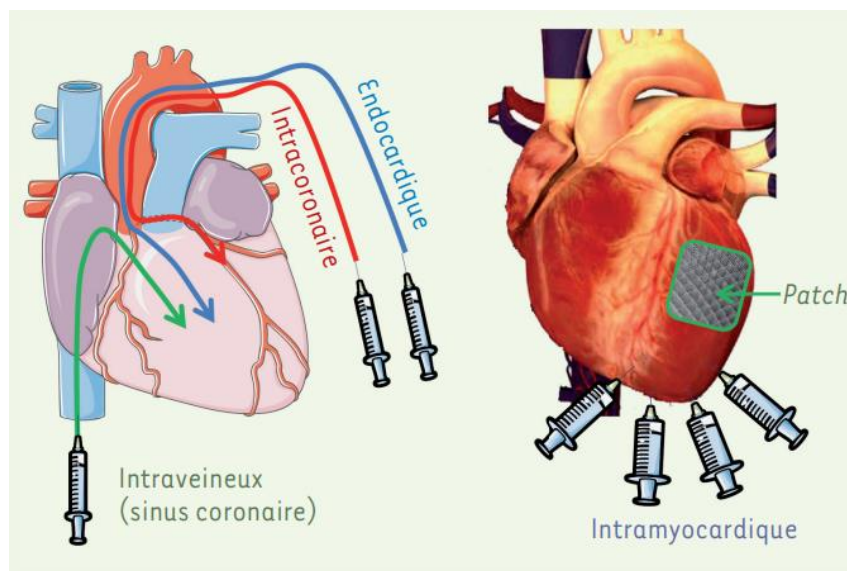


Figure 2 Modalités de délivrance des cellules (Vilquin et Etienne 2016)

L'utilisation de biomatériaux s'impose progressivement en adjonction de cellules nues (Menasché 2016) en « habillant » les cellules ; ces derniers peuvent protéger les cellules contre les effets de flux à l'injection.

Ils augmentent la survie et la rétention précoce en fonction de leurs paramètres physico-chimiques et peuvent mimer un environnement 3D de type niche, et certains peuvent être fonctionnalisés par des facteurs de croissance.

Enfin ces biomatériaux peuvent renforcer la structure même des parois ou du myocarde en fonction de leurs propriétés physiques.

Les différents types de biomatériaux sont les polymères naturels, les polymères synthétiques, les tissus dé-cellularisés, voire les feuillets cellulaires (simples ou multiples) où les cellules se soutiennent mutuellement et se complètent fonctionnellement (Jackman et al. 2015).

L'utilisation de biomatériaux chez l'animal, peut améliorer la survie, la rétention et l'efficacité des cellules, et même certains biomatériaux sans cellules peuvent se révéler efficaces (Bushkalova et al. 2019).

Les concepts liés aux mécanismes d'action des cellules proposées ont évolué, avec les mesures de leur efficacité, de leur survie et de leur capacité d'intégration.

Initialement, ces cellules étaient supposées apporter un bénéfice structural, contractile, et dans certains cas une différenciation directe en cardiomyocytes intégrés au tissu cardiaque était espérée.

Il est connu que les modifications du microenvironnement cardiaque ont un impact sur la fonction des cellules parenchymateuses et contribuent à l'incidence de nombreuses maladies cardiaques.

Or il a été montré que le vieillissement entraînait des effets négatifs, exercés par le stroma, sur l'homéostasie cardiaque soulignant le fait que ces bénéfices étaient vraisemblablement liés à des effets de sécrétions paracrines (Martini et al. 2019).

La production de cytokines, de facteurs de croissance, d'exosomes et de microparticules stimule l'angiogenèse locale diminue l'apoptose, l'inflammation, la fibrose et le remodelage, mais la formation de nombreux cardiomyocytes « vrais » n'a été obtenue qu'à partir d'ESC engagées.

La plupart des types cellulaires envisagés joue donc essentiellement un rôle trophique et de soutien (Silvestre et Menasché 2015).

Les exosomes et microvésicules contiennent quant à elles des protéines, des lipides, du matériel génétique, différents microARN (miARN), capables d'interagir ensemble ou de se compléter, et qui sont probablement à l'origine de tout, ou partie, des bénéfices observés et sont libérés par de nombreux types cellulaires incluant les ESC, les iPS, les MSC, les myoblastes, et ce, notamment après activation.

Captés par les cellules, ils leur apportent des informations, et font ainsi partie d'un réseau de communications intercellulaires.

Des études ont montré que ces vésicules amélioraient à elles seules la fonction cardiaque, l'angiogenèse locale et la survie des cellules, ces effets étant médiés en partie par des miARN (Nikfarjam et al. 2020 ; Bobis-Wozowicz et al. 2015).

L'effet bénéfique de l'injection des cellules persiste en dépit du faible nombre de cellules survivantes, en dépit de leur disparition ou de leur absence d'intégration. Cependant, les cellules qui présentent un réel phénotype cardiaque, une réelle capacité d'intégration, sont plus performantes.

Plusieurs essais cliniques ont établi l'innocuité de la thérapie par des MSC et ont montré des résultats prometteurs dans le cadre des maladies cardiovasculaires au cours des dernières décennies comme l'étude MESAMI menée par le Pr Roncalli au CHU de Toulouse (Razeghian-Jahromi et al. 2021; Guijarro et al. 2016).

Les données de la littérature ont montré une réduction de la charge cicatricielle, de la fibrose myocardique et de la taille de l'infarctus, une inversion du remodelage ventriculaire gauche et une amélioration de la fonction cardiaque après traitement par MSC (Guijarro et al. 2016).

THERAPIE GENIQUE

La thérapie génique consiste à modifier génétiquement certaines cellules du patient, ce qui implique d'identifier le gène et le rôle de la protéine qu'il encode.

Dans le domaine cardiovasculaire, les chercheurs développent la thérapie génique pour favoriser la régénération des tissus vasculaires en cas d'ischémie artérielle ou pour lutter contre la resténose survenant après de l'implantation d'un stent, à l'aide de gènes codant pour des protéines qui freinent ou au contraire stimulent ces processus.

Le suivi des patients traités, sur plusieurs années, permettra d'en savoir plus sur la sécurité et l'efficacité de ces médicaments.

Reste également à poursuivre le développement de nouveaux vecteurs pour contourner le problème de la réponse immunitaire qui peut se développer chez des patients, en particulier avec les vecteurs *adeno-associated virus* (AAV), et l'impossibilité de réinjecter le traitement une seconde fois.

La bio production de produits vivants (virus, vecteurs, cellules autologues) à échelle industrielle reste par ailleurs un obstacle majeur pour le développement des médicaments de thérapie génique innovants.

Les procédés sont issus de la recherche académique et ne sont pas toujours adaptés pour être déployés à grande échelle selon les bonnes pratiques de fabrication appliquées dans les usines de production pharmaceutiques.

Des innovations technologiques et industrielles sont encore nécessaires pour améliorer les rendements de production, d'autant que les doses nécessaires au traitement d'un patient ne permettent parfois la réalisation d'essais cliniques que sur un petit nombre de personnes.

Le prix de ces médicaments est également un nouveau sujet de réflexion en santé publique.

Le transfert d'acides nucléiques avec des nanoparticules et des exosomes à dégradation lente est devenu une approche thérapeutique potentielle, et de nouveaux gènes thérapeutiques, tels que S100A1, et des vecteurs présentant un meilleur tropisme cardiaque sont en cours de développement pour le traitement de l'insuffisance cardiaque (C. Beltrami et al. 2017; Henri et al. 2016; Ishikawa et al. 2014).

Le meilleur scénario serait évidemment un traitement précoce et efficace de l'infarctus du myocarde afin de prévenir le remodelage et la progression vers l'insuffisance cardiaque.

Améliorer le flux sanguin vers le myocarde récupérable et provoquer la prolifération des cardiomyocytes après un infarctus aigu du myocarde pourrait être utile à cet égard (Ylä-Herttuala et Baker 2017).

Enfin le passage de la thérapie de remplacement génique à la thérapie d'édition génique constitue un développement révolutionnaire dans l'histoire de la thérapie génique (G. Cao et al. 2021).

L'édition génétique offre non seulement une alternative aux maladies cardiovasculaires conventionnelles, mais constitue également le seul remède potentiel aux maladies cardiovasculaires héréditaires graves.

L'édition somatique de gènes résout définitivement le problème de la production insuffisante de molécules fonctionnelles et de l'excès de produits mutagènes.

Dans le même temps, *l'heritable human genome editing* (HHGE) a le potentiel d'empêcher la transmission de variants pathogènes à la génération suivante, ce qui réduit efficacement la proportion d'allèles pathogènes dans la population totale.

Actuellement, la thérapie d'édition génique en est encore au stade préclinique et les défauts qui limitent son application clinique sont une faible efficacité d'édition, un effet hors cible évident, une toxicité élevée et une faible spécificité tissulaire du système d'administration, ainsi qu'une reconnaissance insuffisante des gènes pathogènes dans les maladies cardiovasculaires.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I. CELLULES STROMALES MESENCHYMATEUSES

I.1. DEFINITION ET CARACTERISTIQUES

Les MSC représentent une population très étudiée compte tenu de leurs propriétés biologiques uniques.

Ce sont des cellules indifférenciées, multipotentes et auto-renouvelables, reconnues pour leur potentiel de différenciation et leur activité paracrine (Razeghian-Jahromi et al. 2021).

Les MSC ont la capacité de se différencier en différentes lignées (Margiana et al. 2022) :

- **Mésodermiques** (adipocytes, ostéocytes et chondrocytes),
- **Ectodermiques** (neurocytes),
- **Endodermiques** (hépatocytes).

Dans le tissu cardiaque, les MSC cardiaques (cMSC) peuvent principalement se différencier en (**Figure 3**) (Gambini et al. 2020) :

- **Cellules endothéliales,**
- **Adipocytes,**
- **Fibroblastes**

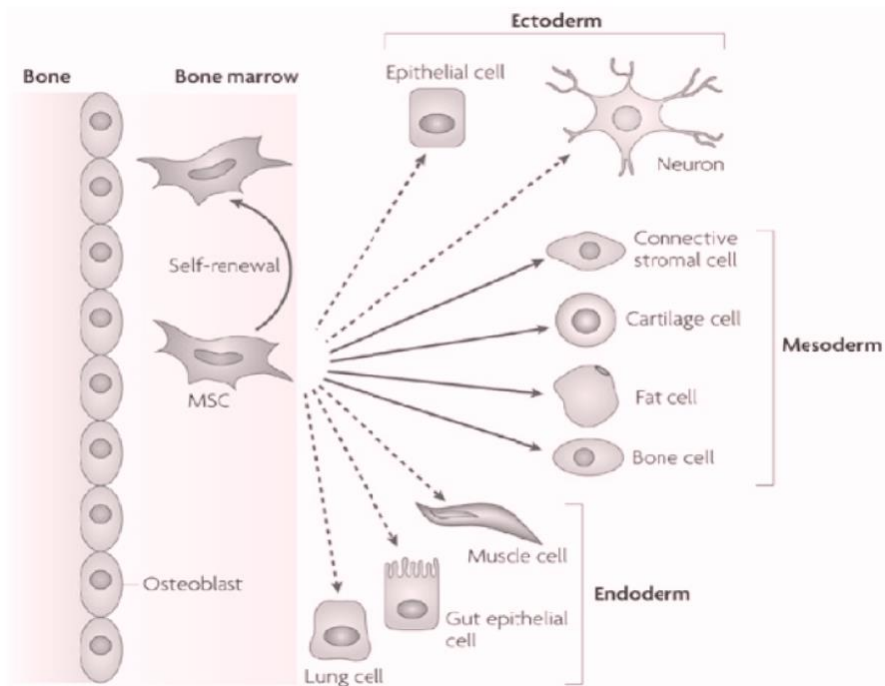


Figure 3 Différenciation des MSC (Bhaskar et al. 2014)

Aujourd'hui, les MSC sont définies selon les critères suivants (Alvites et al. 2022; Yin, Zhu, et Ankrum 2019) :

- **L'adhérence au plastique** lorsqu'elles sont maintenues dans des conditions de culture standard,
- **L'expression de marqueurs membranaires CD105+, CD73+ et CD90+**, associée à l'absence d'expression des marqueurs CD45-, CD34-, CD14- ou CD11b-, CD79α- ou CD19- et HLA-DR-,
- **Leur capacité à la différenciation** notamment en ostéoblastes, adipocytes et chondroblastes *in vitro* (Dominici et al. 2006).

Les MSC sont présentes dans tous les organes humains, mais généralement isolées des trois sources principales (Razeghian-Jahromi et al. 2021) :

- Cordon ombilical,
- Tissu adipeux,
- Moëlle osseuse.

I.2. MECANISMES D'ACTION

Les MSC interagissent avec d'autres types cellulaires selon différentes voies (Alvites et al. 2022; Karantalis et Hare 2015) :

- Paracrine,
- Autocrine,
- Effets directs, cellules à cellules.

Lorsqu'elles ne se différencient pas de manière terminale, elles participent au soutien stromal, en sécrétant des facteurs trophiques de natures différentes :

- Cytokines,
- Protéines,
- ARN solubles ou contenus dans des microvésicules.

Une fois activées après contact avec des cytokines inflammatoires et des interleukines présentes dans l'environnement inflammatoire où elles sont intégrées, les MSC produisent et sécrètent une myriade de molécules solubles qui vont agir en retour selon différents processus et engendrer un effet (**Figure 4**) (Alvites et al. 2022; Jimenez-Puerta et al. 2020; Peltzer, Lund, et Lataillade 2015; Khubutiya et al. 2014) :

- Anti-fibrotique,
- Anti-inflammatoire,
- Régénératif,
- Prolifératif,
- Immunomodulateur,
- Angiogénique.

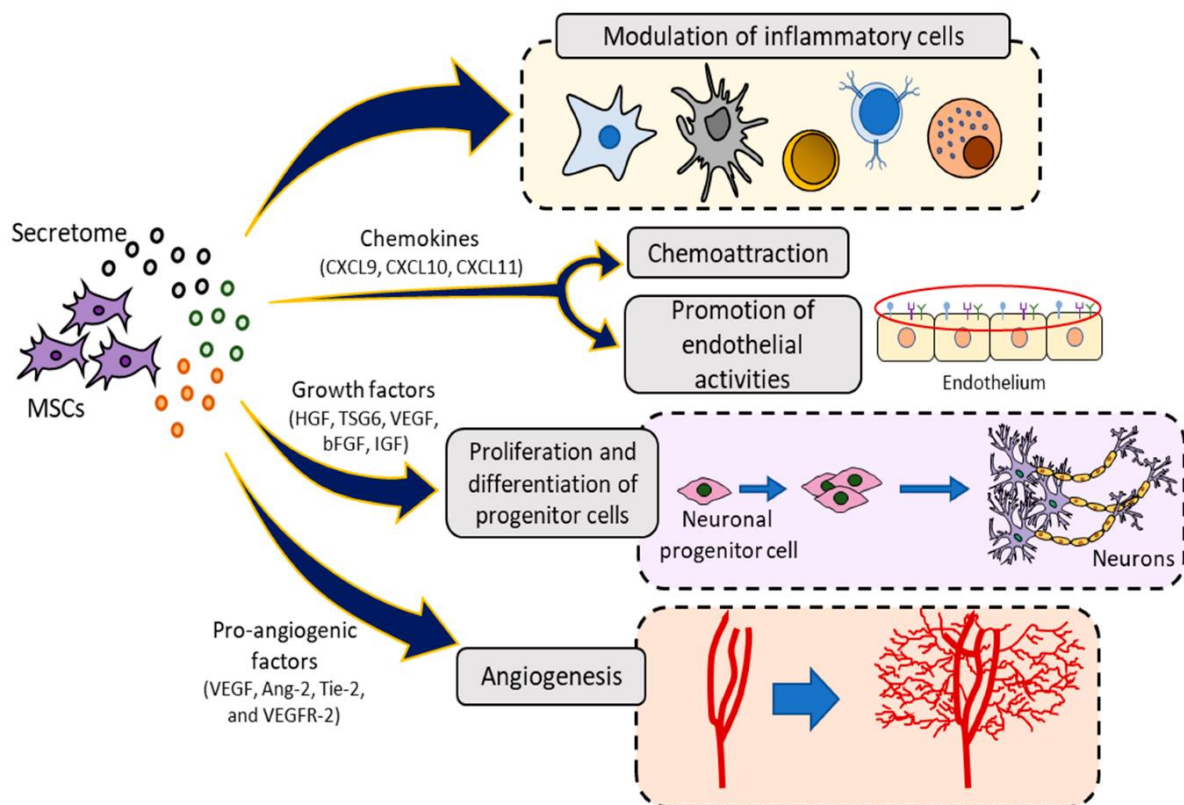


Figure 4 Activité paracrine des MSC (Jimenez-Puerta et al. 2020)

Plusieurs études ont montré que seule une petite proportion de MSC transplantées survit et s'intègre dans les tissus de l'hôte (De Becker et Riet 2016) ; par conséquent, les effets thérapeutiques des MSC ne semblent pas dépendre uniquement de l'interaction directe de cellule à cellule.

Le mode d'action paracrine des MSC entraîne un effet bénéfique sur les cellules de l'environnement lésionnel plutôt que d'engendrer une différenciation cellulaire permettant de remplacer des cellules lésées (Maacha et al. 2020).

Les MSC sont également capables de garantir la survie et la prolifération cellulaire, et de moduler la réponse immunitaire *via* cette signalisation paracrine.

Cette activité paracrine comprend la sécrétion de petites molécules telles que des facteurs de croissance, des cytokines, des chimiokines et la libération de vésicules extracellulaires (EV) contenant un large éventail de molécules telles que l'ARNm, les peptides/protéines et les miARN (W. S. Park et al. 2018).

Bien qu'il ait été admis que l'activité homéostatique et immunomodulatrice des MSC dépendait du nombre de MSC, il a été constaté qu'elle dépendait davantage des

facteurs paracrines sécrétés par ces cellules, également appelés « sécrétome », qui sont produits une fois les MSC activées (Jimenez-Puerta et al. 2020).

I.2.1 SECRETOME

Le sécrétome correspond à l'ensemble des facteurs solubles sécrétés par une cellule stimulée sous certaines conditions environnementales ; la liste des facteurs produits et sécrétés par les MSC est longue et n'est pas encore entièrement décrite, mais comprend des éléments tels que :

- L'*indoleamin 2,3 di oxygenases* (IDO),
- Le *stromal cell derived Factor 1* (SDF-1),
- La *prostaglandin E2* (PGE2),
- L'*interleukine 6* (IL-6),
- Le *transforming growth factor-beta* (TGF- β),
- Divers facteurs de croissance et des ligands de chimiokines.

Cet ensemble de facteurs peut moduler la réponse inflammatoire dans différentes directions, stimuler la différenciation et la prolifération des cellules progénitrices locales, favoriser l'angiogenèse et augmenter l'activité endothéliale et fibroblastique (Alvites et al. 2022; Y. Wang et al. 2014).

➤ **Les facteurs immunomodulateurs**

En 2002, il a été montré que les MSC avaient des capacités immunomodulatrices *in vitro* dans des réactions lymphocytaires mixtes (Bartholomew et al. 2002).

En réalisant des réactions lymphocytaires mixtes avec des MSC soit en contact direct soit *via* des *transwells*, il a été mis en relief que cette capacité immunosuppressive était en partie due à des facteurs solubles (Di Nicola et al. 2002).

En effet, l'inhibition de la prolifération lymphocytaire était partiellement restaurée par l'ajout d'anticorps neutralisants anti-TGF- β 1 ou anti-*hepatocyte growth factor* (HGF), suggérant l'implication de ces deux cytokines dans l'action médiée par les MSC.

Les principaux mécanismes par lesquels les MSC peuvent influencer positivement le processus auto-immun comprennent (C. Yang et al. 2021) :

- L'inhibition des cellules B et T,
- La diminution des ratios des lymphocytes T *helper* Th1/Th2, Th17/Treg et M1/M2,
- La régulation à la baisse des cytokines inflammatoires et des facteurs tels que l'IL-1, IL-6, IL-17, le *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α), l'interféron gamma (IFN- γ),
- La régulation à la hausse d'autres facteurs comme IL-4, IL-10 et TGF- β .

➤ Les facteurs pro-angiogéniques

Les MSC sont capables de produire du *vascular endothelial growth factor* (VEGF), mais aussi du HGF, du *monocyte chemotactic protein 1* (MCP1) et du SDF1, facteurs clés du remodelage vasculaire.

Une étude a montré que des milieux conditionnés de MSC contenant tous les facteurs décrits précédemment ainsi que du *basic fibroblast Growth Factor beta* (β FGF) et du *placental growth factor* (PlGF), pouvaient favoriser la prolifération des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses.

Or l'addition d'anti-VEGF et anti- β FGF inhibe partiellement ces effets (Kinnaird et al. 2004).

Beaucoup d'études *in vivo* sur des modèles d'ischémie, indiquent un effet des MSC sur l'augmentation de la densité capillaire ou une amélioration de la perfusion des zones ischémiques même si les mécanismes restent à définir (Khubutiya et al. 2014).

➤ Les facteurs anti-apoptotiques

Les MSC synthétisent des protéines inhibitrices de l'apoptose telles que la protéine BCL-2, la *survivin* (IAP), et la protéine *serine/thréonine kinase family 1* (AKT).

Dans un modèle d'insuffisance rénale aiguë, il a été montré que des milieux conditionnés de MSC contenant du VEGF, de l'HGF, et de l'*insulin-like growth*

factor 1 (IGF-1) pouvaient favoriser *in vitro* la croissance et la survie des cellules endothéliales (Tögel et al. 2007).

Ces travaux suggèrent que les MSC, en plus de la production de facteurs directement anti-apoptotiques produisent des molécules qui participent à l'inhibition de l'apoptose comme le VEGF.

➤ **Les facteurs chimio-attractifs**

Les MSC sont capables de sécréter un grand nombre de chimiokines permettant d'attirer les monocytes, les lymphocytes T, B, NK, les cellules dendritiques mais aussi les progéniteurs hématopoïétiques et endothéliaux (da Silva Meirelles et al. 2009).

➤ **Les facteurs anti-fibrotiques**

Des études indiquent une action anti-fibrotique des MSC, dont l'injection serait efficace si les MSC étaient administrés avant l'installation d'une fibrose myocardique majeure (da Silva Meirelles et al. 2009).

Cet effet anti-fibrotique serait médié, chez la souris, par la sécrétion de β FGF et d'HGF dans un modèle de fibrose du tissu adipeux induit par ischémie/reperfusion (Suga et al. 2009).

➤ **Les facteurs de support et croissance**

Le rôle stromacitaire des MSC dans l'homéostasie de la niche hématopoïétique est connu et les cocultures *in vitro* de MSC/CSH de moëlle osseuse ont permis de mettre en évidence que cette capacité trophique des MSC était liée à la sécrétion de facteurs comme le *stem cell factor* (SCF), le *leukemia inhibitor factor* (LIF), l'IL6 et le *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF).

In vivo, il a également été montré que le maintien du pool de CSH était en partie lié à la sécrétion de SDF-1 par les MSC (Sugiyama et al. 2006).

1.2.2 MICROVESICULES

Les microvésicules (MV) ou ectosomes, particules dont la taille varie de 100 à 1000nm et exosomes, particules dont la taille varie de 40 à 100nm, sont des microparticules dérivées des cellules qui prennent forme à travers la membrane plasmique.

Alors que les ectosomes se constituent à partir de la membrane cytoplasmique dans des situations principalement physiologiques ou physiopathologiques, les exosomes proviennent de corps multivésiculaires sécrétés par exocytose après fusion avec la membrane cellulaire, parfois suite à un stress du réticulum endoplasmique (Kao et Papoutsakis 2019).

Des études récentes autour des MV des MSC ont révélé que leur cargaison vésiculaire comprenait différents types d'ARN : ARNm, ARN de transfert (ARNt), miARN, de protéines et de peptides, d'enzymes, de facteurs immunomodulateurs, de facteurs de croissance ou encore de lipides capables de médiation de la communication de cellule à cellule.

Ainsi, ces vésicules jouent un rôle très important dans les communications intercellulaires et peuvent influencer thérapeutiquement les tissus lésés, atténuant l'activation des cellules inflammatoires et diminuant le niveau d'apoptose et de stress oxydatif (W. Chen et al. 2016; Bruno et al. 2009).

Il a aussi été démontré que les exosomes dérivés de MSC possédaient des propriétés immunologiques semblables à celles des cellules dont ils sont issus (B. Zhang et al. 2014).

L'efficacité des MSC serait également liée au phénomène dit de « domiciliation lésionnelle » leur permettant, après injection, de se diriger vers les sites de lésions (Wise et al. 2014).

Alternativement, les MV, en particulier les exosomes, peuvent également agir comme des transfert d'ARN entre les cellules, régulant ainsi l'expression des gènes et influençant indirectement et thérapeutiquement différents scénarii cliniques (**Figure 5**) (Jimenez-Puerta et al. 2020) :

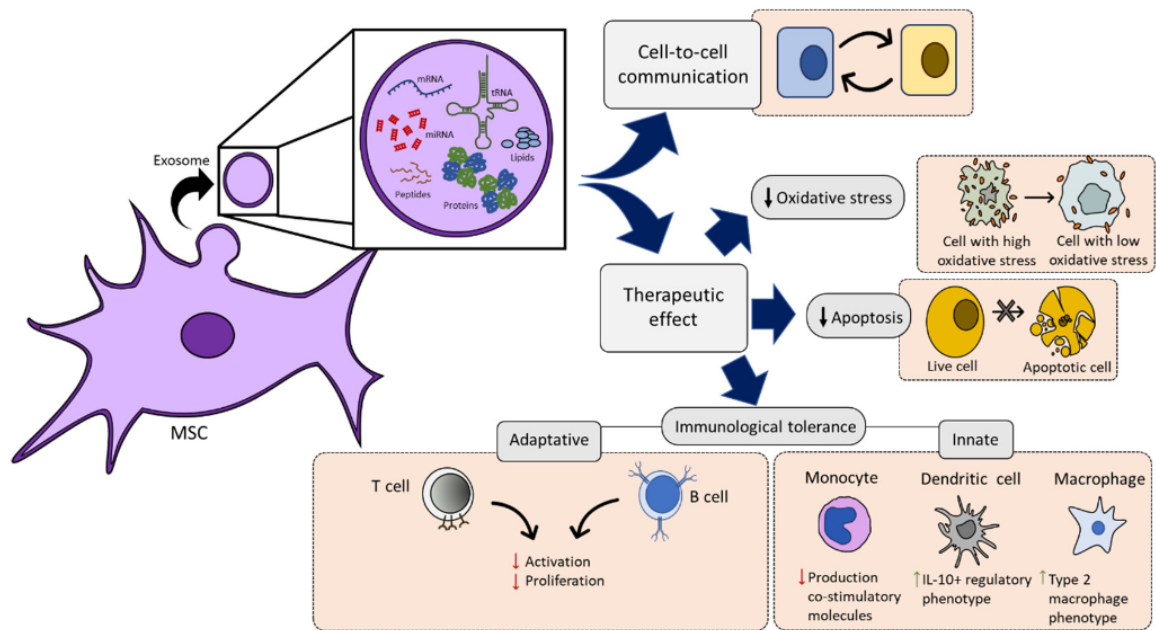


Figure 5 Rôle des exosomes excrétés par les MSC dans la communication cellule/cellule et effets thérapeutiques (Jimenez-Puerta et al. 2020)

Sur le plan thérapeutique, les miARN ont des effets bénéfiques sur la régénération de différents tissus, avec par exemple les miR27a, miR196a et miR206 accélérant la régénération osseuse (Ogata et al. 2018) ou encore miR133 stimulant le remodelage tissulaire neuronal après un AVC (Xin et al. 2013) et miR125b-5p ayant des effets anti-apoptotique en cas d'infarctus du myocarde (Zhu et al. 2018).

II. CELLULES STROMALES MESENCHYMATEUSES ET THERAPEUTIQUE

La néovascularisation, la cardioprotection, l'angiogenèse, l'inhibition de l'apoptose des cardiomyocytes, l'amélioration de la réparation du myocarde et le remplacement des cardiomyocytes morts sont les cibles majeures de la thérapie utilisant les MSC dans le cadre de l'infarctus du myocarde (Razeghian-Jahromi et al. 2021; Yin, Zhu, et Ankrum 2019; Karantalis et Hare 2015).

Les thérapies cellulaires ont été développées comme une stratégie alternative pour soutenir la génération endogène de nouveaux cardiomyocytes fonctionnels.

À ce jour, différentes sources de cellules telles que les MSC issues de moelle osseuse (bmMSC), les cellules progénitrices cardiaques ou des cardiomyocytes dérivés de cellules souches embryonnaires ont été évalués afin d'identifier le type de cellule le plus approprié pour la réparation cardiaque.

Il a été démontré que ces types de cellules conféraient des avantages thérapeutiques à la réparation cardiaque ou génèrent directement de nouveaux cardiomyocytes (Eschenhagen et al. 2017); cependant, le degré de formation de nouveaux cardiomyocytes dépend de la survie et du maintien de ces cellules souches dans le cœur.

La principale raison des difficultés rencontrées dans ces thérapies cellulaires humaines étant la faible survie et l'intégration minimale des cellules greffées au sein du tissu hôte (Eschenhagen et al. 2017).

Les thérapies cellulaires reposent sur l'expansion *ex vivo* de cellules sous oxygène ambiant et en présence de niveaux élevés de glucose qui favorisent la respiration mitochondriale pour la production d'énergie (Keisuke Ito et Suda 2014).

Lors de la transplantation, les cellules souches sont exposées à un milieu cardiaque ischémique composé de cytokines inflammatoires et de ROS, qui altèrent le métabolisme.

Alors que le changement métabolique vers la phosphorylation oxydative peut stimuler la différenciation des cellules, il peut également entraîner une libération accrue de ROS, un sous-produit de l'activité mitochondriale qui conduit ensuite à des dommages cellulaires et à la sénescence (Keisuke Ito et Suda 2014).

Le métabolisme énergétique est au cœur des processus de différenciation, de conservation de l'état indifférencié ou encore de la prolifération.

La compréhension du métabolisme et des caractéristiques métaboliques des cellules souches au cours de l'expansion, de la prolifération et de la survie post-transplantation *ex vivo* pourrait permettre de jouer sur l'efficacité thérapeutique pour la réparation cardiaque.

Le rôle du métabolisme dans la régulation de la fonction des cellules stromales a ouvert de nouvelles perspectives pour améliorer l'efficacité de la thérapie cellulaire cardiaque.

Les stratégies visant à atténuer le choc métabolique subi par les cellules souches après la transplantation, ainsi qu'à améliorer leur adaptation à un nouvel environnement ischémique peuvent potentiellement atténuer la mort cellulaire et améliorer le succès de la thérapie (Figure 6) (Rigaud et al. 2020) :

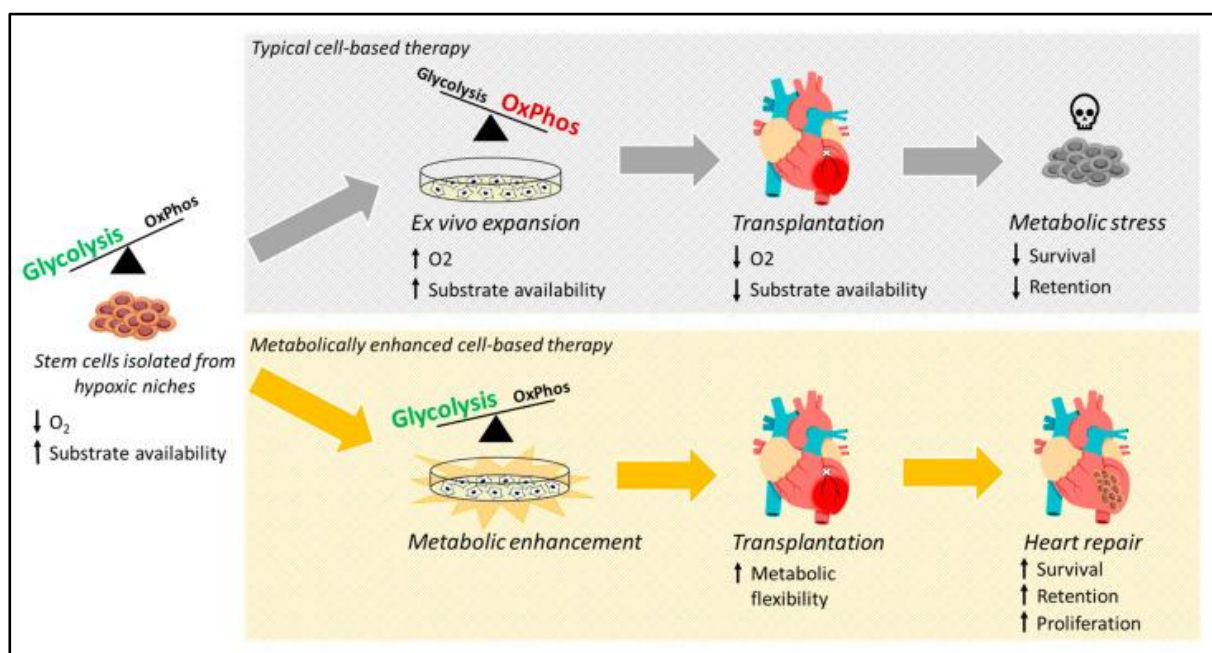


Figure 6 Thérapies cellulaires et intérêts de la reprogrammation métabolique (Rigaud et al. 2020)

L'une des premières études visant à modifier le métabolisme des cellules souches pour améliorer la fonction cardiaque après une blessure a été publiée en 2003 par Mangi *et al.* (Mangi et al. 2003).

Dans cette étude, les auteurs ont transplanté des MSC génétiquement modifiées surexprimant *Akt* dans un myocarde ischémié, entraînant une amélioration de la fonction cardiaque et une diminution de l'inflammation, de la fibrose et de l'hypertrophie, associées à une survie et une rétention plus élevée des MSC.

On sait que AKT régule la glycolyse dans les cellules souches or il a également été démontré que les MSC surexprimant *Akt* augmentaient leur métabolisme glycolytique (Noiseux et al. 2006).

Ainsi, la surexpression d'*Akt* peut pousser les cellules à présenter un état glycolytique accru, améliorant ainsi la survie dans le myocarde ischémié.

En aval de *Akt*, le proto-oncogène *serine/threonine kinase (Pim-1)* régule le métabolisme énergétique et la croissance cellulaire en augmentant les niveaux des protéines de l'oncogène *c-Myc* et du *peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 α)* (Beharry et al. 2011).

Il est intéressant de noter qu'une surexpression de *Pim-1* a été observée dans les bmMSC c-Kit⁺ isolées de patients souffrant d'insuffisance cardiaque (Kulandavelu et al. 2016). *Pim-1* améliore la réparation cardiaque dans les modèles d'infarctus du myocarde chez les rongeurs et les porcs.

Dans chaque cas, la surexpression de *Pim-1* a entraîné une augmentation significative de la survie et de la prolifération cellulaire, conduisant à une amélioration de la fonction cardiaque après transplantation dans le cœur ayant subi un infarctus ; cet effet salutaire de la surexpression de *Pim-1* étant liée à une amélioration progressive de l'activité métabolique (Rigaud et al. 2020).

Les thérapies cellulaires reposent généralement sur l'isolement de cellules stromales hautement glycolytiques provenant des niches hypoxiques, suivi d'une expansion *ex vivo* sous des niveaux élevés d'oxygène et de glucose, ce qui déplace le métabolisme énergétique vers un état plus oxydatif.

Lors de la transplantation cardiaque, les cellules souches cultivées sont à nouveau exposées à un milieu ischémique caractérisé par une privation intense d'oxygène et de glucose, essentiels à l'activité mitochondriale.

Cette transition brutale de *l'in-vitro* à *l'in-vivo* conduit à un stress métabolique engendrant l'apoptose des cellules, d'où l'intérêt de reconditionner le métabolisme des cellules souches pour promouvoir la flexibilité métabolique et améliorer la survie des cellules et par voie de fait l'efficacité thérapeutique (Rigaud et al. 2020).

L'hypoxie et l'augmentation de la concentration en radicaux libres dans le contexte de l'infarctus du myocarde génèrent un microenvironnement néfaste pour les MSC transplantées.

Ainsi, le pré-conditionnement des MSC en utilisant l'hypoxie ou des agents pharmacologiques ou chimiques en plus de nouvelles stratégies, telles que les MSC médiées par les exosomes, génétiquement modifiées ou encore sur des patches cardiaques, permettraient d'améliorer l'efficacité globale de la transplantation de MSC.

Toutes ces techniques favorisent la survie des MSC et leur capacité à former un environnement régénérateur et prolifératif (**Figure 7**) (Matta et al. 2022; Razeghian-Jahromi et al. 2021).

En outre, différents agents pharmacologiques et chimiques comme le lénalidomide, la vitamine E, le sévoflurane, l'acide valproïque, l'astragaloside IV, l'extrait de pomme, l'icaroside II, la génistéine, l'ocytocine, la déféroxamine, l'atorvastatine, le 2,4-dinitrophénol, l'angiotensine II, les bloqueurs des récepteurs de l'angiotensine, le lipopolysaccharide à faible dose, la mélatonine, la rapamycine, l'acide tout-trans rétinolique et l'acide polyribocytidylique ont été utilisés pour traiter les MSC et agissent de manière spécifiques (Hu et Li 2018).

Par ailleurs, les exosomes, produits et libérés en continu par diverses cellules interférant dans les voies d'interaction cellule/cellule sont impliqués dans différents modèles physiologiques et pathologiques et sont principalement isolés pour une application thérapeutique, soit par des méthodes basées sur l'ultrafiltration ou l'ultracentrifugation (Nikfarjam et al. 2020).

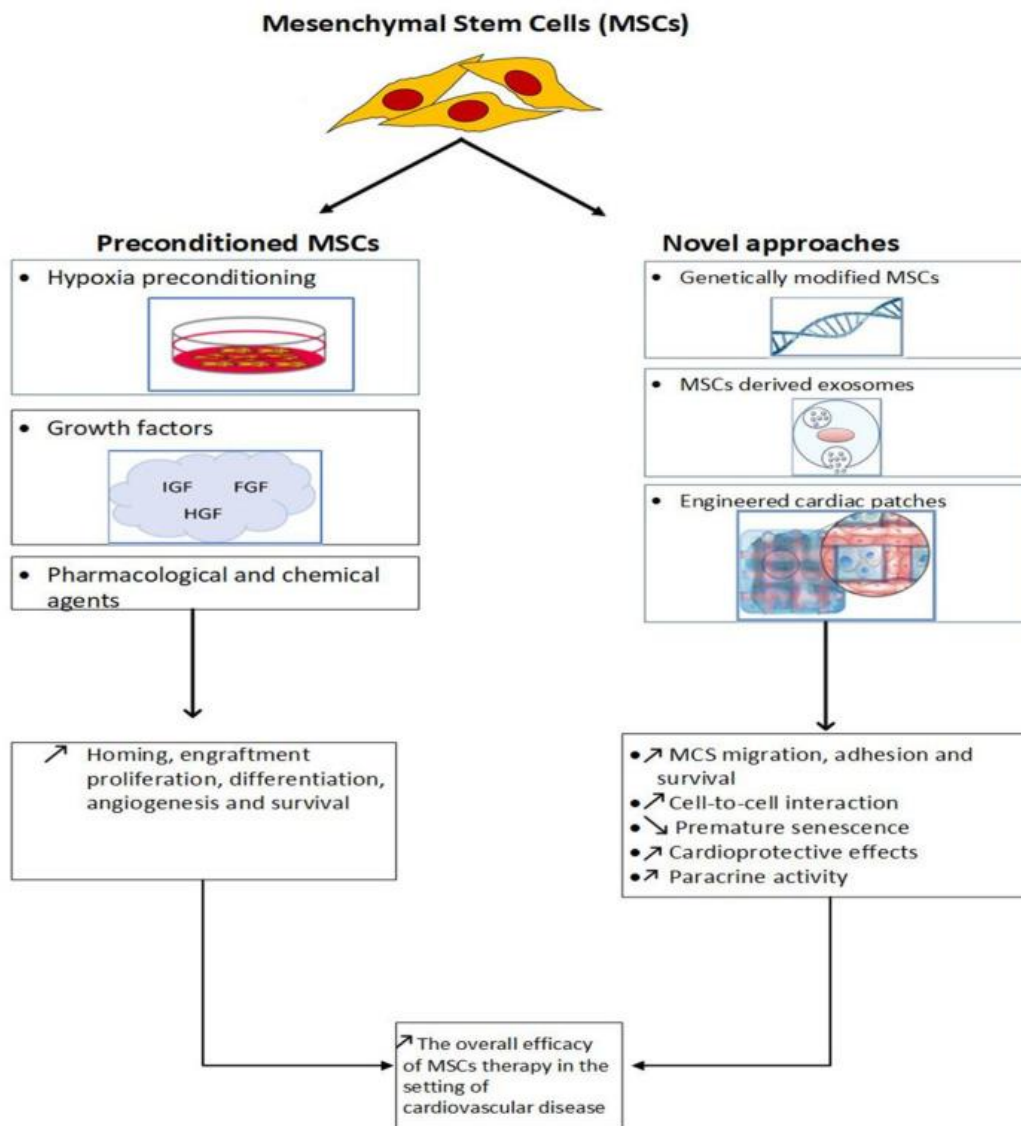


Figure 7 Nouvelles approches de pré-conditionnement des MSC et leurs principaux impacts (Matta et al. 2022)

Des modèles animaux expérimentaux précliniques ont démontré les avantages thérapeutiques des exosomes dérivés de MSC dans le cadre de l'infarctus du myocarde (Zhu et al. 2018).

La modification génétique des MSC consiste, quant à elle, à charger un vecteur génétique construit dans les MSC afin de produire ou de surexprimer des gènes spécifiques visant à améliorer leur migration, leur adhésion, leur survie et à réduire la sénescence prématurée.

Enfin, la technologie des patches cardiaques représente une révolution dans la thérapie par cellules souches pour les maladies cardiovasculaires, mais le processus de

fabrication des matrices doit encore être amélioré pour passer en clinique (Matta et al. 2022).

A titre d'exemple, l'essai MESAMI est une étude de thérapie cellulaire, pilote bi centrique, menée par le Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Toulouse sous la direction du Professeur Jérôme Roncalli entre 2009 et 2014 pour les phases 1 et 2 et conduite selon le protocole suivant (Figure 8) :

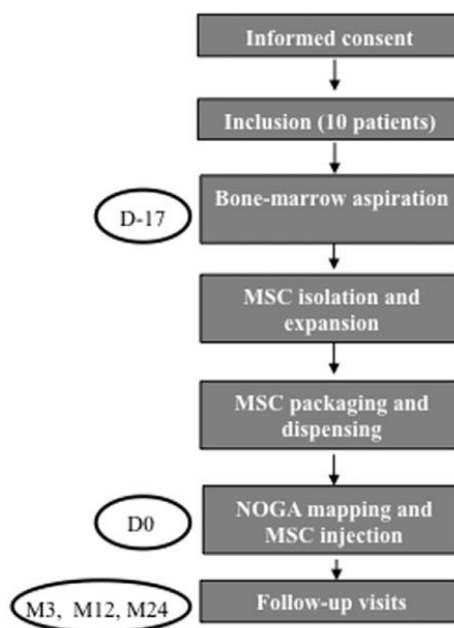


Figure 8 Organigramme essai MESAMI I (Guijarro et al. 2016)

Elle a été conçue pour tester la faisabilité et l'innocuité des MSC autologues injectées par voie intra myocardique pour le traitement de la cardiomyopathie ischémique.

L'étude a inclus dix patients présentant une ischémie myocardique chronique, des fractions d'éjection (FE) du ventricule gauche (VG) $\leq 35\%$ et des défauts de perfusion réversibles qui suivaient un traitement médical optimal stable et n'étaient pas candidats à la revascularisation.

Des MSC (environ $61,5 \times 10^6$ cellules/patient) ont été injectées dans dix à seize sites viables au bord de la cicatrice du VG via un cathéter guidé par NOGA.

Les deux critères d'évaluation principaux, la faisabilité (récolte réussie, expansion et injection de MSC autologues) et l'innocuité (absence d'événements indésirables

graves (EIG)) ont été atteints chez les dix patients au moment du suivi à 1 mois, et aucun des EIG signalés au cours de la période de suivi complète à 2 ans n'étaient imputables à l'essai (Guijarro et al. 2016).

Les résultats de l'essai suggèrent que les MSC autologues peuvent être prélevées, expansées et injectées par voie trans-endocardique en toute sécurité dans le cœur de patients atteints d'ischémie myocardique sévère, chronique et réversible et d'une fonction cardiaque altérée, et que cette approche thérapeutique peut être associée à des améliorations de la performance myocardique et de l'état fonctionnel du patient (Guijarro et al. 2016).

La sécurité de l'injection de MSC chez les patients atteints de cardiomyopathie ischémique chronique est également étayée par les résultats de l'essai TAC-HFT, étude randomisée et contrôlée qui comprenait dix-neuf patients traités avec des MSC injectés et dix qui ont reçu des injections de placebo (Heldman et al. 2014).

L'essai MESAMI 1 a été mené avec un très petit nombre de patients (n=10) et n'incluait pas de groupe placebo ; les résultats ont dû être interprétés avec prudence et ont été utilisés principalement pour le développement de nouveaux essais.

Cet essai correspondait à la phase de faisabilité et de sécurité du programme MESAMI afin d'établir l'utilisation des MSC en tant que médicament de thérapie innovante (MTI) et obtenir l'autorisation de mise sur le marché des MSC dans l'Union européenne via la première Plateforme Européenne de Thérapie Cellulaire (*Cell For Cure*, Les Ullis, France) avec l'utilisation de processus de production conformes aux directives des bonnes pratiques de fabrication (BPF).

L'efficacité du processus de production actuel est actuellement testée sur une plus grande population de patients via une étude clinique randomisée, en double aveugle, multicentrique et contrôlée par placebo (groupe placebo absent sur la phase primaire) (Guijarro et al. 2016).

L'objectif de cette étude étant de démontrer une amélioration fonctionnelle, en mesurant la VO_2 max à 3 mois dans les groupes placebo et thérapie cellulaire.

III. CELLULES STROMALES MESENCHYMATEUSES ET METABOLISME

III.1. CHAINE RESPIRATOIRE

Les mitochondries sont des petits organites cellulaires situés dans le cytoplasme des cellules, elles peuvent modifier leurs interactions, leur morphologie (Y. Liu et al. 2017) et leur localisation cellulaire afin de répondre à la demande métabolique ou à un stress cellulaire (Kubli et Sussman 2017).

Au niveau de la membrane interne mitochondriale se trouve la chaîne respiratoire composée de cinq complexes (Kubli et Sussman 2017) et représentant le système d'oxydation phosphorylante (OXPHOS) enchâssé dans la membrane mitochondriale interne (**Figure 9**) (Dudkina et al. 2010) :

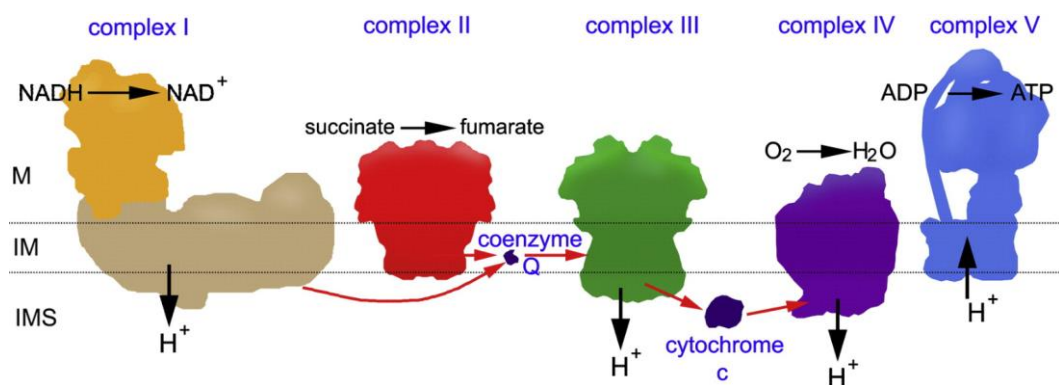


Figure 9 Représentation schématique du système OXPHOS (Dudkina et al. 2010)

➤ **Complexe I : NADH Déshydrogénase**

Il est la voie d'accès principale du glucose à la chaîne de transport des électrons et catalyse le transfert d'une paire d'électrons du NADH, H⁺ vers l'ubiquinone qui, réduite, forme l'ubiquinol.

Cette réaction est couplée à la translocation de quatre protons vers l'espace intermembranaire depuis la matrice.

Chez l'Homme, avec quarante-six sous-unités, il constitue le plus gros des complexes (1MDa) ; sept de ses sous-unités sont codées par le génome mitochondrial, les *NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1* à 6 (ND1 à ND6) et ND1L, ce sont des polypeptides hydrophobes transmembranaires homologues de polypeptides bactériens.

En s'intégrant à la membrane interne, le complexe I prend la forme d'un « L », avec deux bras perpendiculaires.

Le premier bras, hydrophobe et comprenant les sous-unités d'origine mitochondriale, s'enfonce dans la membrane et va constituer le site catalytique de l'enzyme, tandis que le second, hydrophile, est présenté à la matrice (Papa et al. 2012; Fernández-Vizarra, Tiranti, et Zeviani 2009).

Le complexe I est également un site de production de ROS notamment d'ions superoxyde (O_2^-).

➤ **Complexe II : Succinate Déshydrogénase**

Il est constitué de plusieurs polypeptides formant un complexe lié à la membrane et impliqué à la fois dans la chaîne respiratoire mais aussi indispensable au cycle de Krebs.

Il représente une voie alternative d'entrée d'électrons dans la chaîne respiratoire, permettant la livraison de ces derniers du Succinate à l'ubiquinone via le FADH₂ issu majoritairement de la bêta-oxydation des acides-gras.

Le complexe II se compose de quatre sous-unités (A à D) ; les sous-unités A et B forment la partie hydrophile et catalytique tandis que les sous-unités C et D, hydrophobes, permettent l'intégration à la membrane.

La flavination de la sous-unité A est un processus indispensable à la formation et à la fonction du complexe II (Hao et al. 2009), et est liée à l'expression du gène de la *succinate dehydrogenase complex assembly factor 2* (*Sdhaf2*) codant pour une protéine mitochondriale.

Les protéines SDHAF 1 à 4 ont un rôle essentiel dans l'assemblage du complexe II en participant à la biosynthèse mitochondriale des centres fer-souffre du complexe (Na et al. 2014; Van Vranken et al. 2014; Baysal 2013).

➤ **Complexe III : Ubiquinol-cytochrome c oxydoréductase**

Il catalyse le transfert des électrons de l'ubiquinol au cytochrome c, un transporteur d'électrons mobiles dans la membrane mitochondriale.

Comme pour le complexe I, pour chaque paire d'électrons, ce transfert est couplé à une translocation de quatre protons depuis la matrice vers l'espace intermembranaire.

Chez l'Homme, ce complexe est un homodimère, dont chaque monomère est constitué de onze sous-unités ; trois de ces dernières contiennent des groupements oxydo-réducteurs, acteurs du transfert d'électrons :

- Le cytochrome b1 avec deux groupements hème différents,
- Le cytochrome c1,
- La protéine fer-soufre Rieske.

➤ **Complexe IV : Cytochrome c oxydase**

La dernière étape du transport d'électrons dans la mitochondrie est le transfert successif d'électrons du cytochrome c réduit à un oxygène moléculaire, qui sera par la suite réduit en H₂O.

Le complexe IV est un assemblage de treize sous-unités polypeptidiques désigné comme la cytochrome oxydase.

Les trois sous-unités les plus grosses sont codées par l'ADN mitochondrial (ADNmt) des cytochromes c oxydases (COX) I à III, et contiennent les hèmes a et a₃ ainsi que les centres cuivre CuA et CuB.

Les dix sous-unités restantes (COX IV à XIII) sont codées par l'ADN nucléaire et contribuent à la régulation de l'activité catalytique ainsi qu'à l'assemblage et la stabilisation du complexe (Stiburek et al. 2006; Fernández-Vizarra, Tiranti, et Zeviani 2009; Papa et al. 2012).

➤ **Complexe V : ATP Synthase**

L'ATP synthase fonctionne comme une enzyme réversible capable, d'une part de synthétiser de l'ATP en utilisant la force protomotrice générée par le

pompage de protons de la chaîne respiratoire, et d'autre part de pomper des protons depuis la matrice en cas d'absence de gradient (comme la pompe H⁺ ATPase des lysosomes).

Chez l'Homme, il s'agit d'un complexe protéique constitué de multiples sous-unités (**Figure 10**), dont deux codées par l'ADNmt (ATP6 et ATP8), l'ensemble formant deux domaines fonctionnels (H. Wang et Oster 1998) :

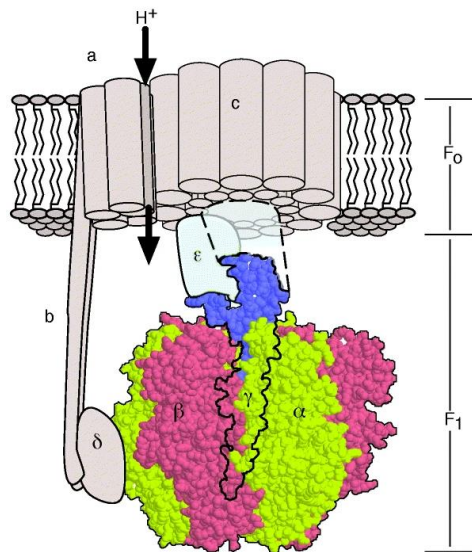


Figure 10 Transduction de l'énergie au niveau de la sous-unité motrice F1 de l'ATP synthase (H. Wang et Oster 1998)

L'ATP synthase est donc constituée de deux parties : l'une polaire enchâssée dans la membrane apolaire, F₀, l'autre globulaire, au contact de la matrice mitochondriale, F₁.

La sphère F₁ est la partie catalytique de l'enzyme, présentée à la matrice, tandis que la partie F₀ forme la fraction basale, enrobée dans la membrane interne.

Les portions F₁ des ATP synthases bactériennes et eucaryotes possèdent les mêmes structures à savoir cinq polypeptides différents avec une stœchiométrie α₃β₃δγ_ε, dont les unités α et β alternent au sein de la tête F₁.

Chez les eucaryotes, la portion F₀ est plus complexe que celle des bactéries et se compose de trois polypeptides différents avec une stœchiométrie ab₂c₁₂.

En présence du gradient de protons établi entre les deux faces de la membrane mitochondriale interne et en absence de concentrations élevées d'ATP dans la matrice, l'ATP synthase laisse passer les protons au niveau du domaine membranaire F₀ ce qui entraîne la production d'ATP par le domaine F₁ (douze H⁺ pour trois ATP).

C'est le potentiel de membrane et le passage des protons qui en résulte, qui permet l'expulsion de l'ATP vers l'espace matriciel au cours d'un mouvement de rotation de la sous-unité γ dans le domaine F₁.

La place de l'ATP est immédiatement prise par un nouvel ADP + Pi. (H. Wang et Oster 1998). Plus la chaîne de transfert des électrons fonctionne plus le potentiel de membrane mitochondriale est élevé (Shyh-Chang et Ng 2017).

Parmi toutes les protéines composant ces complexes, treize seulement (sur soixante-dix-sept) sont codées par l'ADN mitochondrial et les autres sont codées par le génome nucléaire ; ceci nécessite une coordination étroite de l'expression des sous unités de la chaîne respiratoire codées par le génome nucléaire et celles codées par le génome mitochondrial (Scarpulla 2008).

L'O₂PHOS (**Figure 11**) est la principale source endogène de ROS, sous-produits toxiques de la respiration :

- Anion superoxyde (O₂⁻),
- Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂),
- Radical hydroxyle (OH⁻).

En effet, lorsque la chaîne de transport d'électrons (ETC) est inhibée, les électrons s'accumulent dans les premiers stades de l'ETC : complexe I et coenzyme Q10 (CoQ), où ils peuvent être donnés directement à l'O₂ moléculaire pour donner O₂⁻.

L'anion superoxyde est détoxifié par la SOD manganèse (MnSOD) pour donner H₂O₂, et ce dernier est converti en H₂O par le *glutathion peroxydase* (GPx).

L'H₂O₂, en présence de métaux de transition sous formes réduites, peut également être converti en OH⁻ hautement réactif selon la réaction de Fenton (Wallace 1999).

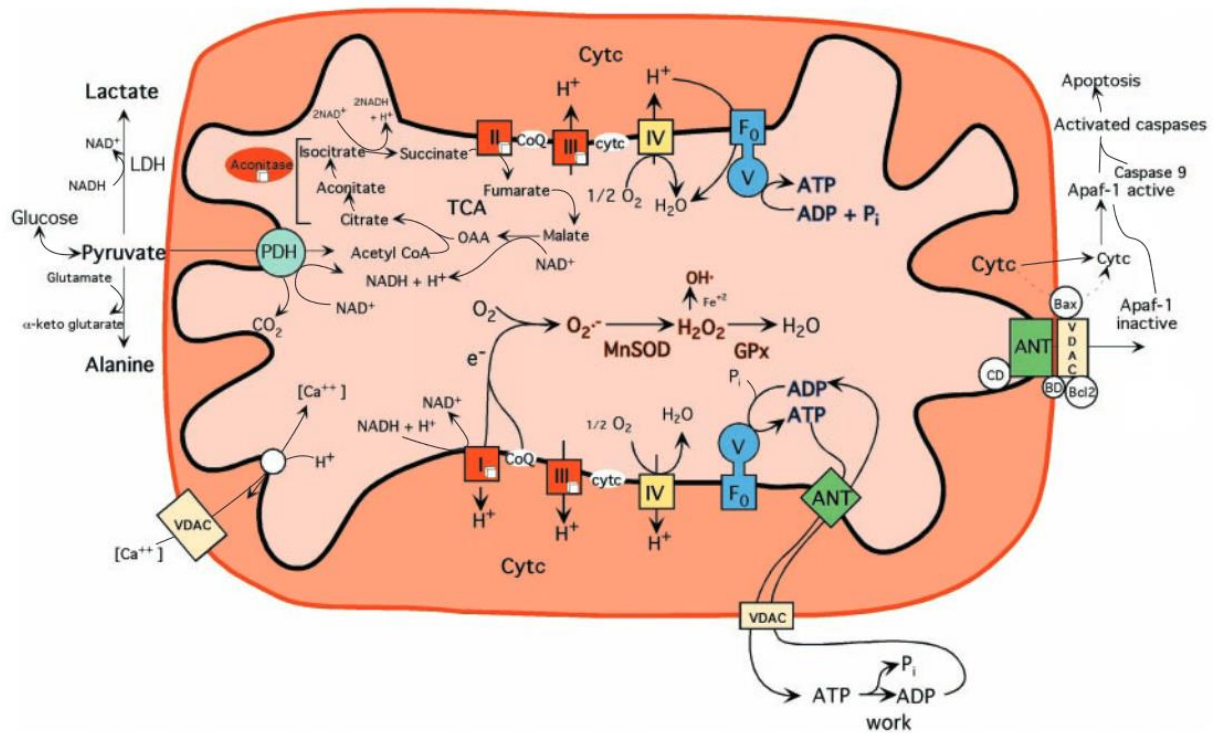


Figure 11 Schéma d'une mitochondrie et des divers interactions entre OXPHOS, la production d'ATP et la génération de ROS (Wallace 1999)

L'exposition chronique aux ROS peut entraîner des dommages oxydatifs aux protéines mitochondriales et cellulaires, aux lipides et aux acides nucléiques, et une exposition aiguë aux ROS peut inactiver les centres fer-soufre (Fe-S) des complexes I, II et III et de l'aconitase du cycle de l'acide tricarboxylique (TCA), entraînant en arrêt de la production d'énergie produite par la mitochondrie (Wallace 1999).

Les mitochondries constituent également un interrupteur majeur de l'initiation de l'apoptose à travers l'ouverture d'un canal membranaire interne mitochondrial non spécifique, le pore de transition de perméabilité mitochondriale (mtPTP).

En effet, un stress oxydatif accru et une diminution des niveaux d'énergie pourraient activer le mtPTP, conduisant à l'apoptose (Wallace 1999).

III.2. METABOLISME ENERGETIQUE

Dans le cœur sain, les substrats métaboliques sont principalement les acides gras (60%) mais aussi les lactates (18%) et le glucose (16%).

L'épicarde et le sous-épicarde ont été identifiés comme une niche hypoxique abritant une population progénitrice résistante à l'hypoxie, qui utilise préférentiellement le métabolisme glycolytique comme source énergétique.

Cette niche est très importante dans le maintien du caractère « souche » des MSC (Kyoko Ito et Ito 2016; Keisuke Ito et Suda 2014).

Les cMSC utilisent la dégradation du glucose *via* la glycolyse anaérobie cytosolique comme principale source de production d'énergie (Kyoko Ito et Ito 2016; Vannini et al. 2016).

Les cellules souches cardiaques hypoxiques c-kit+ et les CSH sont connues pour la réduction de leur nombre de mitochondries, de leur potentiel de membrane mitochondriale, du taux de consommation d'oxygène et des niveaux d'ATP intracellulaire (Bellio et al. 2016).

Cet état métabolique semble s'accompagner de changements dans l'expression de gènes métaboliques clés tels que la *glucose transportase 1 (Glut1)*, la *lactate dehydrogenase alpha (Ldha)* et la *pyruvate dehydrogenase kinase 1 (Pdk1)*, contribuant à l'augmentation de l'absorption du glucose et de la transformation du pyruvate en lactate.

Le caractère glycolytique des MSC est également démontré par la grande quantité de lactate qu'elles produisent en lien avec la nécessité de régénération de la forme oxydée du coenzyme nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) pour que la glycolyse se poursuive (Rehman 2010).

La glycolyse représente un des mécanismes majeurs de production d'ATP pour les MSC ; en absence d'oxygène, les MSC peu différenciées dégradent le glucose par voie anaérobie jusqu'au stade pyruvate (Foretz et al. 2006).

Dans une moindre mesure, les MSC peuvent dégrader le glucose selon une voie aérobie OXPHOS avec production par le cycle de Krebs mitochondrial d'équivalents réduits tels que le NADH, H⁺ et le flavine adénine dinucléotide (FADH₂), qui seront consommés par la chaîne respiratoire ; les substrats sont ainsi oxydés par les complexes I et II de la chaîne respiratoire.

Le métabolisme mitochondrial est initié par l'oxydation du pyruvate, produit de la glycolyse.

Le pyruvate pénètre alors dans les mitochondries via un transporteur de pyruvate où il est ensuite utilisé par le cycle de Krebs dans une série de réactions qui génèrent du NADH, H⁺ et du FADH₂.

Cependant, le pyruvate n'est pas la seule molécule capable d'alimenter le métabolisme mitochondrial, les acides gras et différents acides aminés peuvent alimenter le cycle de Krebs à travers la génération d'acétyl-CoA ou d'autres intermédiaires du cycle de Krebs.

Par exemple, l'oxydation des acides gras peut générer de l'acétyl-CoA, tandis que la glutamine peut être convertie en glutamate puis en α-cétoglutarate (Khacho et Slack 2017).

Néanmoins, le cycle de Krebs génère suffisamment de NADH, H⁺ et de FADH₂ pouvant produire des électrons utilisés par la chaîne de transport des électrons (ETC). Les électrons (e⁻) donnés par le NADH, H⁺ et le FADH₂ cheminent le long des complexes I, II, III et IV de la chaîne respiratoire jusqu'à l'accepteur final qui est le dioxygène (O₂), engendrant un potentiel oxydatif électrochimique progressivement croissant.

La direction du flux d'électrons est déterminée par la faculté des différents complexes à capter ou à perdre des électrons, selon leur potentiel redox. Ainsi chaque complexe a une affinité plus importante pour les électrons que son prédécesseur, jusqu'à l'O₂, un très bon agent oxydant capable de capter avidement les électrons des autres molécules (**Figure 12**) :

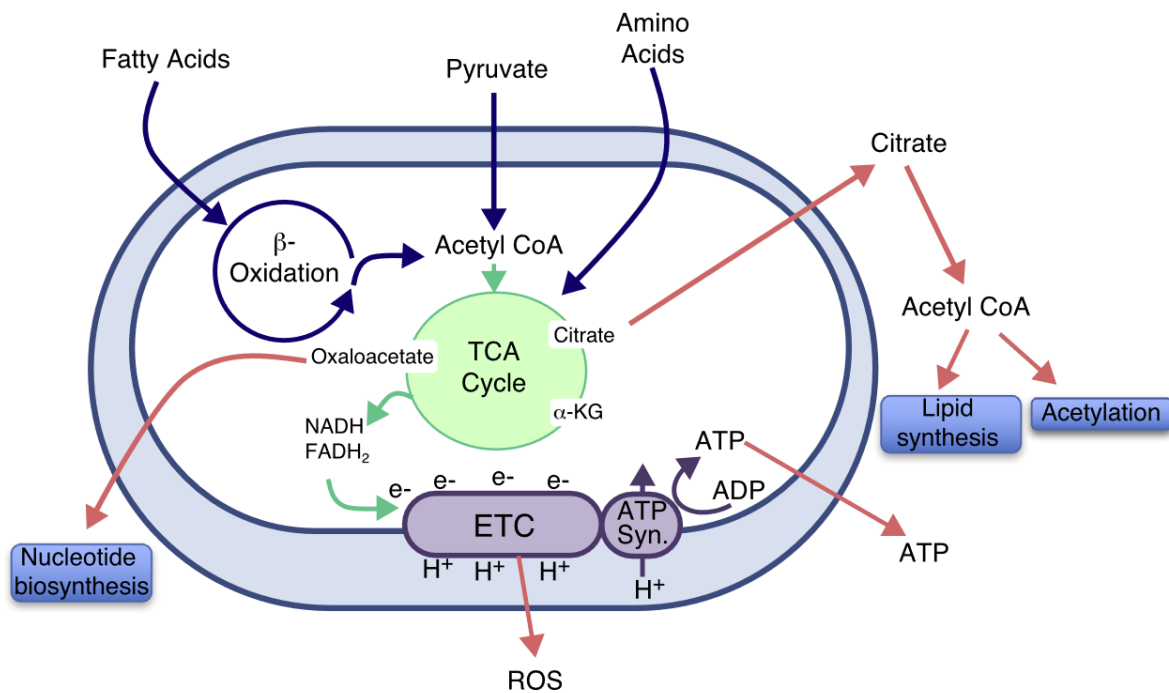


Figure 12 Représentation du métabolisme mitochondrial (Khacho et Slack 2017)

Au cours de ces transferts, de l'énergie va être libérée et permettre la translocation des protons (H⁺) depuis la matrice mitochondriale (MM) vers l'espace intermembranaire (EIM) au travers des complexes I, III et IV.

Ce processus crée un gradient protonique de part et d'autre de la membrane, et également un potentiel de membrane de par la différence de potentiel (négatif pour matrice et positif dans l'espace intermembranaire).

Ce gradient électrochimique ainsi généré est utilisé pour la phosphorylation d'adénosine diphosphate (ADP) en ATP par l'ATP synthase ou complexe V (Nath 2017).

La membrane interne mitochondriale contient également des protéines découplantes (UCP) qui permettent de dissiper le flux de protons de l'EIM vers la MM sans production d'ATP mais production de chaleur ; c'est un système de régulation de la production d'ATP selon les besoins de la cellule.

Le flux d'électrons, en présence d'oxygène produit des ROS au niveau des complexes I et III, d'où la présence, au niveau de la cellule, de systèmes de contrôle de cette production au niveau mitochondrial *via* la superoxyde dismutase 2 (SOD2) ou cytoplasmique *via* SOD1 et la catalase (Figure 13) :

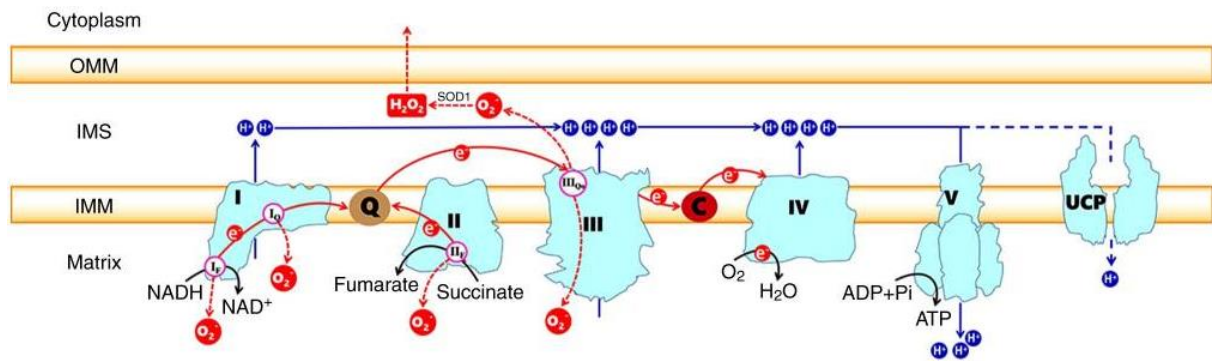


Figure 13 Génération du flux d'électrons et de protons au niveau de l'ETC (R.-Z. Zhao et al. 2019)

Tout dérèglement de la qualité de la fonction mitochondriale peut induire un stress oxydatif.

Dans les MSC, il a été mis en évidence (Rehman 2010) une augmentation des enzymes antioxydantes telles que les SOD 1 et 2 ainsi que la catalase au cours de la différenciation, afin de palier à la formation des ROS et au stress oxydatif qui serait induit par la respiration cellulaire.

Cette même étude a démontré une augmentation importante de l'expression d'un régulateur clé de la biogenèse mitochondriale, PGC-1 α , ainsi qu'une augmentation de la masse mitochondriale et de la consommation d'oxygène, lors de la différenciation.

Par ailleurs, la voie des *phosphatidylinositol-3-kinase–AKT-mammalian target of rapamycin* (PI3K-AKT-mTOR) favorise la production de ROS en réprimant le facteur de transcription *forkhead box transcription factors subgroup O* (FOXO).

De plus, le complexe *liver kinase B1* (LKB1) / *adenosine mono-phosphate-activated protein kinase* (AMPK) régule la fonction des cellules stromales.

La synthèse de la voie des acides-gras, effectue la condensation d'Acétyl-CoA et de malonyl-CoA pour produire le palmitate d'acide gras saturé et d'autres acides gras à longue chaîne (Figure 14) (Kyoko Ito et Ito 2016) :

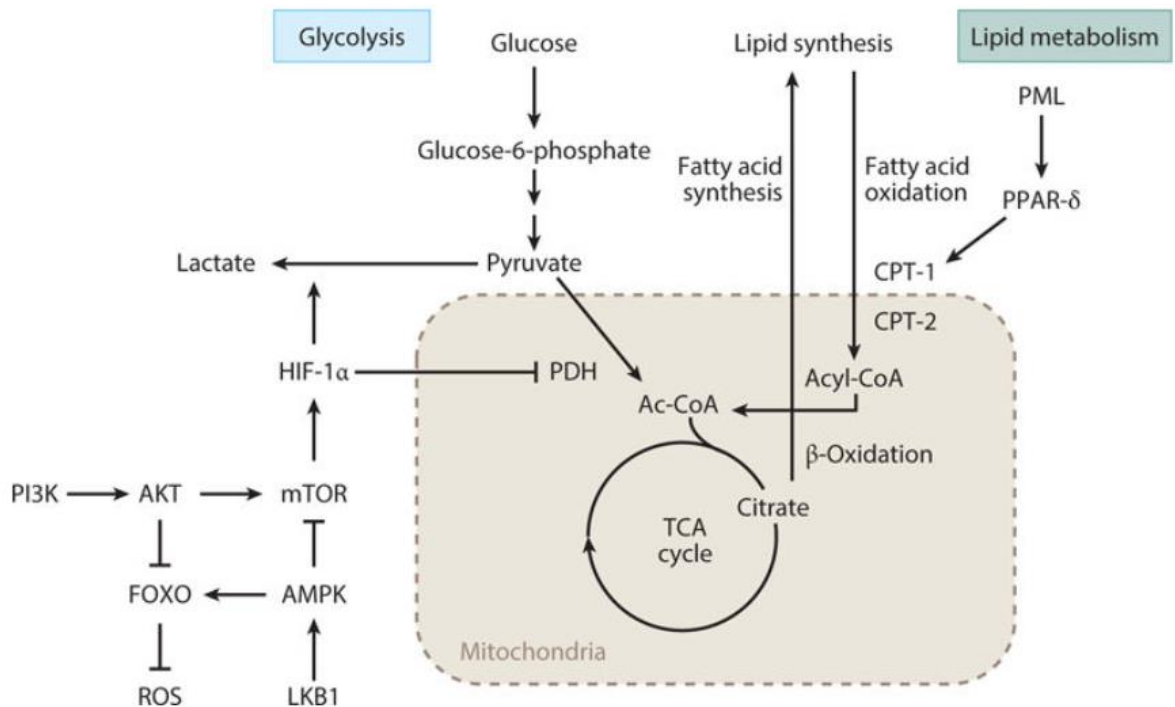


Figure 14 Métabolisme des cellules souches (Kyoko Ito et Ito 2016)

En dehors des niches hypoxiques, les cMSC perdent leur capacité d'auto-renouvellement et « commutent » vers un métabolisme oxydatif ; les niveaux d'oxygène commencent à s'élever, augmentant les niveaux d'OXPHOS et de ROS, qui stimulent la différenciation cellulaire.

Pendant la prolifération, les cellules stromales dépendent principalement de la glycolyse tout en maintenant de faibles niveaux d'OXPHOS pour alimenter les cellules avec des intermédiaires biosynthétiques importants pour la croissance cellulaire.

La différenciation des cellules stromales en cardiomyocytes est soumise à un changement métabolique de la glycolyse vers l'OXPHOS d'une manière dépendante des ROS (Rigaud et al. 2020).

Cela leur permet de consommer le glucose jusqu'au stade CO₂ et H₂O et de produire beaucoup plus de molécules d'ATP à partir d'une mole de glucose, soit trente-six contre deux ATP pour la glycolyse anaérobie, ceci afin de répondre à la demande énergétique élevée des fonctions associées à la différenciation (Kubli et Sussman 2017).

Le métabolisme oxydatif nécessite un apport en acides gras et en pyruvate produit par la glycolyse cytosolique ; ces éléments sont transportés spécifiquement au travers des membranes mitochondriales vers la matrice où leur dégradation libère de l'acétyl-CoA.

Ce dernier est ensuite pris en charge par le cycle de l'acide citrique afin de générer des équivalents réduits sous forme de coenzymes NADH, H⁺, FADH₂ et ubiquinone permettant à la chaîne respiratoire de générer la force protonique nécessaire à la synthèse d'ATP.

III.3. BIOGENESE MITOCHONDRIALE

La biogénèse mitochondriale, définie comme la croissance et la division de mitochondries déjà existantes, est influencée par des facteurs environnementaux, tels que l'effort physique, le jeûne, les basses températures, le stress oxydatif et la division cellulaire (Jornayvaz et Shulman 2010).

Cette biogénèse implique plusieurs processus tels que :

- La formation de la double membrane,
- L'importation de protéines mitochondriales codées par le génome nucléaire,
- La synthèse d'une minorité de protéines (treize), mais néanmoins essentielles, codées par l'ADNmt et la réplication du génome mitochondrial (Shutt et al. 2010).

La biogénèse mitochondriale nécessite donc une expression coordonnée des deux génomes, régulée par des facteurs de transcription nucléaires agissant de manière très hiérarchisée.

Le premier niveau de régulation de la biogénèse mitochondriale est assuré par des facteurs de transcription nucléaires qui gouvernent l'expression coordonnée des gènes impliqués dans la biogénèse mitochondriale dont :

- *Nrf-1* et *2*,
- L'*estrogen-related receptor alpha (Errα)*,
- Le *cAMP response - elements binding protein (Creb)*,

- Les *peroxysomes proliferator-activated receptors gamma et teta* (*Ppar γ* et *Pparδ*),
- *Yin Yang 1* (*Yy1*),
- *c-Myc*,
- La *specificity protein 1* (*Sp1*).

Les niveaux d'expression et d'activité de ces corégulateurs sont des déterminants majeurs de la biogenèse mitochondriale.

Plusieurs boucles d'autorégulation ou de rétrocontrôle contrôlent l'activité de ce réseau (Figure 15) (Hock et Kralli 2009) :

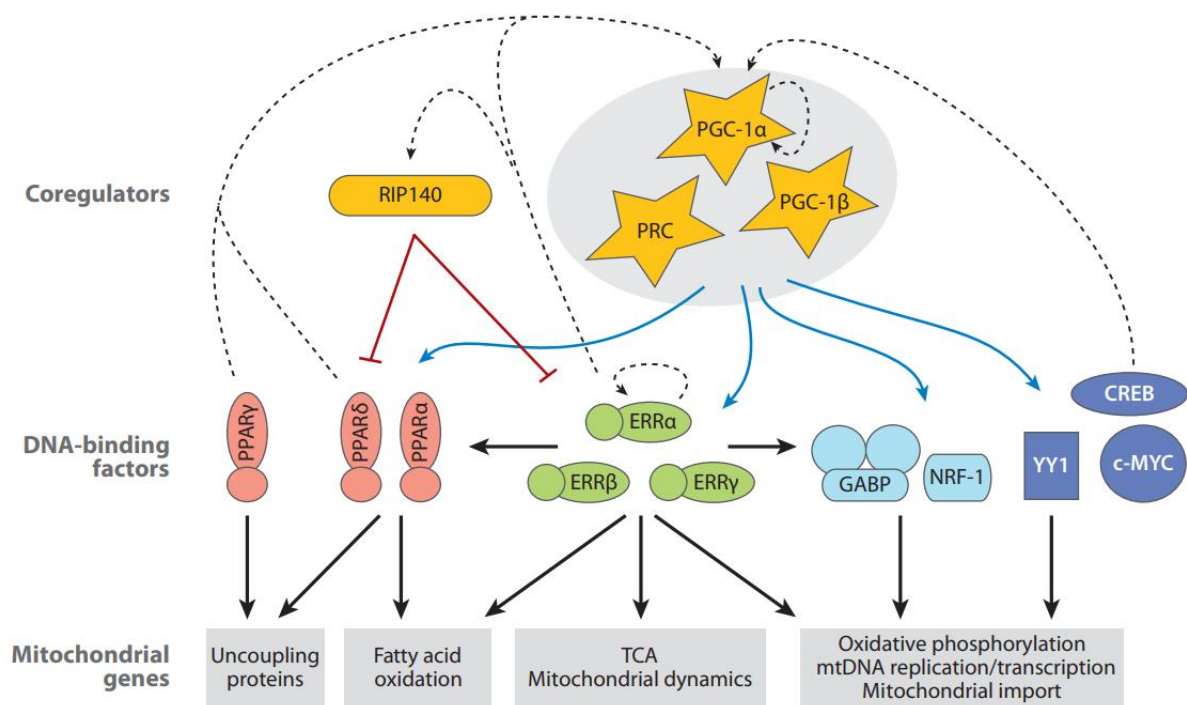


Figure 15 Réseau transcriptionnel influençant le métabolisme mitochondrial (Hock et Kralli 2009)

III.3.1. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION NUCLEAIRES

➤ NRF

En plus d'être au centre de la régulation de la chaîne respiratoire (Scarpulla 2002), *Nrf-1* participe à la coordination de l'expression des génomes mitochondriaux et nucléaires au travers de l'expression de régulateurs de la

transcription mitochondriale, les *mitochondrial transcription factors A, B1 et B2* (TFAM, TF1BM, TF2BM), de celui de l'ARN polymérase mitochondriale (POLRMT) (Gleyzer, Vercauteren, et Scarpulla 2005), mais aussi celle des transporteurs mitochondriaux ou bien encore celle des protéines ribosomales mitochondriales (Scarpulla 2008).

NRF-1 active la transcription du gène TOMM20, sous-unité clé du récepteur *translocase of the outer mitochondrial membrane* (TOMM), complexe récepteur multi-sous-unités de la membrane externe, impliquée dans l'interaction initiale avec les protéines précurseurs et nécessaire à l'importation de milliers de protéines qui contribuent à diverses fonctions mitochondriales.

NRF-1 et son coactivateur PGC-1 sont régulés positivement lors de la réponse adaptative du muscle squelettique à l'entraînement physique (Scarpulla 2008).

NRF-2 a également été identifié (Virbasius, Virbasius, et Scarpulla 1993) comme étant un activateur du promoteur de la sous-unité IV de la cytochrome oxydase ; ce dernier agit sous forme d'hétérodimère ou d'hétérotétramère, avec une sous-unité α assurant la liaison à l'ADN qui va s'associer à des sous-unités possédant un domaine d'activation de la transcription (β_1 , β_2 , γ_1 , γ_2).

Les séquences cibles de *Nrf-2* ont été identifiées sur les promoteurs de nombreux gènes mitochondriaux, incluant des composants de la chaîne respiratoire, des protéines d'importation mitochondriale et les facteurs de transcriptions mitochondriaux (Scarpulla 2008; Hock et Kralli 2009).

Les NRF contribuent donc à la fois directement et indirectement à l'expression de nombreux gènes nécessaires au maintien et au fonctionnement de l'appareil respiratoire mitochondrial (**Figure 16**) :

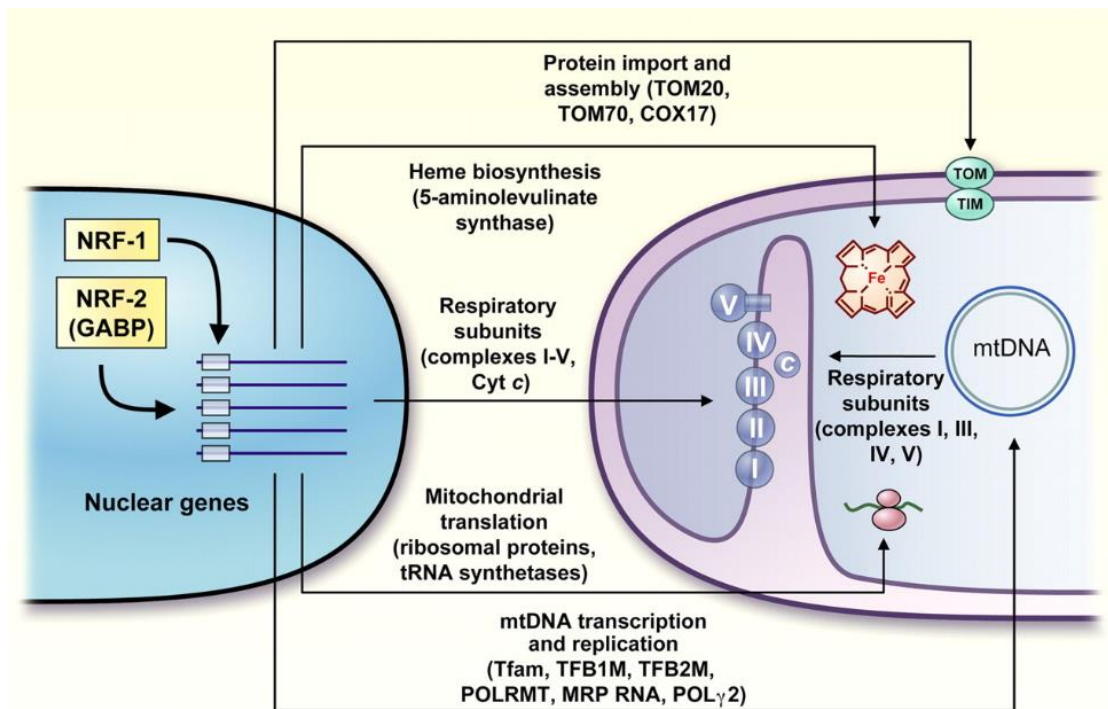


Figure 16 Contrôle des fonctions mitochondriales par NRF-1 et NRF-2 (Scarpulla 2008)

➤ **PPAR** (*Peroxisome proliferator-activated receptor*)

Les PPAR sont des récepteurs nucléaires impliqués dans le transport et le métabolisme des lipides ; PPAR α et PPAR δ régulent principalement l'oxydation lipidique, tandis que PPAR γ contrôle la synthèse et le stockage.

Ces trois récepteurs ont une distribution tissulaire et des fonctions physiologiques bien distinctes, PPAR α se retrouve fortement dans le foie, le cœur et le tissu brun, PPAR δ dans le muscle squelettique et le cœur et PPAR γ dans le tissu adipeux (Reilly et Lee 2008; Evans, Barish, et Wang 2004).

Ces récepteurs forment des hétérodimères avec le récepteur X des rétinoïdes (RXR) pour contrôler l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique et l'oxydation des acides gras.

Ils permettent l'adaptation des mitochondries aux besoins énergétiques et métaboliques (Hock et Kralli 2009) et sont directement intégrés à la régulation de la biogénèse et des fonctions mitochondriales via les coactivateurs de la famille PGC-1, avec lesquels ils interagissent physiquement pour induire leur activité transcriptionnelle (Vega, Huss, et Kelly 2000).

➤ **ERR**

Les récepteurs $ERR\alpha$, $ERR\beta$ et $ERR\gamma$ appartiennent à la super famille des récepteurs nucléaires orphelins.

Ces facteurs présentent des similarités avec les séquences des récepteurs aux œstrogènes, surtout au niveau des domaines de liaison à l'ADN.

Malgré cela, ils ne sont pas activés par les œstrogènes et leur activation se fait sans ligand spécifique (Kallen et al. 2004) mais plutôt au travers de coactivateurs de la famille du récepteur aux stéroïdes (SRC), de PGC-1 (Villena et Kralli 2008) ou des corépresseurs, comme la protéine RIP140 (Giguère 2008; Villena et Kralli 2008).

Associé aux coactivateurs de la famille PGC-1, $ERR\alpha$ devient un puissant facteur de transcription (Mirebeau-Prunier et al. 2010), mais associé à RIP140, il réprime la transcription (Villena et Kralli 2008).

Les ERR, sont aussi régulés par la phosphorylation et la sumoylation, ce qui affecte la liaison à l'ADN, la dimérisation et l'interaction avec les coactivateurs (Giguère 2008).

Les ERR se lient sous forme de monomères, d'homodimères ou d'hétérodimères en se liant à l'ADN au niveau des éléments de réponse aux ERR (ERRE), présents au niveau des promoteurs de nombreux gènes impliqués dans le système OXPHOS ou régulés par PGC-1 α , et souvent associés aux sites cibles de NRF-1 et NRF-2 (Mootha et al. 2004; Huss et al. 2004).

Parmi ces cibles, on retrouve des protéines impliquées dans la β -oxydation des acides gras, le cycle de l'acide citrique, la fonction OXPHOS et l'expression du génome mitochondriale (Giguère 2008).

➤ **CREB**

La protéine CREB régule l'expression du gène codant pour le cytochrome c.

L'augmentation du signal de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) est associée à des changements de la demande en énergie, et CREB contribue à la fonction mitochondriale en agissant :

- De façon directe sur l'expression de gènes cibles mitochondriaux,
- De façon indirecte en induisant l'expression de PGC-1 α (Herzig et al. 2001).

➤ **C-MYC**

De nombreuses d'études rapportent l'influence du facteur c-MYC comme un régulateur de l'expression des gènes mitochondriaux (Scarpulla 2008).

Ce facteur possède de nombreux sites cibles dans la région promotrice du gène codant pour NRF-1 induisant l'expression du cytochrome c et indirectement celle de gènes cibles de NRF-1.

Récemment, il a été montré que *Pprc1* et *c-Myc* étaient coexprimés en cas d'apoptose induite (Gleyzer et Scarpulla 2013), suggérant une potentielle régulation fonctionnelle entre ces deux facteurs dans la médiation de la réponse au stress cellulaire.

Enfin, *c-Myc* semble affecter la biogenèse mitochondriale via sa capacité à activer l'expression de PGC-1 β (H. Zhang et al. 2007).

➤ **YY1**

YY1 a été identifié comme régulateur de l'expression de gènes Cox de façon positive et négative (Scarpulla 2008).

Associé à PGC-1 α , YY1 augmente l'expression des gènes mitochondriaux et de la respiration cellulaire (Cunningham et al. 2007).

Cette interaction nécessite l'activité de mTOR, suggérant que ce facteur intègre les informations de deux voies de signalisation (Gerhart-Hines et al. 2007; Jäger et al. 2007) :

- PGC-1 α , qui relaie les signaux de l'état énergétique de la cellule,
- mTOR, qui favorise la croissance cellulaire.

➤ **SP1**

Ce facteur de transcription est impliqué dans le contrôle de la biogénèse mitochondriale et de la fonction OXPHOS (Kraft et al. 2006; Freyssenet et al. 2004).

III.3.2. LES COREGULATEURS TRANSCRIPTIONNELS

➤ **PGC-1 alpha et beta**

Les corégulateurs forment de gros complexes multiprotéiques, au travers desquels ils vont présenter les récepteurs nucléaires aux facteurs de transcription et ainsi moduler leur potentiel transcriptionnel.

Cette modulation se fait *via* les interactions requises pour induire ou réprimer l'expression d'un gène, celles-ci incluent des modifications allostériques des liaisons à l'ADN par les récepteurs nucléaires et les facteurs de transcription, des remodelages de la chromatine et l'initiation de la transcription (O'Malley et Kumar 2009).

Trois coactivateurs ont été identifiés dans cette famille : PGC-1 α , PGC-1 β et PPRC1.

PGC-1 α est le premier de cette famille de coactivateurs transcriptionnels, ses nombreuses similarités structurelles avec PGC-1 β ont été attribuées à un éventail de fonctions biologiques proches voire similaires.

Il ne possède pas d'activité propre de remodelage des histones, mais, par l'intermédiaire d'un puissant domaine d'activation en position N-terminale, il va interagir avec des cofacteurs liés au remodelage de la chromatine.

D'autres domaines fonctionnels ont été référencés (Scarpulla 2008), comme le motif LXXLL, adjacent au domaine d'activation reconnu par certains récepteurs nucléaires tels que PPAR α ou le récepteur β aux hormones thyroïdiennes, un domaine en position C-terminale riche en sérines et en arginines ainsi qu'un domaine de liaison à l'ARN qui permettrait l'épissage de l'ARN pré-messager (Monsalve et al. 2000).

PGC-1 α possède de nombreuses cibles d'interactions parmi lesquelles des facteurs de transcription et des récepteurs nucléaires aux hormones, certains étant directement impliqués dans la régulation de la fonction mitochondriale (NRF-1, ERR α , YY1 ou PPAR α).

L'expression de PGC-1 α peut être régulée par plusieurs voies de signalisation (Scarpulla 2011) parmi laquelle, la voie dépendante de l'AMPc, l'une des nombreuses voies qui dirigent l'induction de la PGC-1 dans un certain nombre de tissus.

PGC-1 α est donc un coactivateur capable d'intégrer les activités de nombreux facteurs de transcription responsable de la fonction oxydative et de la biogenèse mitochondriale (Figure 17) :

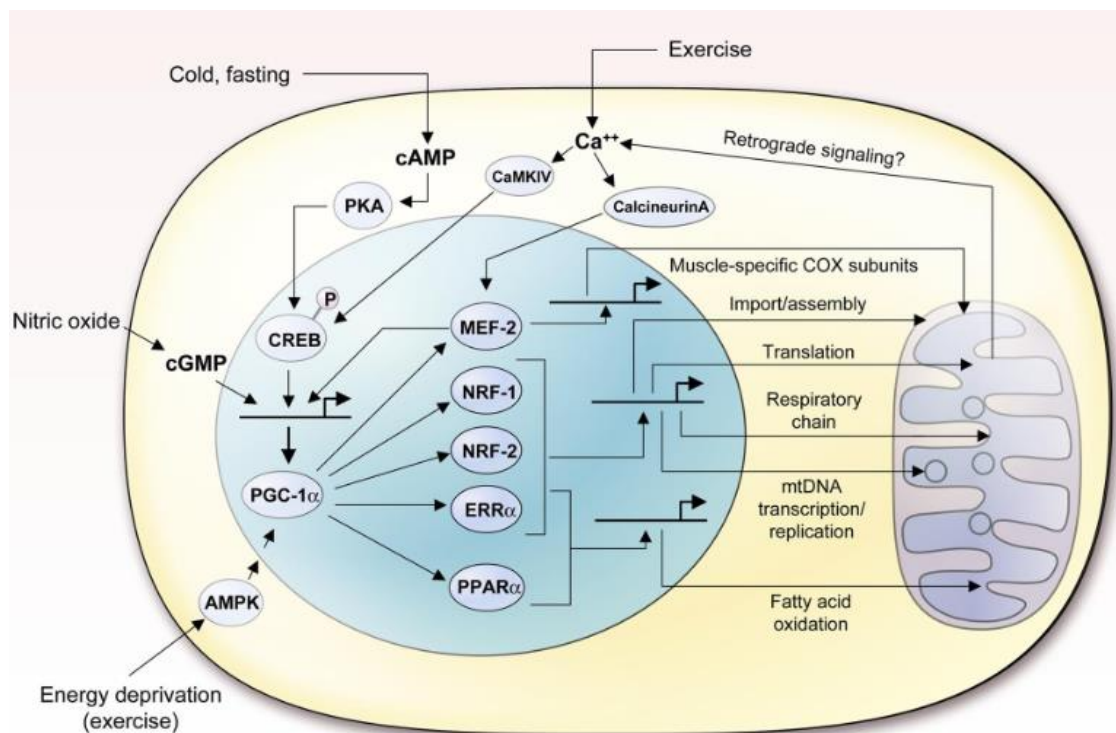


Figure 17 Voies médiées par PGC-1 α médiant la biogenèse et les fonctions mitochondriales

Par ailleurs, il a été montré que chez la souris transgénique (Lehman et al. 2000), une surexpression spécifique cardiaque entraînait une élévation importante du contenu mitochondrial des cardiomyocytes.

PGC-1 β est un homologue de PGC-1 α avec lequel il partage de nombreuses similarités de séquences (Kressler et al. 2002; Lin et al. 2002), comme le domaine d'activation N-terminal, le motif LXXLL et le domaine de reconnaissance de l'ARN C-terminal ; cependant, il est dénué du domaine riche en arginines et sérines associé à l'épissage de l'ARNm (Monsalve et al. 2000).

Ces deux coactivateurs sont enrichis dans les tissus présentant un nombre important de mitochondries tel le cœur, le muscle squelettique ou encore le tissu adipeux brun, même si dans ce dernier cas, la transcription de PGC-1 β n'est pas induite par l'exposition au froid (Kressler et al. 2002; Lin et al. 2002) ; PGC-1 β entraîne un meilleur couplage de la respiration que PGC-1 α , du fait d'une moindre fuite de protons (St-Pierre et al. 2003).

➤ **PRC** (*PGC-related coactivator*)

Un autre membre de la famille PGC-1 serait capable de répondre à des signaux alternatifs de régulation tout en étant d'expression ubiquitaire ; une étude des similarités avec PGC-1 α a mis en évidence le domaine riche en sérines et arginines en position C-terminale et le motif de reconnaissance à l'ARN (**Figure 18**) (Andersson et Scarpulla 2001) :

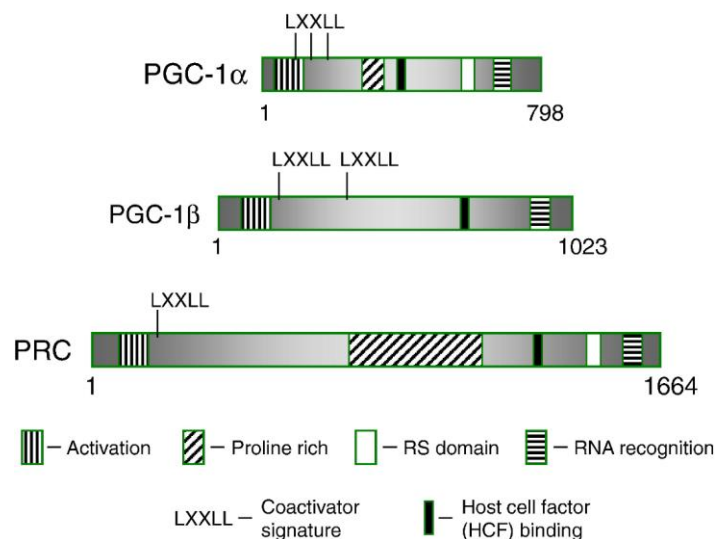


Figure 18 Arrangement des domaines conservés des coactivateurs PGC-1 α/β et PRC (Scarpulla 2011)

La protéine issue de l'expression de cet ADNc, PRC, présente des similitudes dans sa liaison à des facteurs de transcription nucléaire associés à la régulation des fonctions mitochondriales tels NRF-1, CREB et ERR α (Vercauteren,

Gleyzer, et Scarpulla 2008; Vercauteren et al. 2006) ; malgré ces similarités, PRC possède d'importantes différences ciblant des fonctions biologiques bien distinctes.

Ainsi, l'expression de l'ARNm de PGC-1 α est également induite dans le tissu adipeux brun après exposition au froid et liée à son rôle dans la thermogénèse, alors que celle de l'ARNm de PRC n'est que légèrement induite dans ces conditions (Andersson et Scarpulla 2001).

De ce fait, PRC, seul coactivateur ubiquitaire de la famille PGC1 régulant la croissance cellulaire et mitochondriale, permet d'intégrer l'expression des gènes de la chaîne respiratoire selon les phases du cycle cellulaire (**Figure 19**) (Savagner et al. 2003; Scarpulla 2011) :

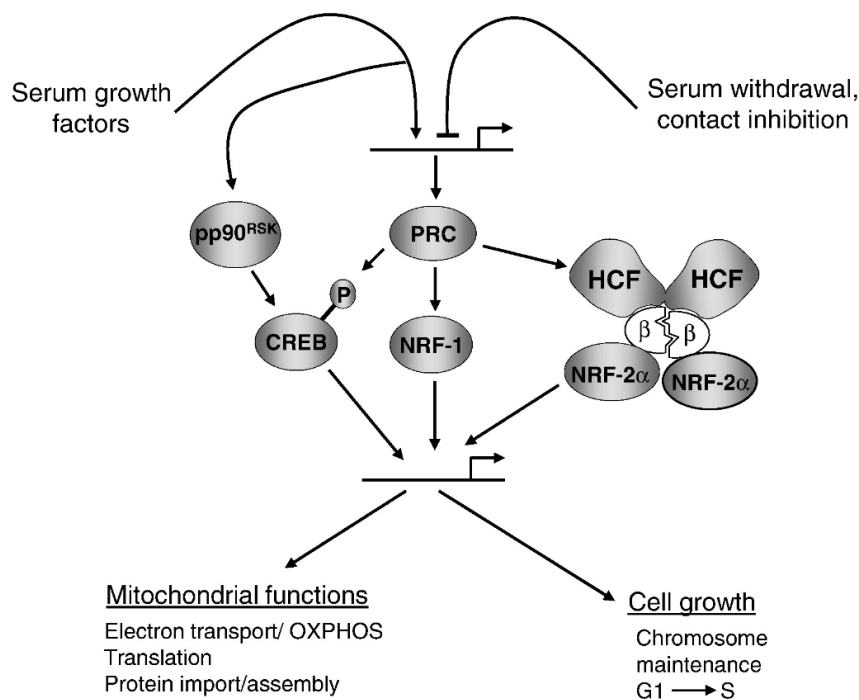


Figure 19 Modèle d'intégration des fonctions mitochondriales et de régulation de la croissance par PRC (Scarpulla 2011)

➤ RIP140

Le récepteur nucléaire corépresseur RIP140 fonctionne comme l'antithèse des coactivateurs PGC-1 et agit comme un frein transcriptionnel à la biogenèse mitochondriale.

Comme PGC-1 α/β , RIP140 interagit avec un large éventail de récepteurs nucléaires, y compris les ERR et PPAR, via une série de motifs LXXLL (White et al. 2008).

Cependant, l'amarrage de RIP140 aux récepteurs nucléaires recrute des corépresseurs supplémentaires, tels que la *C-terminal binding protein* (CtBP) et les histones désacétylases (HDAC), et conduit à la suppression de la transcription des gènes.

Les études *in vitro* et *in vivo* confirment le rôle de RIP140 dans la régulation de la fonction mitochondriale.

La mise sous silence de RIP140 dans les cellules 3T3L1, lignée de fibroblastes de souris sous-clonée à partir de cellules 3T3-Swiss Albino sur la base de leur capacité d'accumulation de lipides, conduit à une expression accrue de nombreux gènes impliqués dans le cycle de Krebs, l'O₂PHOS, l'oxydation des acides-gras et la biogenèse des organites (Powelka et al. 2006).

Comme PGC-1 α , RIP140 est régulé par modification des protéines. Sumoylation (Rytinki et Palvimo 2008) et acétylation (Ho et al. 2008) ont tous deux été proposés pour améliorer la capacité répressive de RIP140.

III.4. DYNAMIQUE MITOCHONDRIALE

Le processus de vieillissement implique une multitude de phénomènes biologiques complexes.

Une baisse du renouvellement mitochondrial causée par une biogenèse mitochondriale réduite et/ou une dégradation mitochondriale inefficace semble être un facteur particulièrement crucial (Terman et al. 2010).

Dans les cellules saines, la fusion mitochondriale fournit un réseau synchronisé pour la translocation des métabolites et le mélange intra-mitochondrial pendant la biogenèse, tandis que la division mitochondriale facilite la distribution égale des mitochondries dans les cellules filles pendant la mitose et permet la dégradation

sélective des mitochondries endommagées par autophagie (Hsiuchen Chen et Chan 2009).

Cependant, il est devenu de plus en plus clair que ces mécanismes de protection étaient nettement altérés dans le vieillissement et qu'une dynamique mitochondriale défectueuse pouvait être impliquée dans le processus de vieillissement (H. Y. Chung et al. 2009; J. H. Chung et al. 2008).

L'accumulation de mutations et de délétions associées au vieillissement au niveau de l'ADNmt semble altérer la fonction de la chaîne respiratoire et augmenter la production de ROS (Harman 1972; Chomyn et Attardi 2003).

L'augmentation de la production de ROS engendre une augmentation exponentielle des niveaux de dommages à l'ADNmt et de stress oxydatif dans la cellule (Hiona et Leeuwenburgh 2008; Kujoth, Leeuwenburgh, et Prolla 2006).

Les attaques oxydatives envers les mitochondries altèrent en retour les fonctions vitales de l'organite :

- Transduction d'énergie,
- Biogenèse des métabolites,
- Homéostasie du Ca^{2+} ,
- Régulation du processus redox.

Cela aboutit finalement à la mort cellulaire et au vieillissement (**Figure 20**) (Seo et al. 2010) :

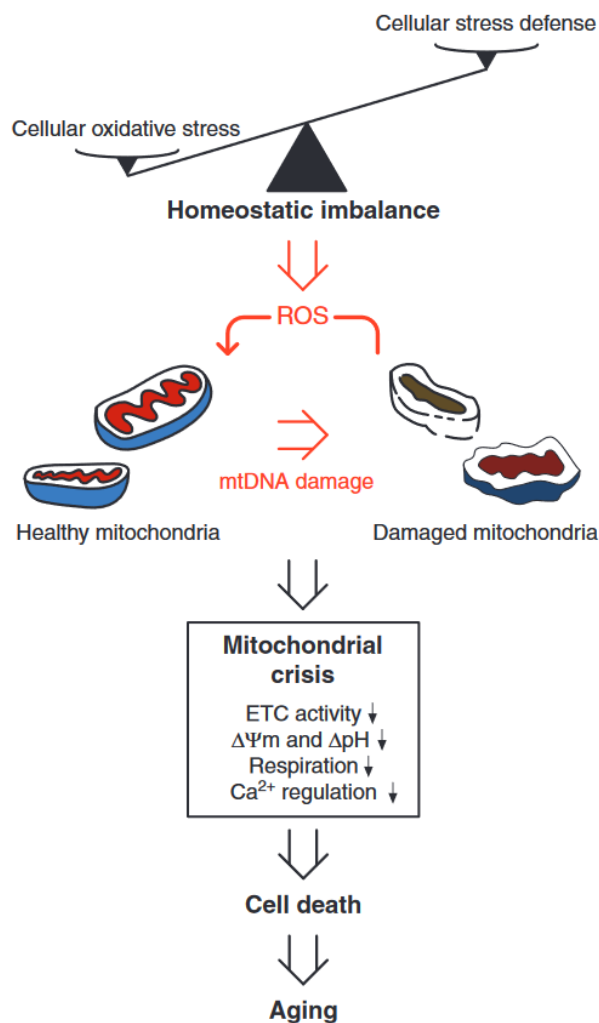


Figure 20 Dysfonctionnements mitochondriaux provoqués par le vieillissement (Seo et al. 2010)

La régulation dynamique de la fusion et de la fission mitochondriale s'est avérée être un mécanisme important de modulation du statut redox cellulaire, de l'intégrité de l'ADNmt, de la fonction organellaire et de la mort cellulaire (Liesa, Palacín, et Zorzano 2009).

Les mitochondries sont des organites complexes et dynamiques qui peuvent modifier leur organisation, leur forme et leur taille en fonction de signaux intracellulaires et extracellulaires (Rube et van der Bliëk 2004; Bereiter-Hahn et Vöth 1994).

Les mitochondries subissent un cycle continu de fusion et de fission, et l'équilibre entre ces événements opposés détermine la morphologie de l'organite (Hsiuchen Chen et Chan 2004).

Alors qu'une diminution de la fusion peut entraîner une fragmentation mitochondriale en raison d'une fission excessive, une diminution de la fission peut générer des mitochondries longues et hautement interconnectée (Sesaki et Jensen 1999).

Les protéines de fusion *mitofusin 1* et 2 (MFN1 et 2), orthologues mammifère des protéines de fusion de la levure *fuzzy onion 1* (FZO1P), contiennent quatre répétitions heptades, un domaine Guanosine tri-phosphatase (GTPase) et deux domaines transmembranaires.

La protéine *optic atrophy 1* (OPA1), orthologue mammifère de celle de la levure, une GTPase liée à la *dynamine* (MGM1P) est une autre protéine de fusion, située au niveau de la membrane interne mitochondriale (MIM) et de l'espace intermembranaire.

Le processus de fusion nécessite trois étapes :

- L'amarrage,
- La fusion de la membrane externe mitochondriale (MEM),
- La fusion de la MIM.

On pense que MFN1 et MFN2 jouent un rôle important dans l'amarrage et la fusion de la MEM.

OPA1 est quant à lui impliqué dans la formation des jonctions de crêtes ainsi que dans la fusion de la MIM, qui se produit de manière GTP-dépendante (Seo et al. 2010).

Les protéines MFN1 et MFN2 ont une similarité de séquence supérieure à 70% et partagent une grande partie de leur organisation fonctionnelle (H. Zhang et al. 2007).

Malgré certaines redondances dans leur fonction, les deux protéines possèdent des propriétés distinctes, suggérant qu'elles remplissent des rôles différents dans la fusion (de Brito et Scorrano 2008).

Les deux protéines sont largement exprimées mais MFN2 est très abondant dans le cœur et les muscles squelettiques et serait exprimée à de faibles niveaux dans de divers autres tissus humains (Bach et al. 2003).

La régulation de la fission mitochondriale chez l'Homme est contrôlée par deux protéines clés :

- La **protéine 1 liée à la dynamine** (DRP1), orthologue mammifère de celle de la levure, une GTPase liée à la dynamine (DNM1P),
- La **protéine de fission 1** (FIS1), orthologue mammifère de celle de la levure FIS1.

DRP1 contient un domaine GTPase N-terminal, un domaine effecteur GTPase (GED) C-terminal ainsi qu'une région hydrophile au milieu. Or elle s'auto-oligomérisse et assemble une machinerie de scission autour du MEM.

FIS1, est une protéine du MEM qui recrute DRP1 dans la MEM au moyen de protéines adaptatrices (Seo et al. 2010; Sauvanet et al. 2010).

Le rôle de FIS1 dans la fission mitochondriale est principalement d'agir comme une protéine d'ancrage pour DRP1 (Wasilewski et Scorrano 2009).

Chez l'Homme, la fission nécessite également plusieurs protéines accessoires, notamment :

- La protéine mitochondriale de 18kDa (MTP18) (Tondera et al. 2005),
- L'*endophilin B1* (BIF-1) (Karbowski, Jeong, et Youle 2004),
- La protéine 1 associée à la différenciation induite par les gangliosides (GDAP1) (Niemann et al. 2005),
- La *death associated protein 3* (DAP3) (Mukamel et Kimchi 2004).

Le renouvellement constant des mitochondries est crucial pour maintenir des mitochondries saines avec l'âge ; un renouvellement organellaire précis nécessite la coordination de deux processus cellulaires clés : la biogenèse mitochondriale et l'autophagie.

De façon intéressante, les tissus qui ont un métabolisme majoritairement aérobie, tels que les muscles squelettiques et le cœur, ont des réseaux mitochondriaux importants ainsi qu'une grande capacité de biogenèse mitochondriale (Hood 2001).

PGC-1 α et son produit cible ERR α , stimulent l'expression de *Mfn2* (Soriano et al. 2006).

La répression de *Mfn2* dans les cellules diminue la consommation d'oxygène, l'oxydation du glucose, le potentiel membranaire mitochondrial et l'expression des protéines OXPHOS (Hsiuchen Chen, Chomyn, et Chan 2005; Bach et al. 2003).

Ces adaptations mitochondriales semblent donc être pilotées par une voie de régulation impliquant PGC-1 α , ERR α et MFN2, et activées par plusieurs stimuli physiologiques, notamment l'exercice et la restriction calorique.

La dynamique mitochondriale est également importante pour le bon renouvellement des organites en ce sens qu'elle affecte les voies de dégradation mitochondriale.

Le lien entre les protéines de fission et le renouvellement mitochondrial est illustré dans les cellules neuronales, dans lesquelles *Fis1* s'est avéré activer l'autophagie et la dégradation sélective des mitochondries dépolarisées (Twig et al. 2008).

Il a également été décrit que l'autophagie des mitochondries se produisait après l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale et la dépolarisation de la membrane mitochondriale.

Ceci suggérant que l'autophagie joue un rôle protecteur en empêchant les dommages cellulaires causés par l'activation des voies pro-apoptotiques (I. Kim, Rodriguez-Enriquez, et Lemasters 2007; Elmore et al. 2001).

Cette idée est corroborée par les résultats d'une étude démontrant que l'autophagie est négativement corrélée aux dommages oxydatifs et à l'apoptose dans le muscle squelettique de rongeurs âgés (Wohlgemuth et al. 2010).

Les mitochondries étant des organelles qui jouent un rôle crucial dans la vie et la mort cellulaire, leur localisation doit être finement régulée et dirigée.

Le transport mitochondrial s'effectue majoritairement avec le support du réseau de microtubules surtout pour amener l'énergie aux extrémités de la cellule ; ce transport est orchestré essentiellement par deux protéines dites motrices que sont la dynéine et la kinésine qui polarisent cette dynamique (Schwarz 2013) **(Figure 21)** :

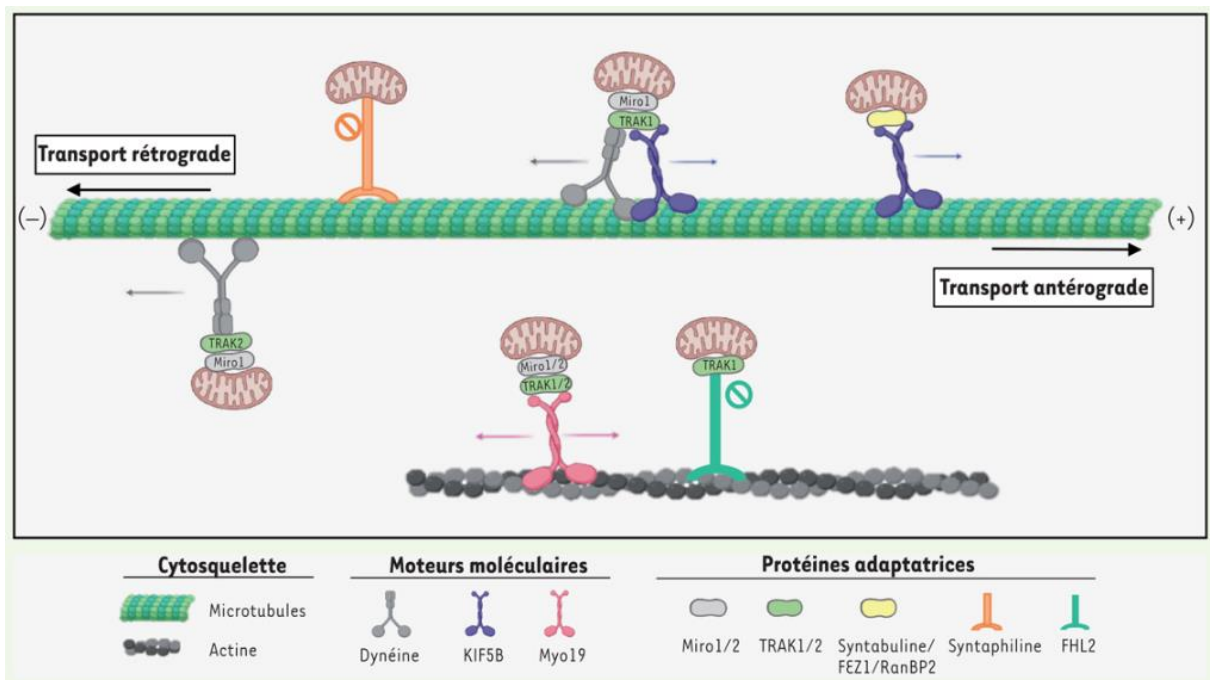


Figure 21 Mécanismes moléculaires impliqués dans le transport mitochondrial (Morin, Moindjie, et Nahmias 2022)

La polarisation en extrémité + et - (centrosome) des fibres de microtubules permet ce transport mitochondrial dirigé par la dynéine vers l'extrémité - (transport rétrograde) et par la kinésine vers l'extrémité + (transport antérograde) (Melkov et al. 2016).

Les kinésines de la famille kinésine-1 (KIF5), dont il existe trois isoformes (KIF5A, B, C), permettent notamment un transport antérograde des mitochondries le long des microtubules.

En condition d'hypoxie le transport rétrograde des mitochondries implique les protéines Miro1 et dynéine (Al-Mehdi et al. 2012) ; cette interaction est permise grâce à des protéines dites adaptatrices comme les protéines Miro et Milton (deux orthologues chez l'Homme, huMilt 1 et 2) qui sont le plus communément étudiées.

Les protéines Miro appartenant à une sous-famille des Ras- GTPase, situées sur la membrane externe mitochondriale contiennent deux sites de liaisons au Ca^{2+} afin de pouvoir se lier aux domaines moteurs des protéines motrices (Koutsopoulos et al. 2010), son rôle dans la ségrégation mitochondriale durant la mitose semble essentiel (Yong et Tang 2018).

Quant à la protéine Milton (encore appelée Trak), son rôle n'est pas totalement élucidé mais plusieurs études s'accordent à dire que cette protéine interagirait avec la protéine Miro pour assurer la liaison avec une protéine motrice (Melkov et al. 2016).

Le mouvement des mitochondries peut être intra mais aussi intercellulaire.

Les protéines impliquées dans ce transport mitochondrial sont capables d'induire la formation de nanotubes permettant le transfert de mitochondries d'une cellule saine vers une cellule lésée.

Un modèle de KO de Miro1 dans des cellules MSC a montré une diminution de leur efficacité thérapeutique par inhibition du transfert intercellulaire de mitochondries (Ahmad et al. 2014).

III.5. REGULATION ET SWITCH METABOLIQUE DES CELLULES STROMALES MESENCHYMATEUSES

Les cellules souches quiescentes ont comme principale source de production d'énergie la dégradation du glucose *via* la glycolyse anaérobie cytosolique.

Les cMSC favorisent cette voie métabolique du fait de cette organisation en niche hypoxique dans le stroma cardiaque (Vannini et al. 2016). Or ces niches permettent le maintien de l'état indifférencié des cMSC (Kyoko Ito et Ito 2016) *via* la stabilisation de l'activité transcriptionnelle des *hypoxia induced factors* (HIF).

Lorsqu'elles poursuivent leur différenciation ou leur prolifération, les cellules sortent des niches hypoxiques, perdent leur capacité d'autorenouveaulement et commutent leur métabolisme vers la phosphorylation oxydative.

Ainsi elles produisent beaucoup plus de molécules d'ATP à partir de glucose, cela pour répondre à la demande énergétique élevée des fonctions associées à la différenciation (Kubli et Sussman 2017).

Le switch métabolique observé s'effectue dès les premières étapes de la différenciation et sa cinétique joue un rôle majeur dans l'orientation des cellules vers différents phénotypes (**Figure 22**) (Kubli et Sussman 2017) :

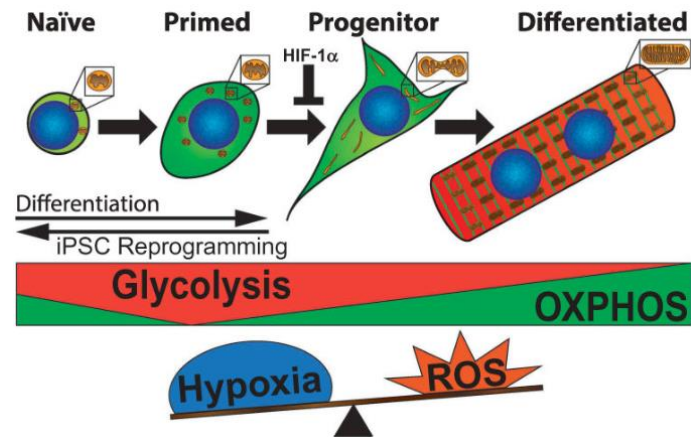


Figure 22 Métabolisme et différenciation (Kubli et Sussman 2017)

L'expression précoce des facteurs $ERR\alpha$ et $ERR\beta$, $PGC-1\alpha$ et $PGC-1\beta$ précède une explosion métabolique conduisant les cellules à un état hyper-énergétique qui est suivi d'une augmentation progressive de la glycolyse et d'une diminution de la fonction OXPHOS (Figure 23) (Rigaud et al. 2020) :

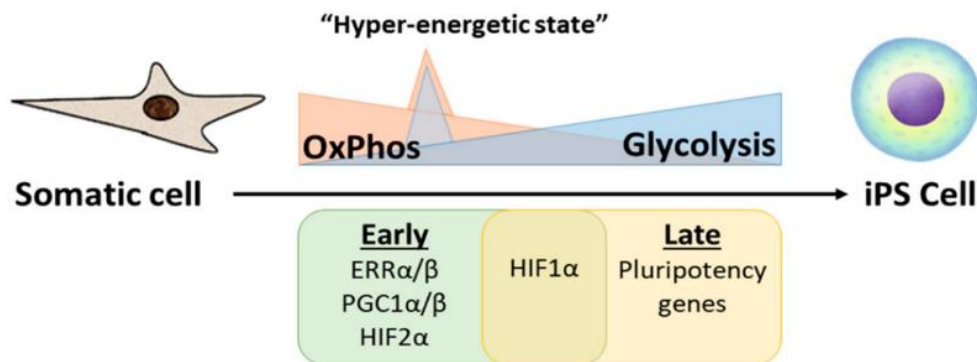


Figure 23 Reprogrammation des cellules liée au switch métabolique (Rigaud et al. 2020)

III.5.1. FACTEUR DE REGULATION HIF

Des études récentes présentent HIF-1 α comme un régulateur principal de la glycolyse et de la respiration mitochondriale (Kocabas et al. 2012; J. Kim et al. 2006).

Les HIF sont les facteurs centraux qui interviennent dans l'expression des gènes en aval en réponse au stress hypoxique (Figure 24) :

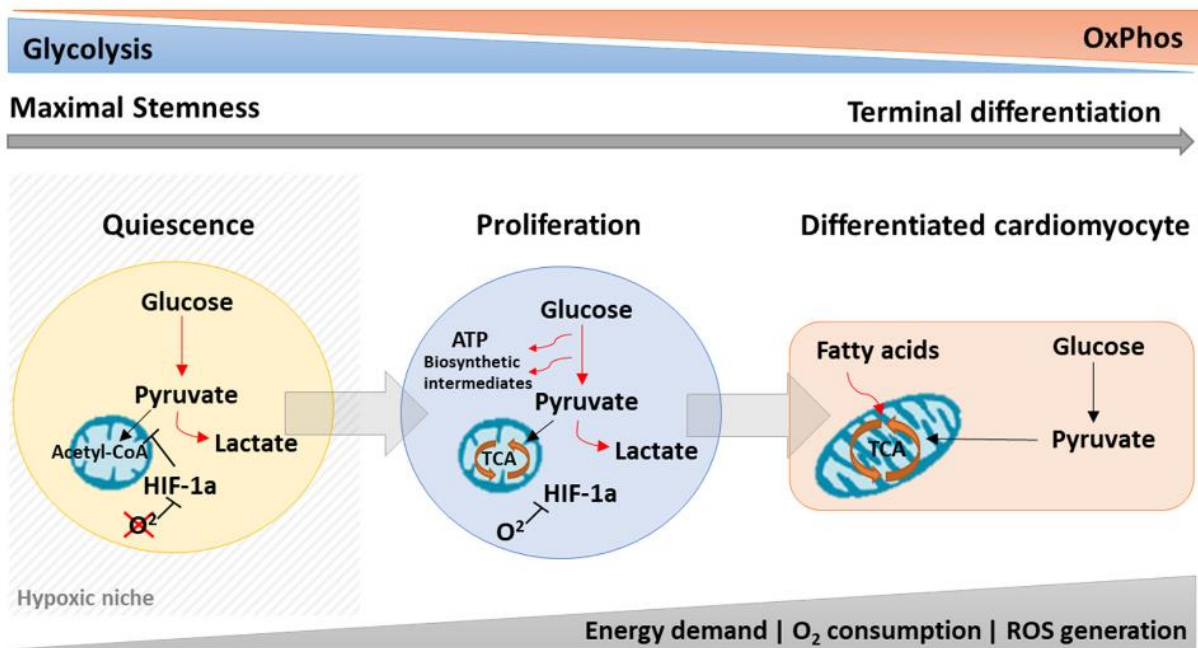


Figure 24 Modulation dynamique du métabolisme des cellules souches (Rigaud et al. 2020)

La famille HIF contient deux sous-unités différentes, alpha et beta ; la partie alpha est composée de HIF-1 α , HIF-2 α et HIF-3 α et la partie beta contient une protéine HIF-1 β .

Les complexes HIF-1 sont présents dans tous les tissus, tandis que HIF-2 est limité à certains types de cellules (J. Zhao et al. 2015) :

- Les cellules endothéliales,
- Les cellules gliales,
- Les pneumocytes de type II,
- Les cardiomyocytes,
- Les fibroblastes rénaux,
- Les cellules interstitielles,
- Les hépatocytes.

HIF-3 quant à lui est exprimé dans les cellules épithéliales des reins et des poumons (S.-L. Yang et al. 2015).

La protéine sous-unité alpha est régulée par les niveaux d'oxygène cellulaire, tandis que la sous-unité beta est exprimée de manière constitutive.

Dans des conditions de normoxie, les protéines HIF- α subissent une ubiquitination rapide et une dégradation ultérieure par le protéasome par hydroxylation des résidus -prolyle ; elles contiennent un domaine de dégradation dépendant de l'oxygène avec deux sites proline hydroxylés par la famille des prolines hydroxylases (PHD) dépendant de l'oxygène, notamment PHD1, PHD2 et PHD3.

Cette activité enzymatique d'oxydoréduction nécessite de l'oxygène, du fer, et du 2-oxo-glutarate (2-OG), soit un intermédiaire du cycle de Krebs ; après hydroxylation, HIF- α interagit avec la protéine suppresseur de tumeur de von Hippel – Lindau (pVHL) et favorise ensuite la dégradation de l'ubiquitine-protéasome de HIF- α .

A noter cependant que, sous conditions hypoxiques, l'activité enzymatique des PHD est inhibée, ce qui prévient l'hydroxylation et la dégradation du protéasome médiée par l'ubiquitine de HIF- α (Z. Luo et al. 2022; Taylor et Colgan 2017).

Par la suite, la sous-unité HIF- α interagit avec HIF-1 β pour former un complexe transcriptionnel, puis pénètre dans le noyau et se combine avec des éléments sensibles à l'hypoxie (HRE), induisant l'expression de nombreux gènes en aval (**Figure 25**) (Bao et al. 2021) :

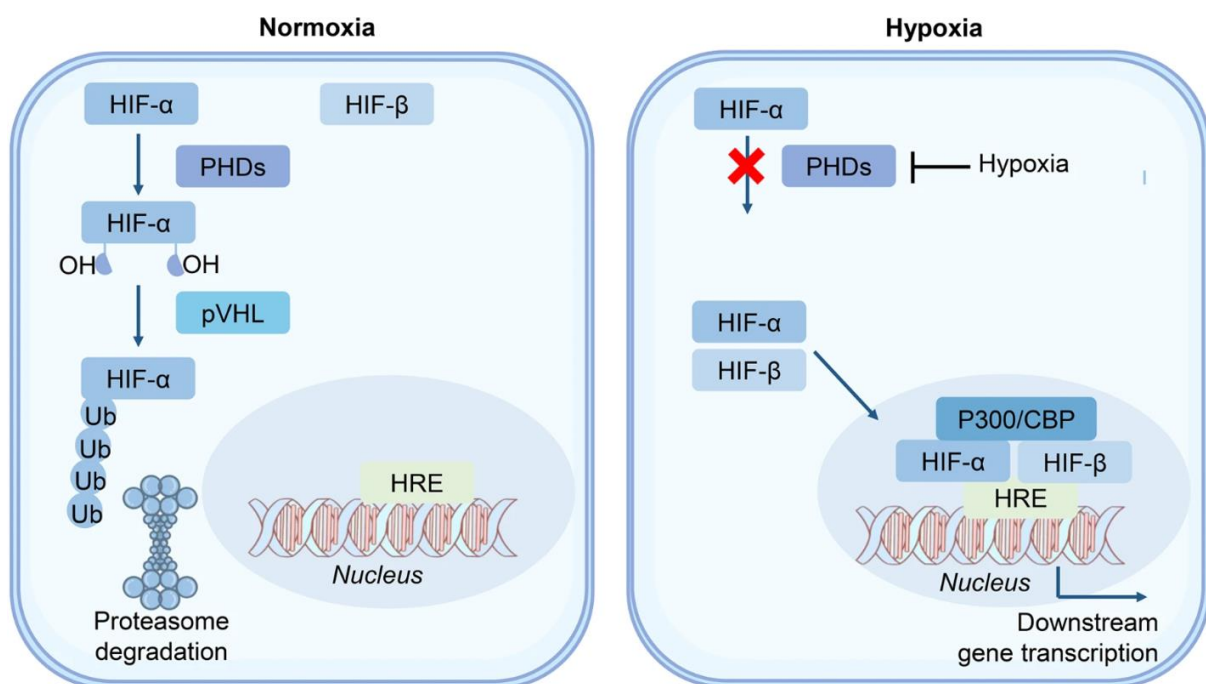


Figure 25 Mécanisme d'action de HIF sous normoxie et hypoxie (Z. Luo et al. 2022)

Quant à HIF-3 α , ce dernier exerce un rôle opposé dans l'induction de l'expression des gènes liés à l'hypoxie ; son expression abondante réduisant l'angiogenèse et freinant la prolifération cellulaire (Z. Luo et al. 2022).

HIF-1 α est donc le principal contrôleur de l'hypoxie physiologique et pathologique et est largement exprimé dans les maladies cardiovasculaires (Taylor et Colgan 2017; Tirpe et al. 2019).

Les différents niveaux d'expression de HIF-1 α dans le système cellulaire cardiovasculaire affectent de manière significative le fonctionnement de ces cellules et jouent un rôle dans des maladies telles que l'athérosclérose, l'hypertension pulmonaire, la cardiomyopathie, l'arythmie et les cardiopathies congénitales (Z. Luo et al. 2022)

Presque tous les gènes liés à l'hypoxie, y compris *Glut*, *Vegf*, les enzymes glycolytiques, les facteurs de survie cellulaire et les récepteurs de surface cellulaire, sont régulés directement ou indirectement par HIF-1 (Mylonis, Simos, et Paraskeva 2019).

Lors d'une réponse au stress oxydatif, les ROS favorisent l'expression de HIF-1 α pour activer la transcription de plusieurs gènes, comme l'endothéline-1 (ET-1) et une série de gènes pro-fibrotiques codant le collagène I, III, IV et la lysyl oxydase, conduisant à dont l'expression contribue aux maladies cardiovasculaires et à la fibrose (Belaidi et al. 2016; Halberg et al. 2009).

Il convient de noter que le recours à la glycolyse anaérobie et à la réduction de phosphorylation oxydative serait également, au moins en partie, nécessaire pour maintenir la quiescence en protégeant les cellules progénitrices cardiaques c-Kit⁺ et les CSH des ROS, un dénominateur connu du vieillissement et de la sénescence (Korski et al. 2019).

Par ailleurs, il a été montré qu'une explosion précoce d'OXPHOS augmentait les niveaux de ROS, conduisant à une activation de HIF1- α et favorisant par la suite un déplacement glycolytique et une redistribution du glucose à travers la voie des pentoses phosphates dans un processus, au moins en partie, contrôlé par *Kelch-like ECH-associated protein 1* (KEAP1) et NRF-2 (Hawkins et al. 2016).

III.5.2. AUTRES FACTEURS DE REGULATION

De nombreuses études ont montré que les cellules souches pluripotentes avaient des mécanismes actifs impliqués dans l'adaptation métabolique (**Figure 26**) :

- Des niveaux élevés de protéine de découplage UCP2 qui empêche l'oxydation du glucose au niveau des mitochondries (Jin Zhang et al. 2011).
- Le facteur inhibiteur de l'ATPase (IF1) qui réprime l'activité de l'ATP synthase (Sánchez-Aragó et al. 2013).
- La pyruvate déshydrogénase kinase (PDK) qui supprime la conversion du pyruvate en acétyl-CoA par la PDH (Takubo et al. 2013).
- Des niveaux élevés de lactate (induction de lactate deshydrogenase LDH) dans l'activation des cellules souches du follicule pileux (HFSC) (Flores et al. 2017).
- L'expression de la protéine mitochondriale *Mitochondrial carrier homologue 2* (MTCH2), qui inhibe le métabolisme mitochondrial, (Maryanovich et al. 2015).
- Une faible expression du transporteur mitochondrial du pyruvate (MPC) ou une inhibition pharmacologique de son activité pour le maintien l'expression de marqueurs de caractère « souche » (Khacho et Slack 2017; Schell et al. 2017).

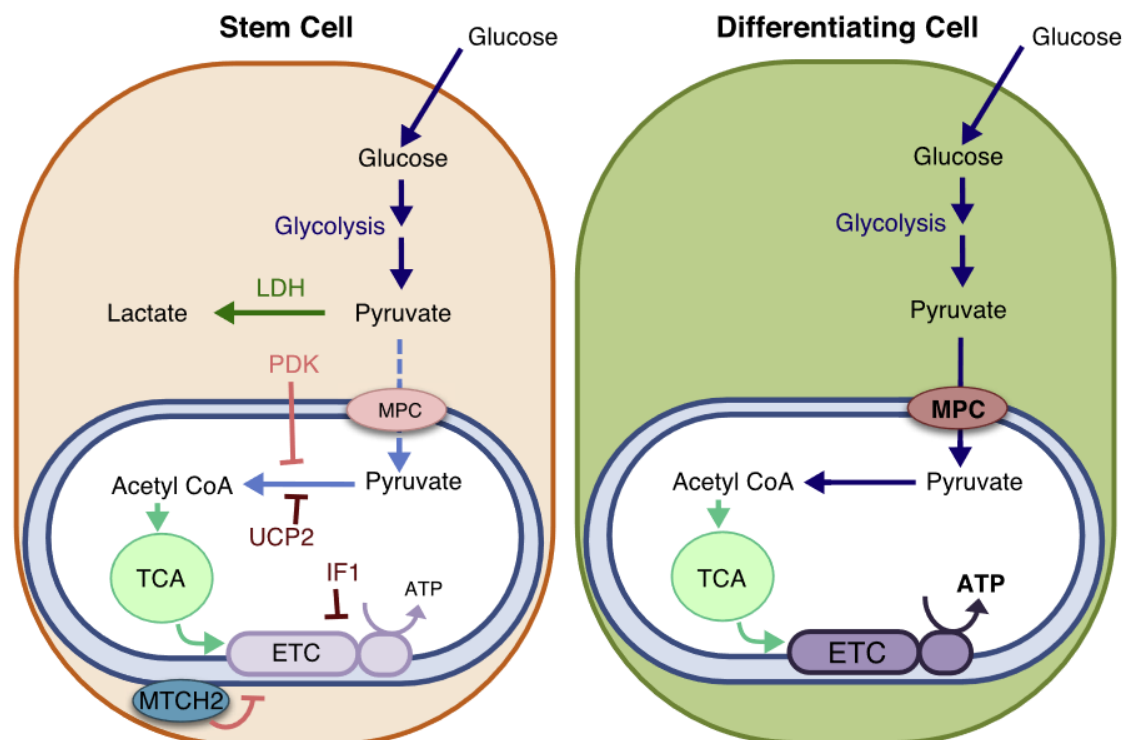


Figure 26 Mécanismes de suppression de l'activité mitochondriale et activation de l'OXPHOS lors de la différenciation (Khacho et Slack 2017)

Par ailleurs, ce changement métabolique peut être induit par certains facteurs clés de reprogrammation tels que c-MYC et la protéine de liaison à l'ARN Lin28 (LIN28), qui sont des régulateurs connus du métabolisme énergétique et pour lesquels il a été démontré qu'ils amélioraient la glycolyse et inhibaient le métabolisme oxydatif (Jin Zhang et al. 2016).

La fonction de c-MYC dans l'induction de la pluripotence peut être remplacée par la surexpression d'enzymes impliquées dans la glycolyse telles que LDHA et PKM2, ce qui suggère que l'un des rôles principaux des facteurs de reprogrammation est de favoriser la glycolyse (Y. Cao et al. 2015).

La biologie des mitochondries qui régule le métabolisme cellulaire joue également un rôle fondamental dans la reprogrammation.

Parallèlement à une réduction du métabolisme oxydatif, la masse mitochondriale diminue progressivement au cours de la reprogrammation (Hansson et al. 2012) avec des mitochondries qui reviennent à un phénotype plus proche de celui de cellule stromale, passant d'une forme tubulaire allongée avec des crêtes bien développées à une forme plus petite et sphérique avec des crêtes peu développées (Bobis-Wozowicz et al. 2015).

La distribution cellulaire des mitochondries passe d'un réseau complexe de mitochondries distribuées dans le cytoplasme à une localisation principalement périnucléaire.

Au cours du vieillissement, les cellules souches perdent de leur capacité régénérative (Kubli et Sussman 2017; Nakamura et al. 2016) , le nombre de MSC diminue et celles-ci perdent de leur capacités d'auto-renouvellement et de différenciation (Shyh-Chang et Ng 2017).

Le vieillissement induit un stress oxydant physiologique dans les cellules (Oh, Lee, et Wagers 2014; Z. Liu et al. 2017) et augmente certains marqueurs de senescence (Nakamura et al. 2016) ; il s'accompagne d'une diminution des capacités des voies de détoxification des ROS qui entraîne une augmentation des risques de dommages cellulaires (Denu et Hematti 2016).

Les MSC sont normalement plus sensibles aux ROS que les cellules différenciées. Or il a été démontré que les ROS régulaient la prolifération et la différenciation dans plusieurs modèles de cellules souches.

Une forte corrélation existe entre les niveaux de ROS et l'état métabolique des cellules, où de faibles niveaux de ROS sont trouvés dans les cellules souches alors que des niveaux plus élevés sont présents dans les cellules en différenciation.

En outre, la génération de ROS par les complexes I et III de la chaîne respiratoire, active un programme de transcription nucléaire impliqué dans la différenciation (Khacho et al. 2016).

Lors de la différenciation des cellules souches, les gènes impliqués dans un type cellulaire spécifique sont régulés positivement et les gènes associés à l'état indifférencié sont réprimés.

La détermination du destin cellulaire nécessite un état d'équilibre complexe entre contrôles génétiques et épigénétiques or les intermédiaires du cycle de Krebs sont impliqués dans la détermination du devenir des cellules souches.

Ainsi, l'alpha-cétoglutarate (α -CG) comme cofacteur d'enzymes clés du contrôle épigénétique est connu pour avoir la capacité d'induire la déméthylation de l'ADN et des histones ; de la même façon, l'acétyl-CoA peut favoriser l'acétylation des histones (Kaelin et McKnight 2013; Wellen et al. 2009).

Grâce à ces intermédiaires métaboliques, il est possible de réguler le devenir des cellules souches au niveau épigénétique.

Des études ont véritablement mis en évidence le rôle de différents métabolites dans la médiation des décisions relatives au devenir des cellules souches et à leur différenciation (**Figure 27**) (Khacho et Slack 2017; Khacho et al. 2016) :

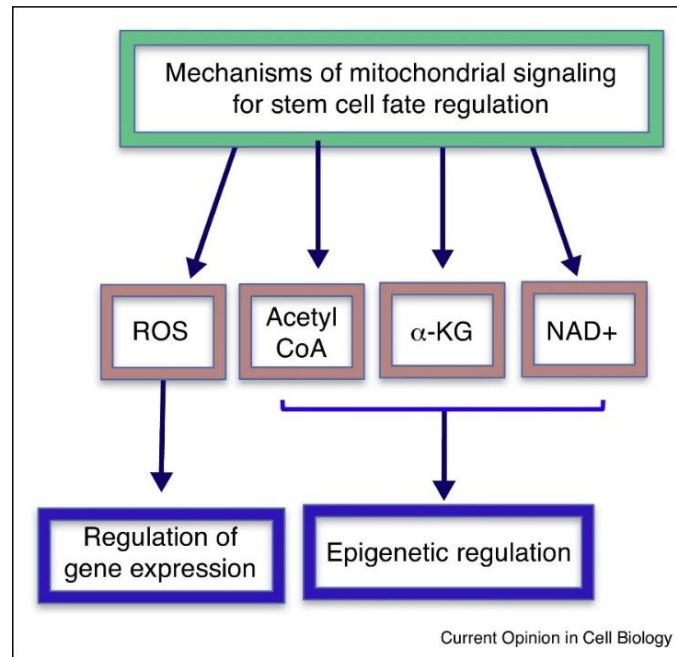


Figure 27 Signalisation mitochondriale et devenir des cellules souches via la modulation de l'expression des gènes et des phénomènes épigénétiques (Khacho et Slack 2017)

Ces études ont montré que le rapport NAD^+/NADH , H^+ était impliqué dans le switch métabolique des cellules souches.

Le niveau de NAD^+ pouvant ainsi affecter l'activité des enzymes désacétylases dépendantes du NAD^+ et en particulier la sirtuine 1 (SIRT1) (Imai et Guarente 2014).

La production d'ATP mitochondriale nécessite la présence du cofacteur essentiel le NAD^+ or dans les mitochondries, ce cofacteur est réduit en NADH par le cycle de Krebs, qui est ensuite utilisé par le complexe I de la chaîne de transport des électrons comme donneur d'électrons pour alimenter la phosphorylation oxydative.

Selon l'état métabolique des cellules, la glycolyse et la phosphorylation oxydative affecteront le rapport NAD^+/NADH , H^+ .

Plusieurs voies métaboliques, dont la biosynthèse *de novo* du NAD^+ à partir du tryptophane et l'augmentation de la voie de récupération du NAD^+ , influencent l'activité enzymatique de SIRT1 (Figure 28) (Rodgers et al. 2008) :

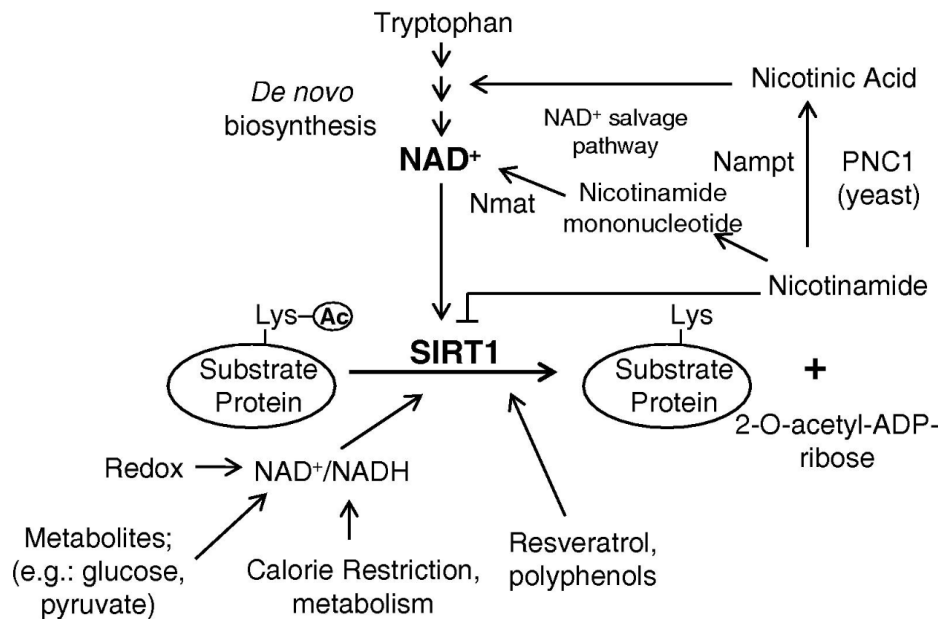


Figure 28 Régulation de l'activité enzymatique de SIRT1 (Rodgers et al. 2008)

Trois kinases ont été identifiées comme phosphorylant directement *Pgc-1α* :

- La *p38 mitogen-activated protein kinase* (p38MAP kinase), activée par le stress, phosphoryle PGC-1α au niveau de trois résidus : thréonine 262 (Thr262), sérine 265 (Ser265), Thr298, dans le domaine de répression 200-400 et est en corrélation avec une protéine plus active et stable (Puigserver et al. 2001).
- L'AMPK phosphoryle directement PGC-1α au niveau des résidus Thr177 et Ser538, ce qui engendre une protéine plus active (Jäger et al. 2007).
- Le complexe Serine/Thréonine kinase – Protéine Kinase B (Akt/PKB) phosphoryle PGC-1α au niveau de Ser570 dans le domaine SR mais cela conduit à une protéine plus instable avec une activité plus faible (Xinghai Li et al. 2007).

Les conditions de privation d'énergie perçue, telles que le jeûne, la restriction calorique (CR) et l'exercice, augmentent le rapport AMP/ATP et activent l'AMPK (Figure 29) (Haigis et Sinclair 2010) :

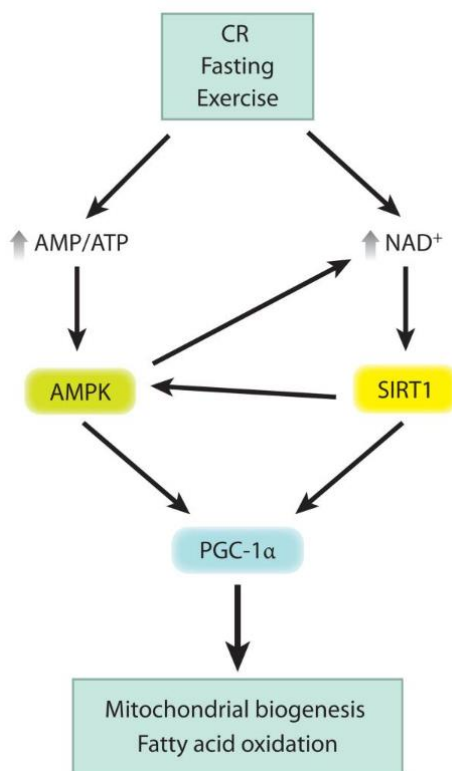


Figure 29 Axe de régulation SIRT1/AMPK (Haigis et Sinclair 2010)

La privation d'énergie augmente également les niveaux de NAD^+ et l'activité désacétylase dépendante du NAD^+ de SIRT1 ; AMPK activé et SIRT1 convergent en activant PGC-1 α via la phosphorylation et la désacétylation, pour induire respectivement la biogenèse mitochondriale et l'oxydation des acides gras.

La combinaison et l'équilibre des besoins métaboliques intrinsèques et des conditions métaboliques extrinsèques nécessaires à la quiescence, ainsi que l'inclinaison de l'équilibre nécessaire pour initier la prolifération, peuvent constituer un mécanisme de régulation de l'homéostasie des cellules souches adultes (Shyh-Chang et Ng 2017).

Le métabolisme énergétique apparaît comme plus qu'une simple conséquence, mais comme un moteur essentiel de la reprogrammation des cellules somatiques notamment en iPSC.

Au-delà de l'alimentation des cellules en ATP, le métabolisme énergétique est devenu un processus clé pour soutenir la fonction et l'engagement des cellules souches, jouant un rôle important à la fois dans l'acquisition et le maintien de la souche.

L'équilibre entre le métabolisme glycolytique et oxydatif implique une régulation de réseau complexe qui relie le noyau, le cytoplasme et les mitochondries et fournit un large arsenal de molécules qui peuvent être manipulées pour aider les cellules souches à survivre à l'environnement ischémique.

Ainsi, la reprogrammation du métabolisme des cellules souches représente une nouvelle frontière pour améliorer la thérapie par cellules souches pour la réparation cardiaque (Rigaud et al. 2020).

IV. REGULATION EPIGENETIQUE DES CELLULES STROMALES MESENCHYMATEUSES

La régulation épigénétique des gènes fait généralement référence à un processus héréditaire et durable par lequel l'expression des gènes est gérée au niveau de la chromatine sans altération de la séquence d'ADN.

L'épigénétique est considérée comme un pont entre le génotype et le phénotype et fournit un cadre pour réguler les caractéristiques biologiques clés telles que la différenciation cellulaire, le développement et la régénération tissulaire (Im et Shin 2015; Reik 2007).

Le paysage épigénétique reflète la structure dynamique de la chromatine qui est à la fois restreint mais autorise l'accès de l'appareil transcriptionnel aux gènes.

L'euchromatine est la forme de chromatine la moins condensée et la plus accessible associée à la transcription des gènes.

L'hétérochromatine est la chromatine « empaquetée » qui restreint physiquement l'accès des facteurs de transcription ; il y existe deux régions génomiques distinctes de l'hétérochromatine : facultatives et constitutives.

Les régions facultatives d'hétérochromatine contiennent des gènes qui sont exprimés différemment et deviennent ensuite réduits au silence lors de la différenciation et du développement, alors que les régions constitutives de l'hétérochromatine telles que les centromères et les télomères contiennent des gènes inhibés en permanence (Im et Shin 2015).

La méthylation de l'ADN est une modification chimique universelle par laquelle des groupes méthyle (Me) sont ajoutés à la molécule d'ADN ; elle se produit généralement sur les îlots CpG.

Les histones subissent plusieurs modifications post-traductionnelles différentes, notamment l'acétylation (Ac), la Méthylation (Me), l'ajout de groupements phosphate et l'ubiquitination (Ub).

Cette méthylation au niveau de l'hétérochromatine sert de site de liaison pour les protéines à domaine de liaison méthyl (MBD) qui peuvent s'associer de manière stable aux HDAC, conduisant à condenser la structure de la chromatine (**Figure 30**) :

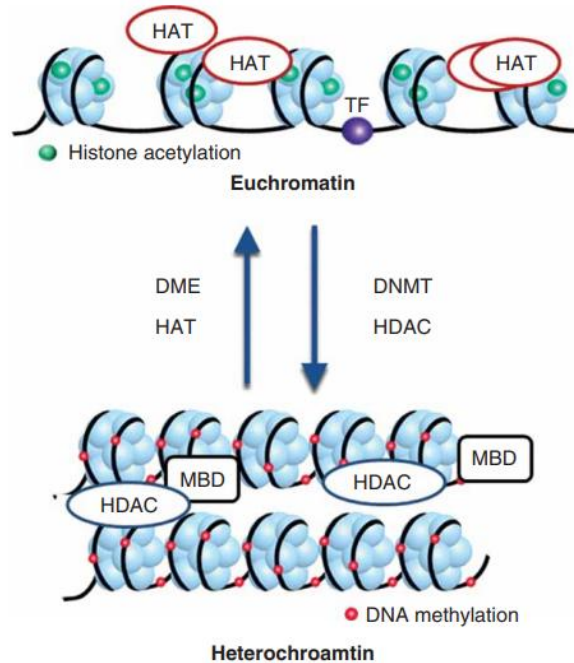


Figure 30 Structuration de la chromatine (Im et Shin 2015)

La conversion entre les états euchromatine et hétérochromatine est contrôlé par quatre processus épigénétiques fondamentaux (**Figure 31**) :

- **Les modifications covalentes** (méthylation) de l'ADN,
- **Les modifications covalentes des histones**,
- **Le remodelage de la chromatine** :
 - Le glissement des nucléosomes vers une nouvelle position sur l'ADN génomique,
 - Les changements conformationnels dans les interactions histone / ADN,
 - Les perte/gain dynamiques d'histones par désassemblage et réassemblage.
- **La transcription et les ARNnc.**

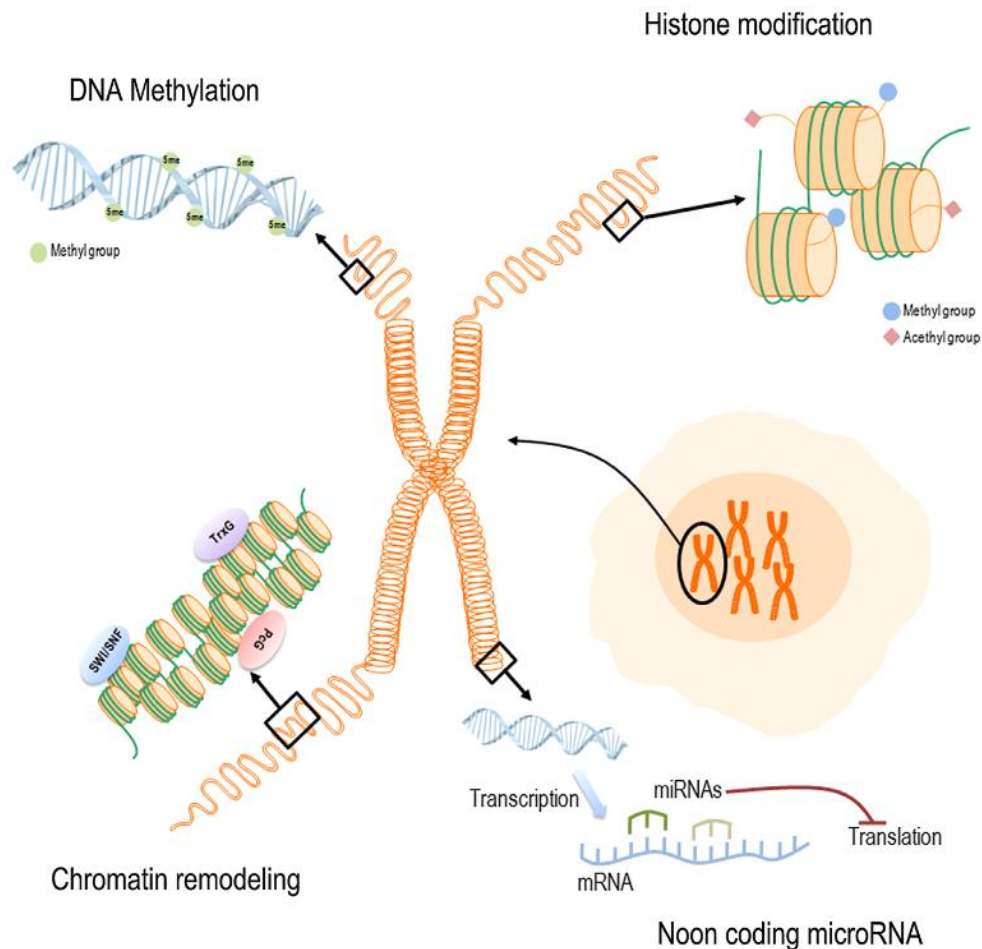


Figure 31 Marqueurs épigénétiques régulant la structure de la chromatine (Ozkul et Galderisi 2016)

Les MSC possèdent des capacités d'auto-renouvellement et de différenciation, et modulent également puissamment la niche environnante composée de facteurs solubles, de MEC et de plusieurs types de cellules.

Il est important de noter que les MSC apparaissent comme des contributeurs de l'homéostasie tissulaire, car elles interviennent de manière cruciale dans le développement des tissus (**Figure 32**) :

- Au cours du développement,
- Dans le maintien des tissus à l'âge adulte,
- Dans la réparation des tissus en cas de blessure,
- Dans la régénération des tissus dans les applications thérapeutiques (Sui et al. 2020).

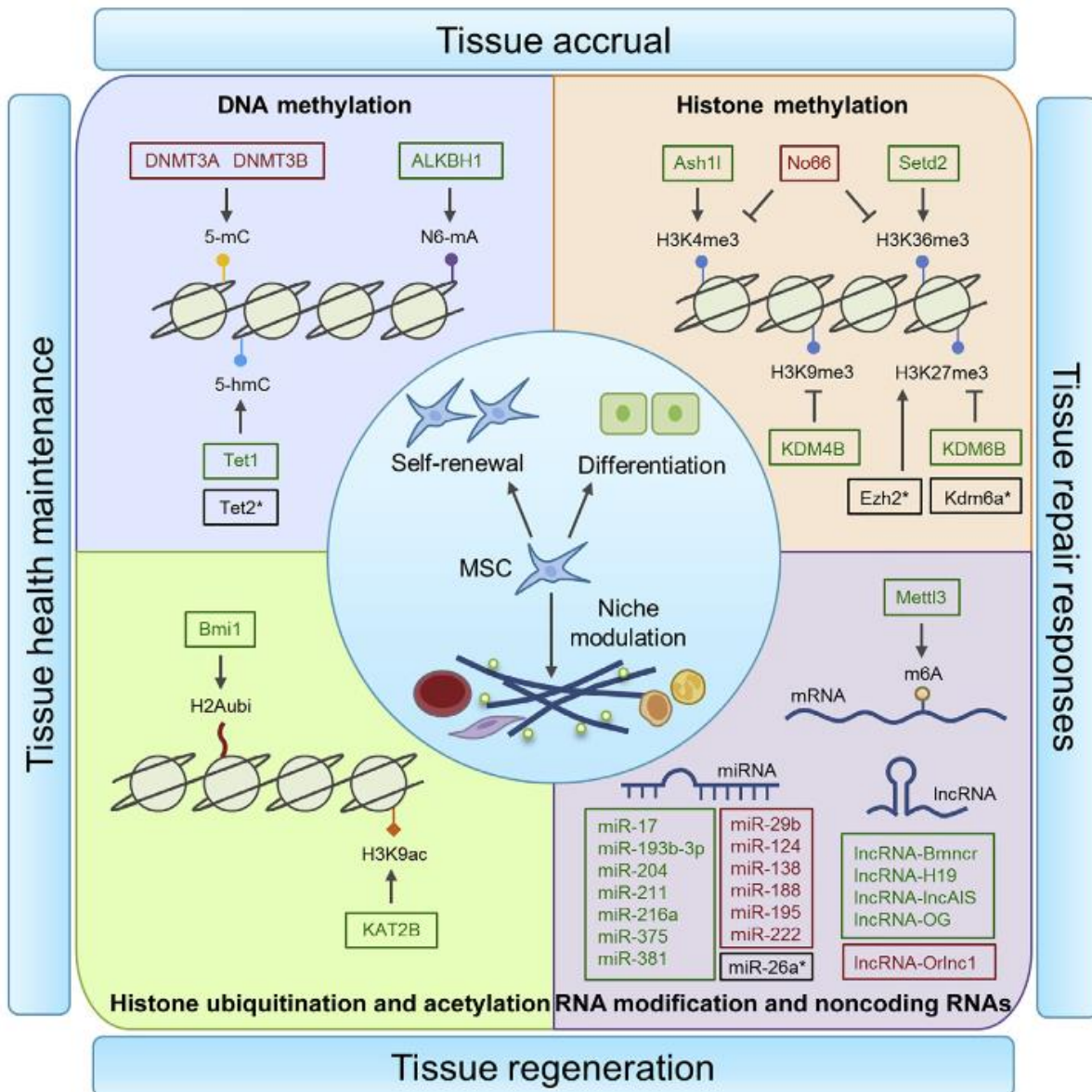


Figure 32 Régulation épigénétique des MSC dans l'homéostasie tissulaire (Sui et al. 2020)

IV.1. METHYLATION DE L'ADN

La méthylation de l'ADN est associée à la mise sous silence de la transcription ; il en résulte l'ajout d'un groupe méthyle à la cytosine dans le dinucléotide cytosine phosphate guanine (CpG) ou îlots CpG (Ma et Kang 2019).

Des études ont révélé plusieurs formes de méthylation de l'ADN, notamment en :

- 5-methylcytosine (5-mC), la modification épigénétique courante du génome humain,

- 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC),
- 5-formylcytosine (5-fC),
- 5-carboxylcytosine (5-caC) (Maiti et Drohat 2011).

Les *ADN methyltransferases* (DNMT) sont responsables de la méthylation de l'ADN, qui transfère un groupe méthyle de la *S-adenosyl methionine* (SAM) au site 5' du cycle cytosine dans l'ADN.

Dans le génome humain, cinq DNMT ont été identifiés, dont DNMT1, DNMT2, DNMT3 α , DNMT3 β et DNMT3L or bien que DNMT2 et DNMT3L aient une conservation de séquence avec les trois autres DNMT, ils ne possèdent pas d'activité catalytique (Lyko 2018).

Par ailleurs, les DNMT peuvent être divisées en deux groupes : les DNMT de novo et les DNMT de maintenance (Han et Yoon 2012).

Ainsi, DNMT1 maintient, lors de la réplication, la méthylation établie tandis que les DNMT3 α et DNMT3 β modifient l'ADN natif non méthylé (S. Liu et al. 2015).

À l'inverse, les protéines de la famille *ten-eleven translocation* (TET) convertissent le 5-mC en 5-hmC, ce qui favorise la déméthylation de l'ADN et la transcription des gènes (R. Yang et al. 2018; Ozkul et Galderisi 2016) ; ces protéines TET sont des enzymes dont l'activité est dépendante de l'oxygène et de l'alpha-cétoglutarate.

La méthylation de l'ADN est impliquée dans plusieurs processus biologiques, tels que l'empreinte génomique, la régulation de l'expression des gènes épigénétiques, la stabilité du génome et l'extinction des transposons (Nishiyama et Nakanishi 2021).

Les DNMT, à savoir DNMT1, DNMT3A et DNMT3B, ajoutent des groupes -méthyle aux nucléotides, entraînant l'inactivation des gènes, or l'expression de *Dnmt1* diminue avec l'âge, entraînant une réduction du niveau de méthylation de l'ADN.

En revanche, l'expression de *Dnmt3A* et *Dnmt3B* augmente avec l'âge et contribue ainsi à la méthylation d'îlots CpG *de novo* dans les cellules de mammifères (K. Wang et al. 2022).

Chez des patients âgés, les mutations de *Tet2* ou *Dnmt3a* augmentent l'expression de cytokines pro-inflammatoires et entraîne une inflammation chronique, associée aux maladies cardiovasculaires conventionnelles (Bick et al. 2020).

Le vieillissement est souvent marqué par une hypo méthylation globale de l'ADN, mais une hyper méthylation se produit également au niveau d'îlots CpG sélectifs.

La méthylation de l'ADN au niveau du promoteur d'un gène conduit souvent à la désactivation de ce gène (K. Wang et al. 2022).

IV.2. MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DES HISTONES

Avec leur constitution en octamère, les histones subissent différentes modifications post-traductionnelles (**Figure 33**) (J. Park et al. 2022), telles que :

- L'acétylation,
- La méthylation,
- La phosphorylation,
- La lactylation,
- La dopaminylation,
- L'ubiquitination.

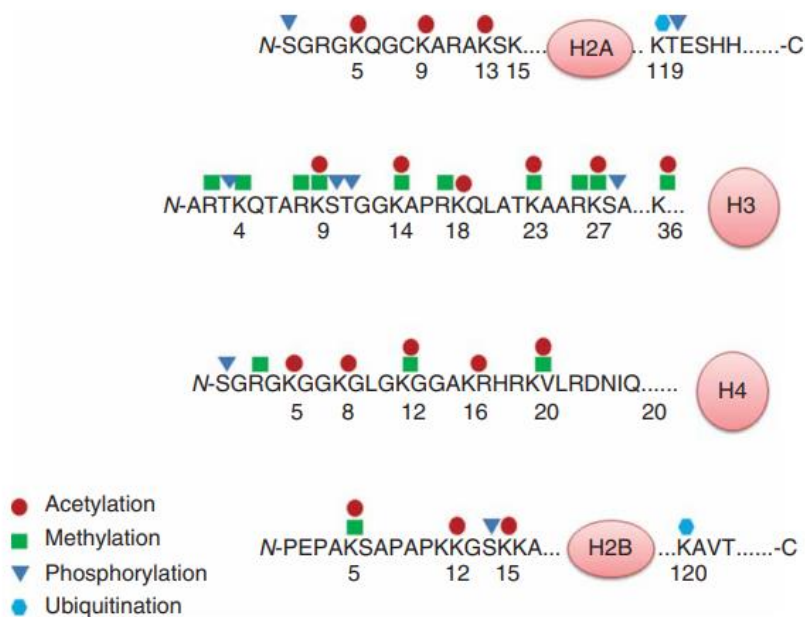


Figure 33 Sites et modifications des Histones (Im et Shin 2015)

Les modifications des histones suppriment ou ajoutent des sites de liaison dans des complexes protéiques spécifiques, mais affectent également les interactions histone/ADN ou de diverses histones, régulant ainsi l'expression des gènes.

Ces modifications post-traductionnelles (PTM) affectent la structure de la chromatine et jouent un rôle clé dans l'activation/inactivation transcriptionnelle, la réparation de l'ADN ou des chromosomes.

Un nombre particulièrement important de PTM a été découvert au niveau des extrémités terminales des histones, librement accessibles aux enzymes.

Les mécanismes par lesquels les PTM des histones affectent la structure et la dynamique de la chromatine peuvent généralement être divisés en deux catégories :

- Les premiers peuvent influencer directement les interactions histone/ADN et histone/histone,
- Les second peuvent être ciblés par des effecteurs protéiques ou domaines de liaison aux histones appelés lecteurs de PTM (**Figure 34**) (Musselman et al. 2012) ou « *readers* » s'assurant notamment de la conformité de la modification :

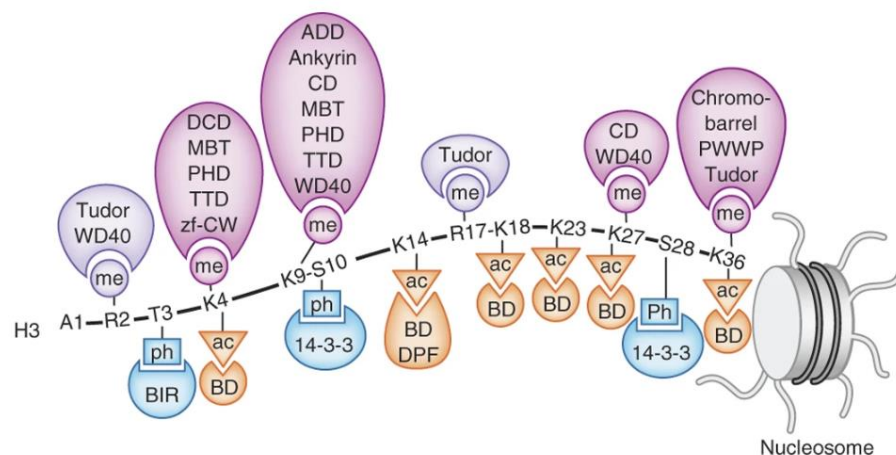


Figure 34 Lecteurs de PTM au niveau des Histones (Musselman et al. 2012)

Voici les principales modifications de histones regroupées dans ce tableau (**Figure 35**) :

Type	Major member	Modification/identification site	Function
Writers			
Histone acetylation	GCN5	H3K9, H3K14, H3K18, H3K36, H4K8	Transcriptional activation
	p300/CBP	H2AK5 H3K18, H3K27 H4K8, H4K12	Transcriptional activation
Histone methylation	Tip60	H2AK5 H3K14 H4K5, H4K8, H4K12, H4K16	Transcriptional activation
	SUV39h1 SUV39h2	H3K9	Transcriptional silencing
	G9a	H3K9	Transcriptional repression
	SETDB1	H3K9	Transcriptional repression
	EZH2	H3K27	Transcriptional silencing
	SETD2	H3K36	Transcriptional elongation
	CARM1	H3R17, H3R26, H3R42	Transcriptional activation
Histone phosphorylation	Aurora B	H3S10, H3S28	Transcriptional activation
Histone ubiquitylation	Ring1B	H2A	Transcriptional repression
	Rad6	H2B	Transcriptional elongation
Erasers			
Histone methylation	LSD1	H3K4, H3K9	Transcriptional activation/repression
	KDM4B	H3K9	Transcriptional activation
	KDM6B	H3K27	Transcriptional activation
	JMJD1C	H3K9	Transcriptional activation
Histone acetylation	HDAC1	H2A, H2B, H3, H4	Transcriptional repression
	HDAC4	H2A, H2B, H3, H4	Transcriptional repression
	HDAC6	H2A, H2B, H3, H4	Transcriptional repression
	HDAC8	H2A, H2B, H3, H4	Transcriptional repression
Histone phosphorylation	PP1	H3S10, H3S28	Transcriptional repression
Histone ubiquitylation	Ubp8	H2B	Transcriptional activation
Readers			
Acetyl-lysine binding domains	BRD2	Acetylated lysine	Chromatin remodeling
Methyl-lysine binding domains	Brpf1 HP1 L3MBTL1	Methylated lysine	

Figure 35 Principales modifications des Histones et leurs effets (J. Ren et al. 2020)

Parmi ces modifications, la méthylation et l'acétylation des résidus lysine sont les plus étudiées et sont connues pour affecter le processus de vieillissement.

Des études *in vivo* et *in vitro* rapportent des changements globaux dans les niveaux de H3K9me3, H4K20me3, H3K27me3 et H3K9ac au cours du vieillissement (Crouch et al. 2022), cela conduisant à la réactivation de séquences répétitives et à une expression génique dérégulée en raison d'une accessibilité aberrante à la chromatine (Figure 36) :

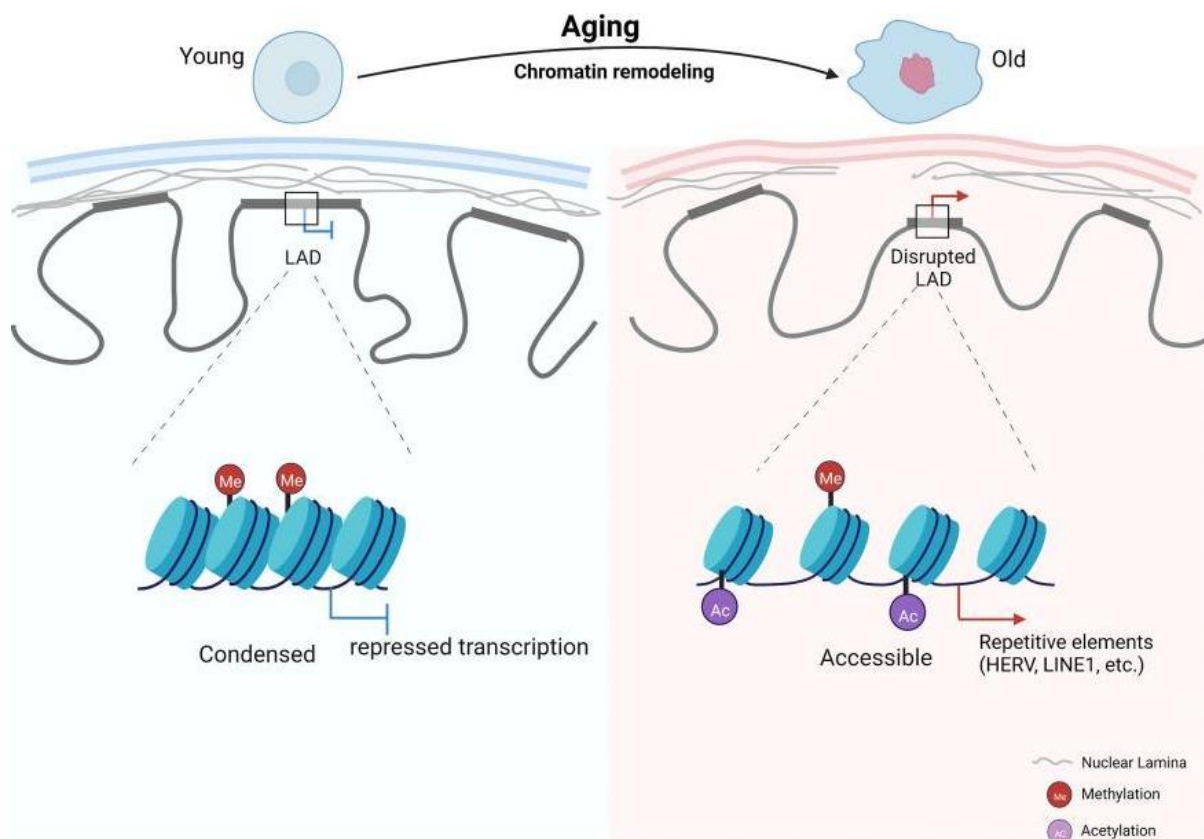


Figure 36 Remodelage structurel de la chromatine au cours du vieillissement (K. Wang et al. 2022)

IV.2.1. ACÉTYLATION DES HISTONES

Elle se produit principalement à l'extrémité N-terminale des histones H3 et H4 de la lysine ; or il existe plus de quarante sites de lysine différents modifiés par acétylation (Yingming Zhao et Garcia 2015).

L'acétylation résulte de l'interaction entre les histones acétyltransférase (HAT) et les HDAC qui ajoutent ou suppriment respectivement le groupement fonctionnel acétylé au niveau des résidus lysine des queues N-terminales des histones.

Les HAT favorisent l'acétylation des histones en catalysant le transfert d'un groupe acétylé vers un site lysine et sont principalement divisées en trois familles :

- Le complexe CREB,
- La famille MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 et Tip60 (MYST),
- La N-acétyltransférase liée à GCN5 (GNAT),
- La famille GNAT comprend HAT1, GCN5 et p300/*CREB binding protein associated factor* (PCAF) (Marmorstein et Zhou 2014).

Quant aux HDAC, elles inhibent l'acétylation des histones en catalysant l'élimination du groupe acétyle et ont été classées en quatre classes :

- La **classe I** comprend quatre HDAC, notamment HDAC1, HDAC2, HDAC3 et HDAC8, qui sont des protéines de type RPD3, orthologue de levure de HDAC1 et largement distribuées dans le noyau des lignées cellulaires et des tissus humains.
- La **classe II** comprend deux sous-classes dans les HDAC avec une expression tissulaire spécifique, HDAC4, HDAC5, HDAC7 et HDAC9 appartiennent à la classe IIa, tandis que la classe IIb comprend HDAC6 et HDAC10.
- La **classe III** est dépendante du NAD⁺ et comprend les SIRT1 à 7.
- La **classe IV** ne comprend que HDAC11 (G. Li, Tian, et Zhu 2020).

L'acétylation des histones facilite l'activation de la transcription en relâchant la structure de la chromatine (Ozkul et Galderisi 2016; Jing et al. 2018; Wu et al. 2023).

IV.2.2. METHYLATION DES HISTONES

Elle se produit principalement aux extrémités N-terminales des Histones H3 et H4 des résidus lysine et arginine (Gong et Miller 2019) et se retrouve dans la région de l'hétérochromatine et notamment au niveau du promoteur de gènes inactifs (Young et al. 2011).

La méthylation des histones sur la lysine est régulée par les histones méthyltransférases (HMT) et effacée par les histones déméthylases (HDM), tandis que les protéines arginine méthyltransférases (PRMT) catalysent la méthylation de l'histone au niveau de l'arginine (Wu et al. 2023).

Il existe une mono-, di- ou tri-méthylation des résidus lysine alors que les résidus arginine ne peuvent être que mono-méthylé ou asymétriquement ou symétriquement diméthylés (**Figure 37**) (Gong et Miller 2019) :

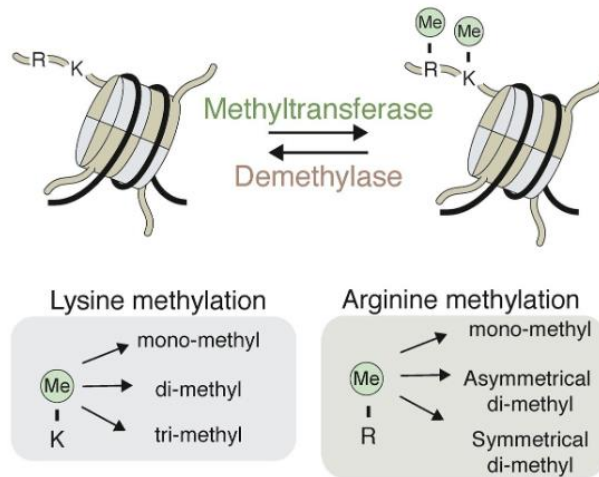


Figure 37 Processus de méthylation des Histones (Gong et Miller 2019)

Les histones méthylées peuvent être reconnues par des protéines contenant divers domaines de lecture de liaison aux groupements méthyl, tels que (Figure 38) :

- La séquence à motifs très conservés *Pro-Trp-Trp-Pro* (PWWP),
- Le chromo-domaine (Chromo),
- L'homéo-domaine à motif *Cys4-His-Cys3* découvert chez les végétaux,
- Le domaine conservé Tudor,
- La répétition β -transducine (WD40) (Gong et Miller 2019) :

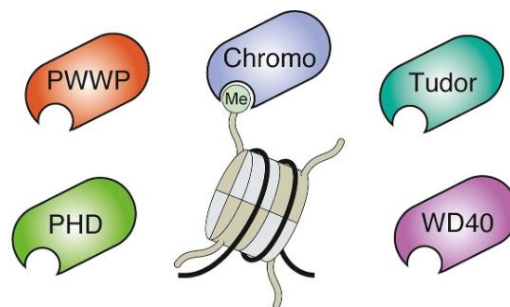


Figure 38 Domaines de lecture des Méthylations (Gong et Miller 2019)

Selon le site de méthylation, les effets sont différents ; ainsi, H3K4me3 se trouvent dans le promoteur de gènes actifs au sein de l'euchromatine, mais pas dans les régions silencieuses de l'hétérochromatine (R. Schneider et al. 2004).

La méthylation des histones H3K9 et H3K27 sont présents dans les promoteurs de gènes inactifs dans les régions d'hétérochromatine (Young et al. 2011).

Or l'activité d'un « reader » à travers une modification particulière peut être influencée par les PTM voisins.

Ainsi, de nombreux « readers » s'associent à un prolongement de l'extrémité terminale des histones, permettant la détection de plusieurs marqueurs ; les PTM voisins pouvant améliorer ou empêcher l'interaction avec le PTM cible (Figure 39) :

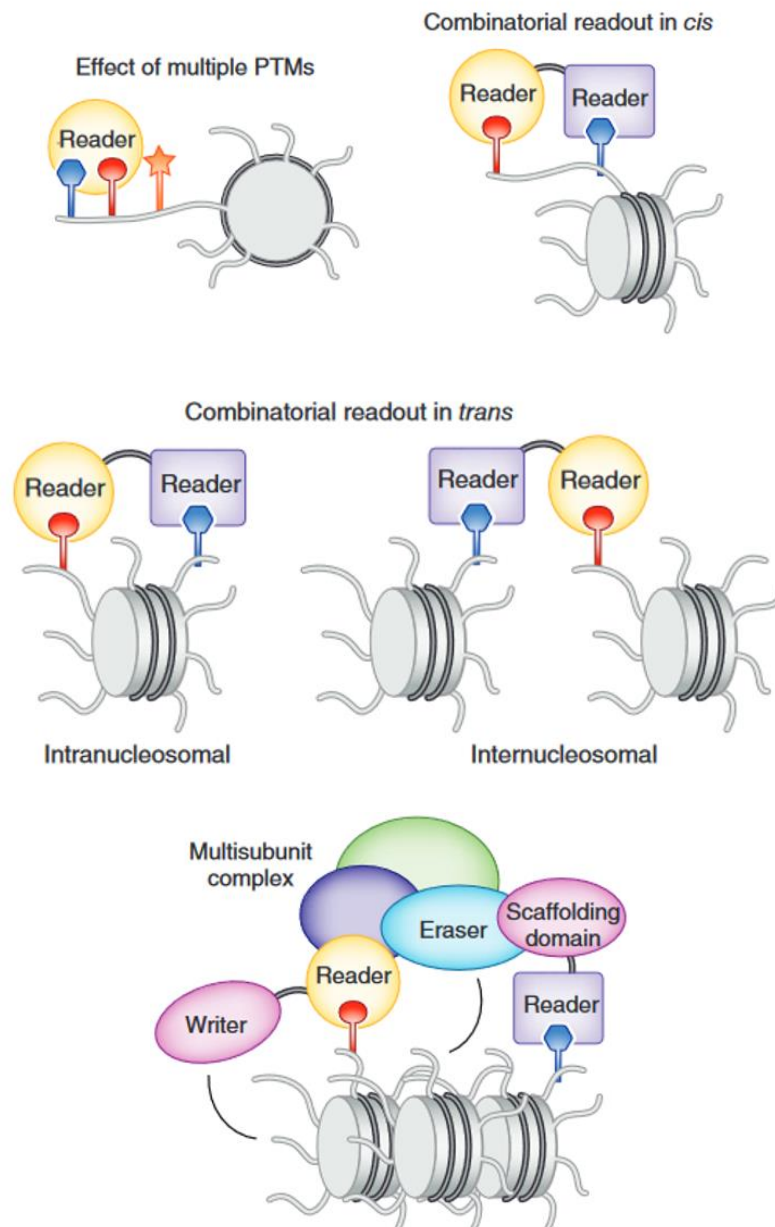


Figure 39 Lecture combinatoire des PTM (Musselman et al. 2012)

Contrairement à l'acétylation des histones, leur méthylation ne modifie pas la charge de la protéine affaiblissant l'interaction avec les ADN mais recrute des protéines de

liaison spécifiques telles que les protéines PcG et les protéines HP1, ce qui affecte la structure de la chromatine.

L'état hétérochromatique silencieux est associé à de faibles niveaux d'acétylation et à des niveaux élevés de certains sites méthylés (H3K9, H3K27 et H4K20).

IV.3. REMODELAGE DE LA CHROMATINE

Les nucléosomes sont constitués d'octamères de protéines histones enveloppés par de l'ADN (Parmar et Padinhateeri 2020).

En tant que répresseur général de gènes, un nucléosome inhibe l'initiation de la transcription.

Les complexes de remodelage de la chromatine peuvent réguler l'expression des gènes en utilisant l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour modifier l'état d'empaquetage de la chromatine en déplaçant, en glissant, en perturbant ou en restructurant le nucléosome.

Le processus de remodelage comprend plusieurs étapes clés :

- La **dissociation de l'ADN** génomique à la périphérie du nucléosome avec formation de protubérances d'ADN à la surface de l'octamère d'histone,
- La **propagation** ondulée de l'anneau d'ADN à la surface du nucléosome,
- Le *repositionnement de l'ADN* sans modification du nombre total de contacts histone-ADN (Wu et al. 2023).

Il existe quatre familles de complexes de remodelage de la chromatine :

- La famille de re-modeleurs SWItch/Sucrose non-fermentable SWI/SNF (Cenik et Shilatifard 2021),
- La famille *imitation SWItch* (ISWI) (Yanan Li et al. 2021),
- Le chromo-domaine hélicase de liaison à l'ADN (CHD) (C. Liu et al. 2021),
- La famille *inositol requiring 80* (INO80) (Willhoft et Wigley 2020).

Par ailleurs, les re-modeleurs de chromatine, protéines du groupe PcG et les protéines du groupe Trithorax (TrxG) sont essentielles à la différenciation des cellules stromales et au développement précoce (**Figure 40**) (Im et Shin 2015) :

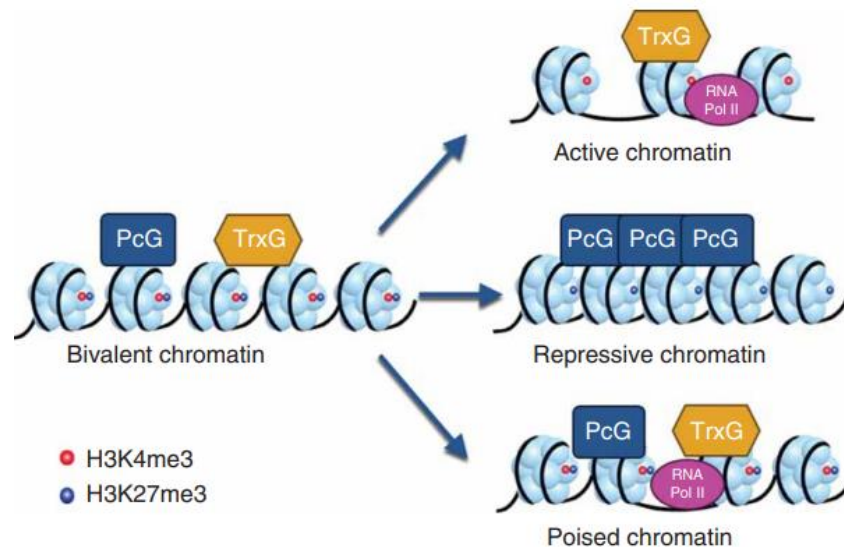


Figure 40 Structure bivalente de la chromatine régulée à travers les complexes PcG et TrxG (Im et Shin 2015)

Elles fonctionnent pour maintenir les motifs d'expression spécifiques de gènes et conserver l'identité de chaque type cellulaire au cours de la différenciation des cellules souches (Strübbe et al. 2011).

Au cours du développement, les protéines PcG maintiennent un état réprimé d'expression génique, alors que les protéines TrxG neutralisent la mise sous silence maintenant ainsi des états actifs.

Les protéines PcG travaillent ensemble à la modification des histones dans le but de réguler la structure de la chromatine et de modifier de façon dynamique l'expression des gènes au cours de la différenciation.

Elles forment des complexes multiprotéiques ou *polycomb repressive complexes* (PRC) qui sont au nombre de deux :

- **PRC1**

Elles sont constituées de la *ring finger protein 1* (Ring1), de la protéine Bmi1, de la *polycomb group ring finger2* (PCGF2) et des protéines de la famille des *chromobox ring1*.

Elle possède une activité ubiquitine ligase E3 qui mono-ubiquitine l'histone H2A à la lysine 119.

- **PRC2**

Il est constitué de *l'enhancer of zeste homolog 2* (EZH2), de *l'embryonic development protein* (EED) et de la protéine *suppressor of zeste 12* (SUZ12).

EZH2 a quant à lui une activité enzymatique pour H3K27me3, qui sert de signal de liaison des protéines PRC1 (Ku et al. 2008).

Cartographier à l'échelle du génome des profils de méthylation des histones de ESC a permis de mettre en évidence des modèles de chromatine uniques appelés « domaines bivalents », qui détiennent à la fois une marque de gène actif H3K4me3 dans les petites régions et un marqueur H3K27me3 répressif dans les grandes régions du génome.

La fonction des domaines bivalents est à la fois de garder sous silence les gènes du développement dans les ESC et les garder par ailleurs prêtes à être activées lors de la différenciation (Bernstein et al. 2006).

IV.4. ARNnc

De nombreux ARNnc ont été découverts grâce aux progrès marqués de la technologie de séquençage.

Seulement 2% du génome humain peut être traduit en protéines, le reste étant transcrit en ARNnc de tailles et de fonctions diverses.

Selon leur longueur, les ARNnc sont principalement classés (St Laurent, Wahlestedt, et Kapranov 2015) en :

- **Petits ARN non codants** (ARNsnc), dont la taille est comprise entre 18 et 200 nucléotides et pouvant être subdivisés en :
 - miARN,
 - Petits ARN nucléaires (snARN),
 - *Piwi-interacting* ARN (piARN).
- **ARNnc** dont la taille est supérieure à 200 nucléotides,

➤ **ARN circulaires** (ARNcirc).

Les ARN non codants, y compris les miARN et les ARNlnc, représentent un autre mécanisme épigénétique crucial pour réguler la fonction *in vivo* des MSC.

Bien que divers miARN et ARNlnc soient reconnus comme régulateurs de la régénération tissulaire ectopique médiée par les MSC, seuls quelques ARN candidats non codants ont une signification fonctionnelle dans les MSC résidentes (Sui et al. 2020).

Les ARNnc comme les miARN modulent généralement les processus post-transcriptionnels en empêchant la traduction de leur ARNm cibles mais peuvent également être impliqués dans la régulation transcriptionnelle (Wu et al. 2023).

Les ARNnc, régulent largement l'expression des gènes dans de multiples processus biologiques aux niveaux épigénétique, transcriptionnel et post-transcriptionnel, jouent également un rôle essentiel dans le vieillissement (K. Wang et al. 2022).

Ainsi, l'ARNnc appelé régulateur de prolifération des cardiomyocytes (CPR) qui, s'il est régulé négativement, induit l'activation du cycle cellulaire et diminue la formation de cicatrices après une lésion cardiaque (Ponnusamy et al. 2019).

Le CPR régule l'expression du gène *minichromosomal maintenance 3 (Mcm3)* en recrutant la méthylation des îlots DNMT3A et CpG sur le promoteur *Mcm3*; cette découverte suggère que le lncRNA pourrait être la cible d'un nouveau traitement contre l'infarctus du myocarde.

La plupart des études sur les molécules d'ARN modifiées en m6A et m5C proviennent de la biologie du cancer laissant les maladies cardiovasculaires relativement inexplorées (Müller et al. 2019).

À l'heure actuelle, plusieurs lncARN et miARN ont été étudiés dans des contextes physiopathologiques différentiels, notamment l'hypoxie (R. Sun et Zhang 2019), la régénération cardiaque (Tao et al. 2019), l'athérosclérose (Vengrenyuk et al. 2015) et en présence d'une altération de la pression artérielle (Boettger et al. 2009), mais on sait peu de choses sur les conséquences de modifications épigénétiques sur leur structure, leur régulation et leur fonction.

Les conséquences physiologiques et physiopathologiques de la modification de l'ARN dans l'adénosine et la cytosine et leur implication dans les maladies cardiovasculaires restent pour la plupart floues malgré des avancées (**Figure 41**) (Dorn et al. 2019; Mathiyalagan et al. 2019; Ponnusamy et al. 2019) :

CVDs	Nucleic Acid Involved	Enzyme	Base	Effects
Cardiac hypertrophy	mRNA of MAPK	METTL3	A	Increased size of cardiomyocytes
Dilated cardiomyopathy	Global RNA	METTL3	A	Cell growth arrest
Cardiomyopathy after hypoxia/reperfusion injury	LncRNA (MALAT1)	METTL3	A	Apoptosis
Cardiac hypoxia	mRNA of TEFB	METTL3	A	Increased apoptosis and reduced autophagy
Ischemic stroke in the presence of HHcy	DNA promoter of H19/IGF2	DNMT3B	C	Alteration of H19 and IGF2 expression; induction of apoptosis in cardiomyocyte
	mRNA	METTL3	A	Induction of M1 macrophage polarization; increased inflammation
Atherosclerotic plaque formation	LncRNA (MALAT1)	METTL3	A	Increased vascular adhesiveness
	MiRNA (microRNA125b)	Nsun2	C	Increased cell adhesion on VCAM
	DNA promoter of microRNA145	DNMT3B	C	Increased cell adhesion and inflammation
Atherosclerotic plaque formation in association with HHcy	mRNA of IL-17A	Nsun2	C	Increased expression of pro-inflammatory cytokines

Figure 41 Modificaion des ARN dans les CVD et leurs effets (Mongelli et al. 2020)

V.4.1. MIARN

Les miARN sont un type essentiel d'ARN endogènes d'une longueur d'environ 20 à 23 nucléotides, qui proviennent d'un précurseur d'ARN double brin ou en épingle à cheveux ; l'ARN pol II contribuant à la biogenèse des miARN.

Les miARN peuvent inhiber l'expression des gènes et supprimer la traduction en incorporant un complexe de mise sous silence induit par l'ARN (RISC) et en s'appariant aux régions non traduites en 3' (3'-UTR) des ARNm cibles (Wu et al. 2023).

Il existe une interaction entre l'expression des miARN et la machinerie épigénétique, y compris une boucle de rétroaction entre eux (Q. Yao, Chen, et Zhou 2019).

Divers miARN sont régulés par des mécanismes épigénétiques, notamment la méthylation de l'ADN et les modifications des histones.

En outre, les miARN sont impliqués dans les processus épigénétiques en modulant les enzymes clés des modifications épigénétiques, telles que les HDAC et les DNMT (H. Jiang et al., s. d.).

Les miARN interagissent avec les ARNm cibles par appariement de bases complémentaires entre les miARN et la région non traduite 3' de l'ARNm, provoquant la dégradation de l'ARNm cible ou la suppression traductionnelle (**Figure 42**) :

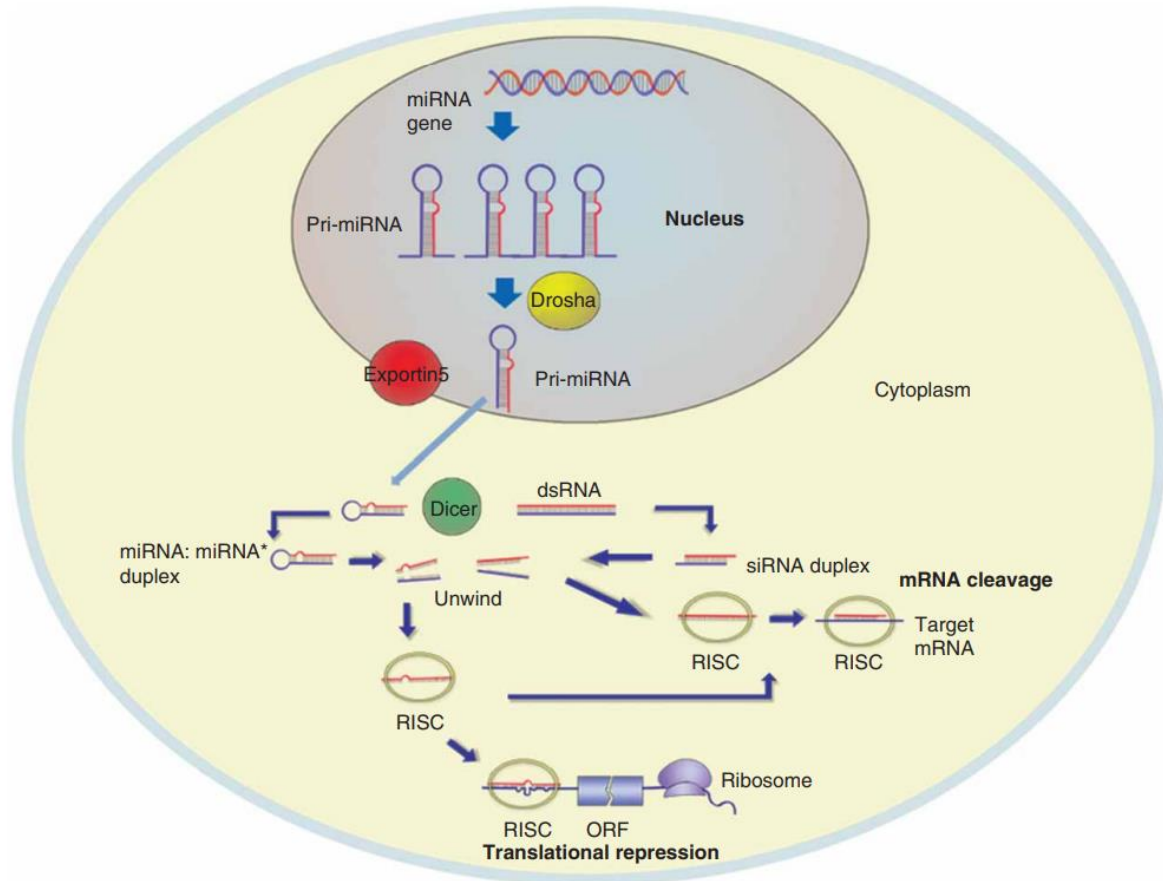


Figure 42 Mécanismes de fonctionnement des miARN (Im et Shin 2015)

Les signaux inflammatoires sont à la base de toutes les maladies chroniques et sont souvent déclenchés par des conditions dys-métaboliques associées au vieillissement, un processus largement défini comme inflammatoire ; or certains ARNnc sont régulés par méthylation avec des conséquences sur l'homéostasie cardiovasculaire.

Ainsi, *in vivo*, l'expression de miR-145 a un impact sur l'athérosclérose ; des niveaux élevés de ce miARN protègent les vaisseaux sanguins de la formation de plaques d'athérome et de l'hypertension (Vengrenyuk et al. 2015).

La méthylation du promoteur miR-145 régule négativement l'expression du miRNA régulé en cis, empêchant son action indésirable sur le facteur *nuclear factor of activated T cells 1* (NFATc1) et CD13 ; en conséquence, les cellules musculaires lisses

vasculaires expriment davantage de protéine *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3* (NLRP3) qui, à son tour, active la sécrétion d'IL1 β , favorisant l'inflammation intravasculaire (Zhong et al. 2018).

De plus, miR-145 régule les protéines *ubiquitin-like containing PHD and RING finger domains 1* (UHRF1), qui interagissent avec DNMT1, suggérant un lien indirect entre la modulation des miARN et la méthylation de l'ADN (Elia et al. 2018).

Il a été constaté que DNMT1 méthylait le promoteur miR-145, réalisant une boucle de rétroaction négative (Zhong et al. 2018) ; ce phénomène se traduisant par une régulation positive de différents gènes, améliorant de fait la transcription des cytokines liées à l'inflammation.

Il a également été démontré que les miARN modulaient l'expression des gènes en inhibant la traduction de l'ARNm et en provoquant une dégradation de l'ARNm (Poller et al. 2018; X. Sun, Haider Ali, et Moran 2017; Archer et al. 2015).

Par ailleurs, il semble que les miARN puissent affecter l'angiogenèse myocardique ainsi que la survie et la prolifération des cardiomyocytes en régulant l'expression des gènes cibles ; certains miARN étant connus pour être impliqués dans l'angiogenèse du muscle cardiaque (Fadaei et al. 2022) .

L'angiogenèse est essentielle à l'apport d'oxygène et de nutriments essentiels au muscle cardiaque et peut être activée ou réprimée par un certain nombre de microARN (Figure 43) :

- miR-15, miR-24, miR-26 et miR-92a qui répriment tous l'angiogenèse en inhibant les fonctions des cellules endothéliales.
- miR-210 déclenche l'angiogenèse en inhibant plusieurs facteurs anti angiogéniques.

Un certain nombre de miARN ont été identifiés comme étant impliqués dans l'apoptose et la survie des cellules cardiaques ; l'inhibition de l'apoptose ou une augmentation des signaux de survie favorisant la régénération cardiaque.

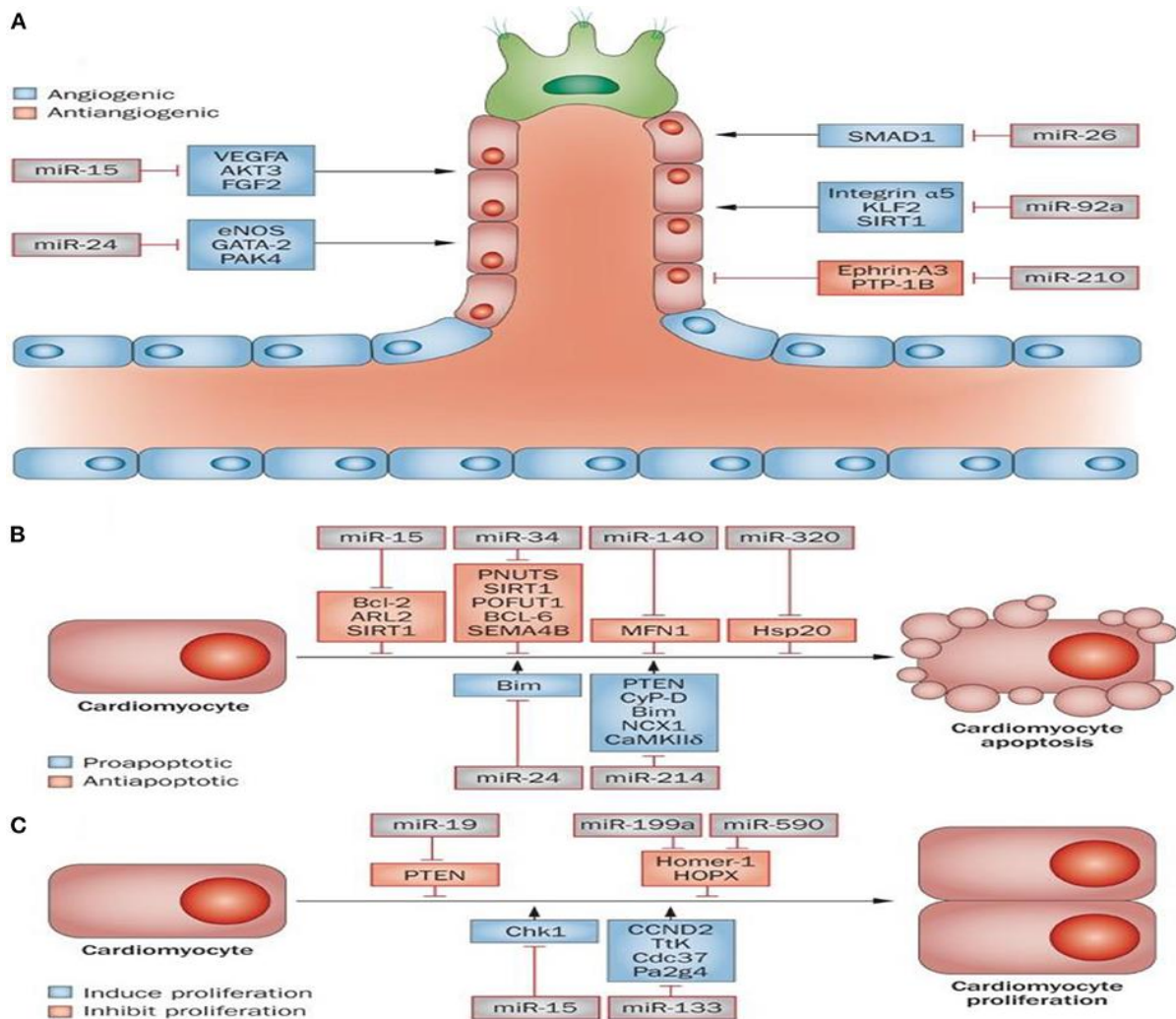


Figure 43 Rôle des miRNA dans l'infarctus du myocarde (Fadaei et al. 2022)

Ainsi la famille miR-15 (miR-320, miR-34 et miR-140) peut servir de facteurs pro-apoptotiques, tandis que miR-24 et miR-214 peuvent agir comme facteurs anti-apoptotiques.

La prolifération des cellules cardiaques est limitée, cependant, la régénération cardiaque peut augmenter suite à une stimulation de la prolifération ; il a ainsi été démontré que miR-19, miR-199a et miR-590 pouvaient favoriser la prolifération des cellules cardiaques, tandis que miR-15 et miR-133 inhibaient la prolifération des cellules cardiaques (Fadaei et al. 2022).

V.4.2. ARNLNC

En raison de leurs emplacements différents par rapport aux gènes codant pour les protéines, les ARNlnc sont regroupés en cinq classes différentes (Quinn et Chang 2016) :

- Les ARNlnc intergéniques,
- Les ARN antisens,
- Les ARN chevauchants sens,
- Les ARN introniques sens,
- Les ARNnc de transcription « traités ».

Les ARNnc participent à différents processus biologiques cruciaux, tels que la régulation de l'activité enzymatique et la formation de la structure des chromosomes, en agissant comme des échafaudages, des leurres ou des signaux (S. Geisler et Coller 2013).

Récemment, il a été rapporté que les lncARN agiraient comme des éponges de miARN dans le cytoplasme, ou des gènes hôtes pour la transcription des miARN dans le noyau (Z. Zhao et al. 2020).

De plus, les ARNnc interviennent dans la méthylation de l'ADN et agissent comme des échafaudages modulaires des complexes de modification d'histone (W. Huang et al. 2022).

Ils exercent leurs effets sur les maladies cardiaques en affectant les modifications des gènes épigénétiques, la régulation transcriptionnelle et post-traductionnelle via une liaison directe aux protéines, aux miARN et à d'autres ARNnc (Hobuß, Bär, et Thum 2019).

Bien que le nombre d'ARNnc découverts ait augmenté au fil des années, il existe encore peu d'informations sur les mécanismes d'action et les fonctions remplies par ces biomolécules.

L'une des raisons de ce retard est que de nombreux ARNnc présentent des modèles d'expression temporels et spatiaux uniques (Derrien et al. 2012).

De plus, contrairement aux microARN et aux ARNm, la plupart des ARNnc ont une mauvaise conservation des séquences entre les différentes espèces, ce qui rend

difficile l'obtention d'informations fonctionnelles et des mécanismes d'action de la grande majorité des ARNnc et, par conséquent, la traduction des résultats des modèles animaux aux humains (C. C. M. Correia et al. 2021; Diederichs 2014).

Par conséquent, les essais cliniques se limitent à travailler uniquement avec les ARNnc qui ont des homologues humains.

V.4.3. ARNcirc

Les ARNcirc, une nouvelle classe d'ARN endogènes contenant des structures en boucle fermée de manière covalente, sont spécifiques des tissus et des cellules des eucaryotes (Kristensen et al. 2019).

Au cours du processus d'épissage des ARN, les ARNcirc sont générés à partir d'introns, d'exons ou d'une combinaison d'exons et d'introns. Contrairement aux molécules d'ARN linéaires normales, les queues 3' et 5' des ARNcir sont jointes de manière covalente pour former une boucle fermée.

De nombreux ARNcirc jouent un rôle biologique important dans de nombreuses maladies métaboliques en fonctionnant comme des éponges de protéines ou de miARN et en s'auto-traduisant (Schreiner et al. 2020) ; ils présentent une spécificité tissulaire et une conservation évolutive.

Des études récentes indiquent que les ARNcirc participent à la régulation de la méthylation de l'ADN et à la modification des histones (Dong et al. 2021).

Ils peuvent agir comme un ARN endogène compétitif et une éponge qui se lie aux séquences complémentaires de miARN pour modérer l'expression des gènes (Qu et al. 2015; Salmena et al. 2011).

Pour le moment de nombreuses équipes explorent les gènes cibles des ARNcirc dans le contexte de l'infarctus du myocarde sur des modèles animaux (L. Huang et al. 2023; Fadaei et al. 2022; C. Luo et al. 2021; Bai et al. 2019).

IV.5. IMPACT DES REGULATIONS EPIGENETIQUES

L'acétylation des histones est importante dans la régulation de l'expression des gènes et est normalement associée à des régions denses en gènes transcriptionnellement actives, appelées euchromatine.

L'acétylation peut être transitoire et doit être maintenue par une activité enzymatique.

Les HAT transfèrent le groupe acétyle (-COCH₃) de l'acétyl-CoA aux résidus lysine ; à l'inverse, les HDAC suppriment les groupes acétyle.

Les HAT et les HDAC sont également capables de modifier une grande variété de protéines non histones dont l'activité dépend de leur statut d'acétylation, telles que les facteurs de transcription, les protéines chaperons, les médiateurs de transduction du signal, les protéines structurales et les médiateurs de l'inflammation.

Par conséquent, les changements dans l'état d'acétylation ont des conséquences sur la stabilité des protéines, les interactions protéine-protéine et les interactions protéine-ADN (Figure 44) (Bassett et Barnett 2014) :

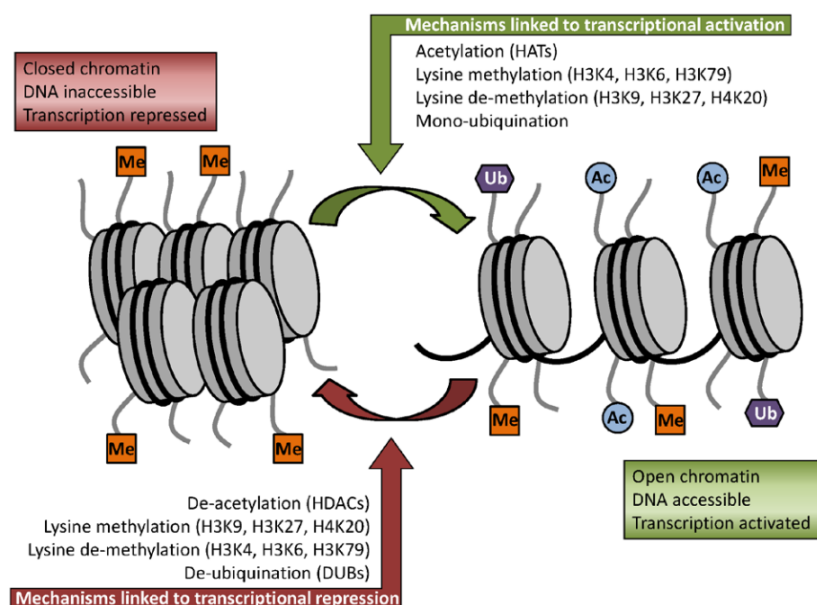


Figure 44 Modifications clés des histones influençant l'expression des gènes (Bassett et Barnett 2014)

Des modifications apportées à des résidus d'histone spécifiques, telles que l'ajout d'un groupe acétyle à un résidu lysine *via* une HAT, conduisent au dépliement de la

chromatine, ce qui permet à la machinerie transcriptionnelle d'accéder à l'ADN, entraînant ainsi une activation transcriptionnelle.

À l'inverse, l'élimination de ce résidu acétyl par l'intermédiaire d'une HDAC modifie la configuration des histones, ramenant à nouveau la chromatine à sa forme fermée.

Dans le cas de la méthylation des histones, l'effet sur la conformation de la chromatine dépend du résidu lysine spécifique méthylé (Bassett et Barnett 2014).

Différents mécanismes de mise sous silence épigénétique empêchent la transcription des localisations génomiques.

Ainsi l'enroulement de l'ADN autour des octamères d'histone pour former des nucléosomes constitue une barrière au recrutement et à la processivité des ARN polymérases ; les nucléosomes très compactés sont inaccessibles aux ARN polymérases et aux facteurs de transcription et les gènes contenus dans ces régions restent donc silencieux.

L'empaquetage du génome est influencé par les modifications des queues d'histone et de l'ADN.

Les altérations des histones et les modifications de l'ADN sont courantes dans le cancer et d'autres maladies et on s'attend donc à ce que de petites molécules capables d'inhiber l'activité des enzymes impliquées dans ces modifications aient un potentiel thérapeutique.

Plusieurs de ces inhibiteurs font actuellement l'objet d'essais cliniques ou ont été approuvés par la *Food and Drug Administration* (FDA) pour le traitement de certains cancers (Mohammad, Barbash, et Creasy 2019).

Ces médicaments ciblent des facteurs distincts impliqués dans la régulation épigénétique or plusieurs des enzymes épigénétiques ciblées par ces médicaments, telles que les DNMT, les HDAC, l'HDM *lysine specific demethylase 1* (LSD1) et les HMT EZH2 et G9A, jouent un rôle dans la répression transcriptionnelle des *transposable elements* (TE) dans les cellules cancéreuses (**Figure 45**) (Barrero 2020) :

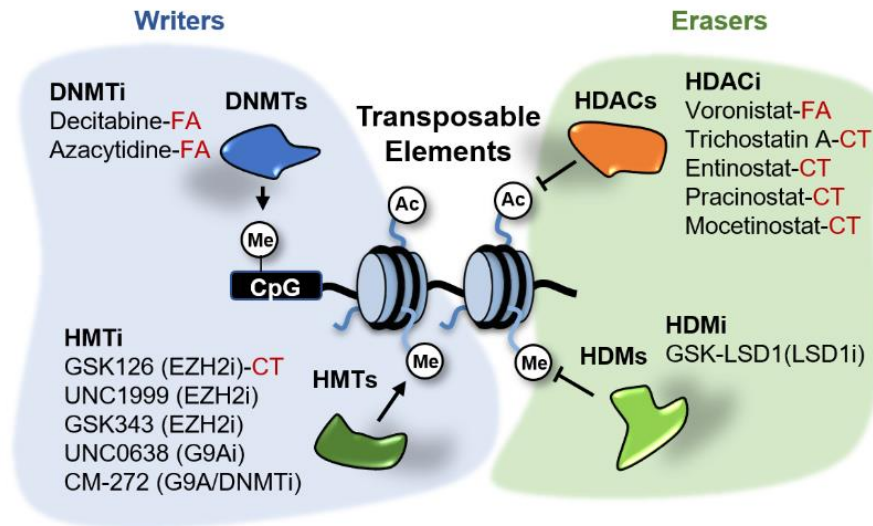


Figure 45 Inhibiteurs épigénétiques stimulant l'expression des TE dans les cellules cancéreuses (Barrero 2020)

Il a été rapporté que les lysine méthyltransférases et les lysine déméthylases étaient capables de catalyser respectivement le processus de N-méthylation et de N-déméthylation des histones lysines.

Sur la base de leurs mécanismes catalytiques, les déméthylases sont divisées en deux sous-groupes :

- LSD1 et LSD2 dépendants du FAD,
- La famille *Jumonji C domain-containing histone demethylase* (JMJD) contenant le domaine JmjC.

Avant la découverte de la première déméthylase LSD1 en 2004 (Y. Shi et al. 2004), le processus de méthylation des histones était considéré comme irréversible or LSD1 déméthyle spécifiquement les résidus histone lysine H3K4me_{1/2} et H3K9 me_{1/2} (Figure 46) :

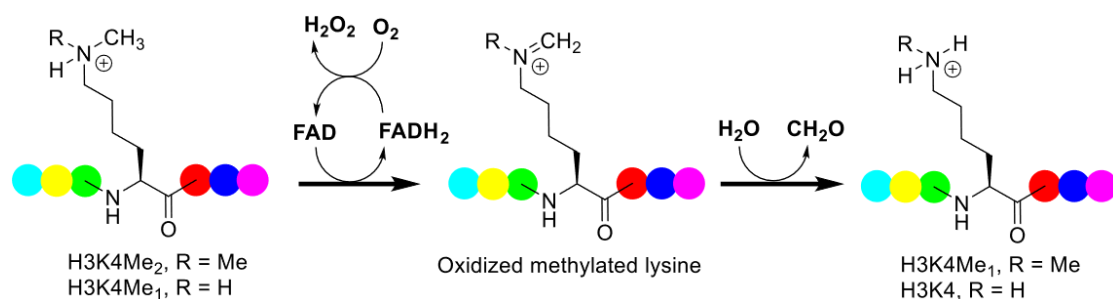


Figure 46 Déméthylation FAD-dépendante médiée par LSD1 des lysines méthylées (Y. Fang, Liao, et Yu 2019)

LSD2, une histone H3K4me1/2 déméthylase, est le seul homologue de LSD1 dans le génome humain (R. Fang et al. 2010).

LSD1 se lie aux régions promotrices, tandis que LSD2 est principalement enrichi au niveau des régions corporelles des gènes activement transcrits ; par conséquent, le LSD2 est également important dans la régulation épigénétique mais a une organisation structurale et des fonctions différentes par rapport au LSD1 (Yi Yang et al. 2015).

La famille JMJD quant à elle, élimine par oxydation le groupe tri-méthyle du résidu lysine de l'histone de manière dépendante du Fe^{2+} et du 2-cetoglutarate (2-CG) et jouent un rôle clé dans la différenciation cellulaire, la prolifération et l'auto-renouvellement des cellules souches (**Figure 47**) (Johansson et al. 2016) :

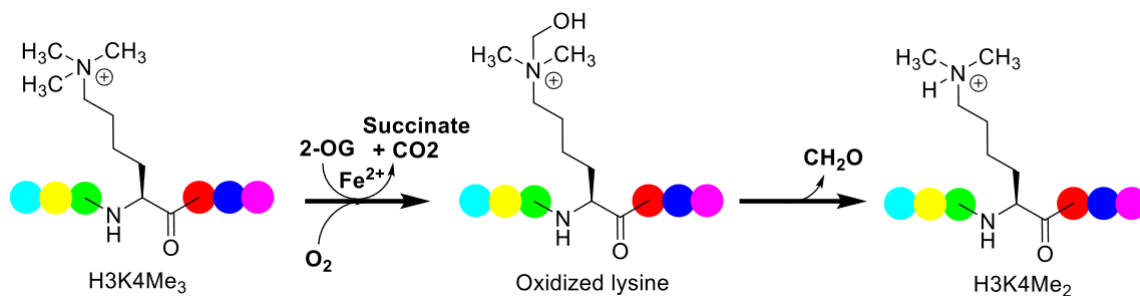


Figure 47 Déméthylation $Fe^{2+}/2-OG$ -dépendante médiée par *JmjC* des lysines méthylées (Y. Fang, Liao, et Yu 2019)

LSD1 régule certains substrats non histones, notamment DNMT1, p53, STAT3 et l'*adenoviral early region 2 binding factor 1* (E2F1), qui possèdent des fonctions vitales lors de l'expression des gènes (Zheng et al. 2015).

Ces études indiquent que LSD1, en tant qu' « eraser » de H3K4/9me, pourrait réguler l'expression des gènes au cours de la carcinogenèse.

LSD1 supprime par ailleurs la transcription des gènes en se liant au complexe *co-repressor of repressor element-1 silencing transcription* (CoREST) ou supprime le remodelage des nucléosomes et le complexe répressif de la désacétylase mais il favorise également l'activation transcriptionnelle lors de la liaison au récepteur des androgènes (AR) ou au récepteur des œstrogènes (ER), régulant ainsi de nombreux processus cellulaires fondamentaux (Magliulo, Bernardi, et Messina 2018).

Par exemple, la liaison de H3 et l'expression génique du LSD1 sont affectées par la désacétylation du LSD1 médiée par HDAC1.

La diaphonie entre HDAC1 et LSD1 suggère que l'activité de LSD1 pourrait être influencée par les inhibiteurs de HDAC (Nalawansha et Pflum 2017).

Des niveaux élevés de LSD1 ont été trouvés dans divers cancers et montrent une relation étroite avec de nombreux effets cellulaires tels que la transition épithéliale-mésenchymateuse, la prolifération et la différenciation cellulaire, la biologie des cellules souches et la transformation maligne (Abdel-Magid 2017).

L'inactivation du LSD1 améliore également l'immunité antitumorale et inhibe le blocus des points de contrôle (Sheng et al. 2018).

Le profil d'expression révèle que l'inhibition du LSD1 affecte principalement la machinerie de réplication et le cycle cellulaire, et interrompt la signalisation en aval de l'*epithelial growth factor receptor* (EGFR).

L'inhibition pharmacologique du LSD1 conduit à l'inhibition de la prolifération, de la différenciation, de l'invasion et de la migration *in vitro* et *in vivo* (Zheng et al. 2016) ; cibler l'activité indépendante de la déméthylase du LSD1 est une stratégie émergente pour le traitement des cancers.

Ces résultats mettent en évidence l'importance biologique du LSD1 en tant que cible thérapeutique émergente ; ainsi, le traitement proposé par le laboratoire *GlaxoSmithKline* - *lysine specific demethylase 1* (GSK-LSD1), notamment GSK2879552 a montré une sélectivité élevée pour le FAD, conduisant à une inactivation complète du LSD1 (Y. Fang, Liao, et Yu 2019).

V. LIEN METABOLISME ET EPIGENETIQUE

La régulation du métabolisme cellulaire est essentielle au maintien de l'homéostasie, de la croissance, de la prolifération, de la migration, de la différenciation et de l'apoptose des cellules.

Cette régulation implique des changements coordonnés dans l'expression des gènes en réponse à des signaux extracellulaires et intracellulaires afin de gérer les besoins des cellules et s'adapter aux flux environnementaux.

Par ailleurs, l'exercice et le sommeil jouant également un rôle essentiel dans la régulation de l'homéostasie des cellules souches, l'axe de régulation métabolique-épigénétique contrôlant ces processus doit également être étudié pour comprendre de manière globale la régulation du vieillissement cellulaire.

Diverses enzymes métaboliques codées par le noyau, généralement localisées dans le cytoplasme ou les mitochondries, sont également présentes dans le noyau ; cette localisation dynamique des enzymes métaboliques régule les niveaux de métabolites de manière spatio-temporelle avec des conséquences directes sur la régulation épigénétique de l'expression des gènes (Wiese et Bannister 2020).

Le métabolisme est ainsi étroitement intégré aux processus épigénétiques et épi-transcriptomiques pour réguler les réponses physiologiques aux stimuli extracellulaires, et la dérégulation de ces voies interconnectées peut avoir de profondes conséquences, conduisant au développement de maladies spécifiques (**Figure 48**) (Wiese et Bannister 2020) :

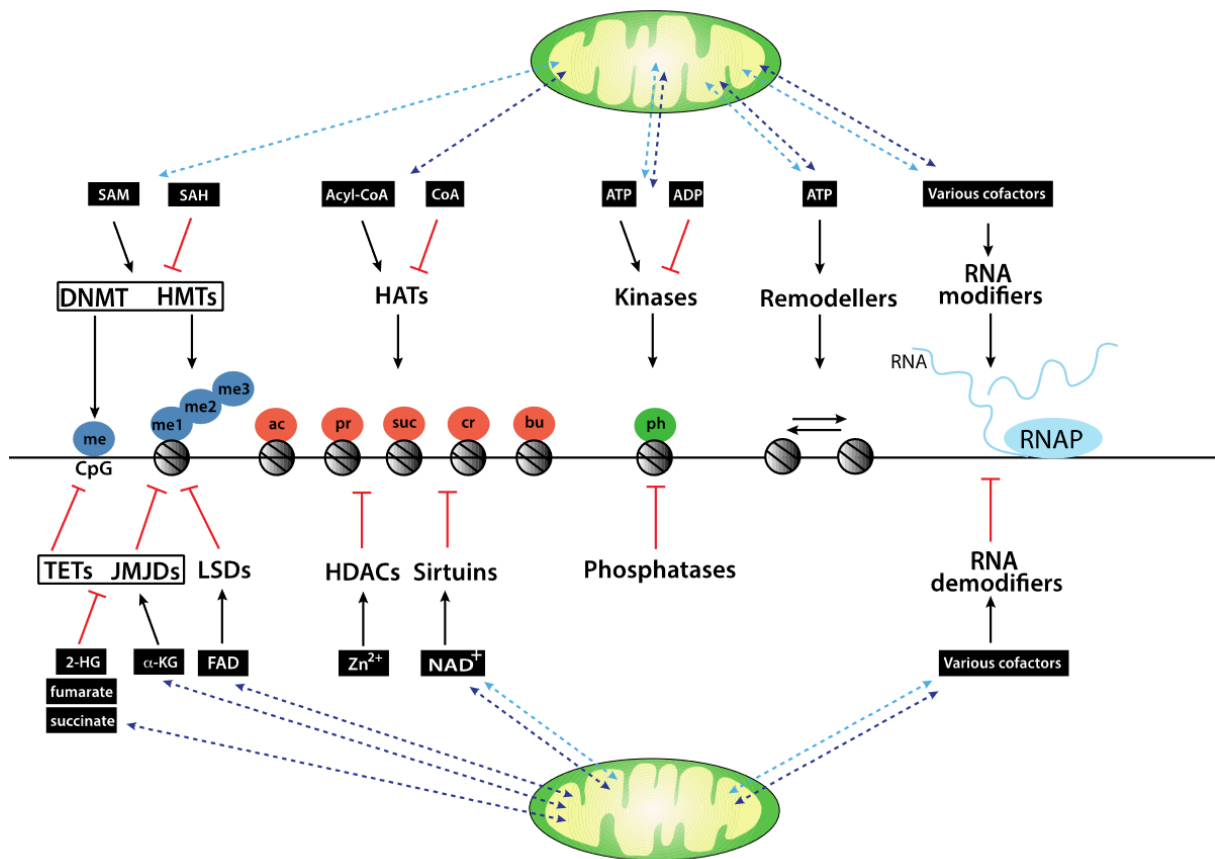


Figure 48 Impact des intermédiaires métaboliques sur les modifications de la chromatine (Wiese et Bannister 2020)

La différenciation des MSC est un processus régulé par diverses voies de signalisation avec un enchevêtrement complexe dans laquelle tous les types de régulation épigénétique et transcriptionnelle sont impliqués (Mortada et Mortada 2018).

Les premières études se sont concentrées sur la manière dont les stimuli externes et les facteurs de transcription internes modulent la différenciation des MSC ; cependant, des études récentes ont révélé le rôle des modifications des histones dans ce processus (B. Huang, Li, et Jiang 2015).

Il est maintenant établi que la modification des histones au niveau des régions promotrices des facteurs de transcription associés à l'engagement vers une lignée cellulaire, tels que :

- *Runx2* et *Osterix (Osx)* dans la différenciation ostéogénique,
- *Pparγ* et *CCAAT/enhancer-binding protein alpha (Cebpa)* dans la différenciation adipogénique,
- *Sox9* dans la différenciation chondrogénique,

Sont modifiés dynamiquement (**Figure 49**) (Meyer et al. 2016; J. Ren et al. 2020) :

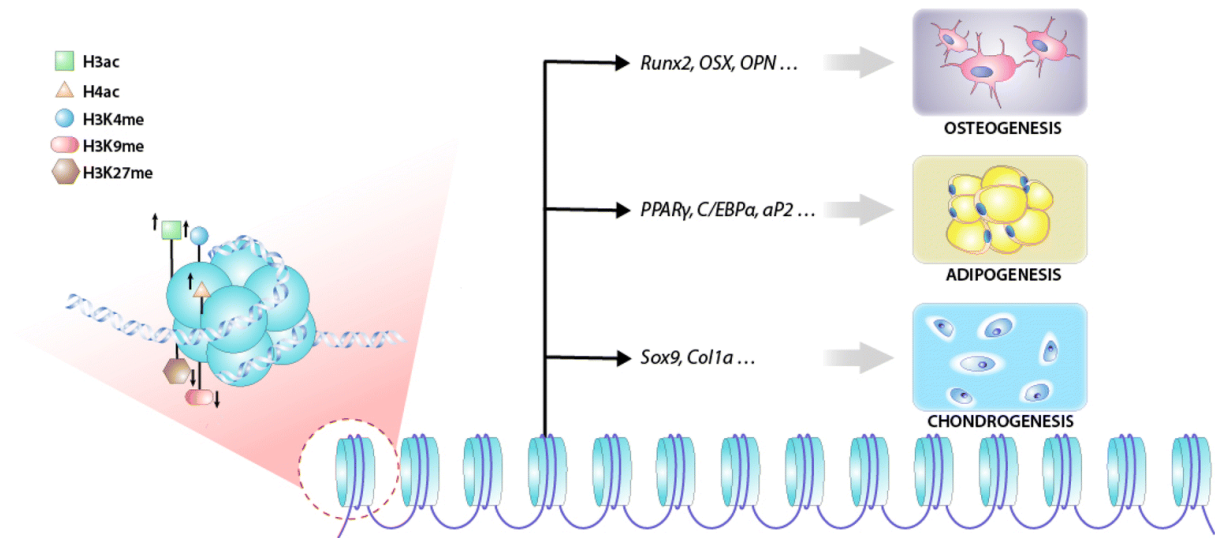


Figure 49 Différenciation des MSC associée aux modifications épigénétiques des Histones intervenant au niveau de gènes spécifiques de lignées (J. Ren et al. 2020)

La modification des histones influence l'expression des gènes et donc l'engagement du devenir des MSC (**Figure 50**) (J. Ren et al. 2020) :

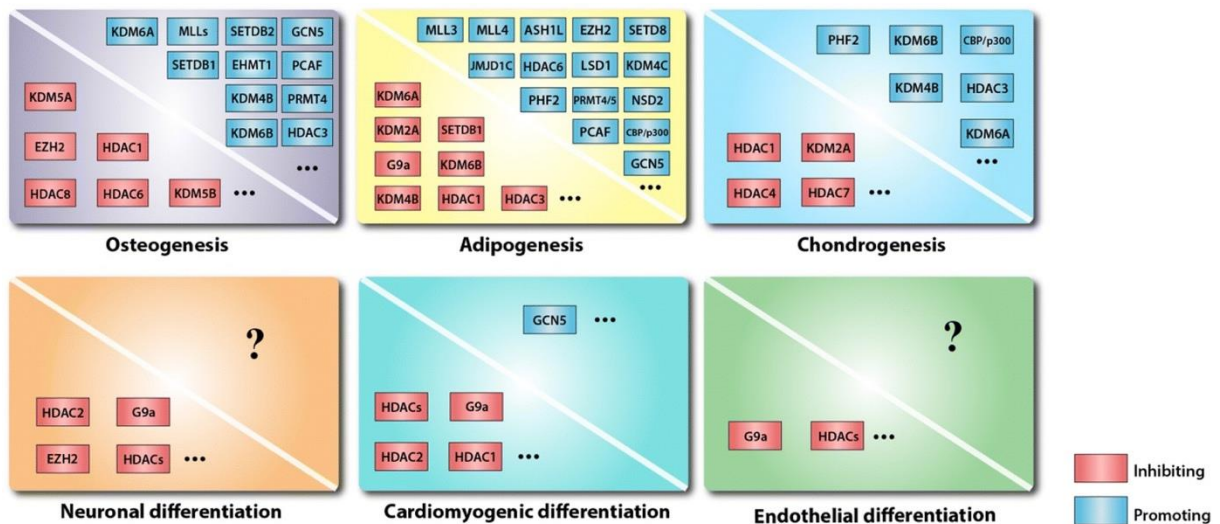


Figure 50 Rôle des enzymes modifiant les Histones dans la différenciation des MSC (J. Ren et al. 2020)

Les modifications des histones, sont réversibles mais peuvent avoir des conséquences distinctes.

Tan et ses collègues ont noté que les marques H3K9ac sur les régions promotrices du gène diminuaient globalement, mais que les marques H3K9me2 quant à elles augmentaient au cours de la différenciation ostéogénique (Tan et al. 2009).

Les gènes méthylés sur l'ADN présentent certaines tendances à l'hyper- ou à l'hypo-méthylation au cours du vieillissement ; ainsi, l'hyper-méthylation est associée aux marques répressives des histones H3K9me3 et H3K27me3, tandis que l'hypo-méthylation est associée à H3K4me1 (J. Ren et al. 2020).

Par exemple, H3K4me3 et H3K36me3 marquent des gènes transcriptionnellement actifs, tandis que H3K9me3 et H3K27me3 sont associés à la répression transcriptionnelle dans l'hétérochromatine (Fernández et al. 2015; Sui et al. 2020).

Ces « codes » de méthylation d'histone peuvent être ajoutés ou supprimés en fonction des méthylases ou déméthylases spécifiques respectives.

En outre, les différents types de cellules souches, tant embryonnaires qu'adultes, sont caractérisés par la présence de gènes à domaines bivalents, contrôlés par les protéines PcG et TrxG qui jouent un rôle crucial dans la régulation du développement (Im et Shin 2015).

Ces gènes possèdent simultanément une méthylation H3K4me3, associée à une activation de la transcription, et une méthylation H3K27me3, normalement associée aux gènes transcriptionnellement inactifs.

Cette caractéristique agit vraisemblablement comme une « mémoire épigénétique », d'où une certaine plasticité de la cellule souche (Blanco et al. 2020).

Lors de l'activation, très peu de gènes perdent leur état bivalent, c'est en effet au stade de myoblaste que la bivalence sera résolue (Leduc-Gaudet, Guirguis, et Sincennes 2023).

Dans les cellules souches musculaires quiescentes, près de la moitié des gènes présentent la marque permissive H3K4me3, et sont donc prêts à être transcrits (L. Liu et al. 2013) ; en revanche, très peu de gènes possèdent la marque répressive H3K27me3 or lors de l'activation, l'identité et le nombre de gènes portant la marque

H3K4me3 ne varie cependant pas, mais la présence de la marque répressive H3K27me3 est fortement augmentée.

Cette marque épigénétique est corrélée à une augmentation de l'expression de la méthyltransférase EZH2, l'enzyme responsable de la méthylation K27 des histones (L. Liu et al. 2013) ; l'état de la chromatine devient alors moins permissif.

Alors que la marque répressive H3K27me3 permet d'expliquer comment la cellule souche musculaire restreint son potentiel lors de l'activation, l'absence de variation de la marque permissive H3K4me3 durant l'activation suggère que d'autres marques d'histones contribuent à la nécessaire augmentation de l'expression de certains gènes.

Récemment, la modulation du niveau de méthylation des histones (mono, di ou tri méthylées) a montré que des profils de mono ou di-méthylation assuraient une régulation fine de l'expression des gènes (Soares L, et al., Mol Cell, 2017 ; Steiner L et al., JBC 2023).

Contrairement au code histone « classique », la mono-méthylation de H3K27 est identifiée pour des gènes fortement exprimés alors que la tri-méthylation H3K27 est répressive.

Ces actions spécifiques sont espèce-dépendante et associées à des structures différentes du génome, site d'initiation de la transcription pour H3K27me1 (euchromatine) et hétérochromatine pour H3K27me3.

Une augmentation de l'acétylation des histones a été observée lors de l'activation des cellules souches musculaires (Yucel et al. 2019).

Cet accroissement de l'acétylation est corrélé à la transition du métabolisme oxydant vers la glycolyse, un changement qui s'accompagne d'une augmentation de la production d'acétyl-CoA.

La glycolyse transforme en effet le glucose en pyruvate, qui à son tour est métabolisé par le complexe enzymatique PDH pour produire de l'acétyl-CoA ; cet acétyl-CoA sera utilisé exclusivement par la mitochondrie, *via* le cycle du TCA, qui génère du citrate.

Le citrate en excès est ensuite exporté vers le cytosol *via* la navette citrate-pyruvate, où il sera transformé à nouveau en acétyl-CoA qui servira à l'acétylation des histones dans le noyau cellulaire.

L'acétylation des histones, par les HAT, est à l'origine d'un relâchement de la chromatine qui permet aux facteurs de transcription de se lier efficacement à l'ADN pour stimuler la transcription de certains gènes en fonction des besoins de la cellule (Trefely et al. 2020).

D'autres mécanismes épigénétiques pourraient également influencer la transition entre la quiescence et l'activation des cellules souches musculaires comme la méthylation de l'ADN, des modifications des queues d'histones, ou encore l'interaction de la chromatine avec d'autres protéines.

L'importance de ces mécanismes dans l'activation de la cellule souche, de même que leur lien avec le métabolisme, restent à déterminer (Leduc-Gaudet, Guirguis, et Sincennes 2023).

Étant donné que les processus de vieillissement des cellules stromales et de vieillissement de l'organisme semblent être régulés par des mécanismes métaboliques et épigénétiques, il pourrait être possible d'utiliser divers composants de cet axe de régulation pour ralentir le vieillissement des cellules stromales et enfin retarder le vieillissement de l'organisme.

Plusieurs études offrent également la possibilité de vaincre les phénotypes sénescents des cellules souches adultes ou de contrôler le vieillissement de l'organisme par des métabolites et leurs régulateurs épigénétiques associés.

Diverses stratégies de pré-conditionnement sont appliquées à la thérapie par cellules souches afin d'améliorer la capacité antioxydante après l'implantation de MSC.

Mécaniquement, en raison du remodelage métabolique et épigénétique observé lors de la reprogrammation cellulaire, il est possible qu'une reprogrammation partielle induise le rajeunissement des populations de cellules souches et rétablisse le métabolisme cellulaire et la régulation épigénétique dans plusieurs tissus (R. Ren et al. 2017).

Parmi les pré-conditionnements possibles testés récemment sur des MSC humaines :

➤ L'hypoxie

La survie et le fonctionnement des cellules souches dans un environnement hypoxique dépendent de leur changement métabolique contrôlé par HIF et dont la modification post-traductionnelle de la sous-unité alpha dépend de l'hydroxylation qui dépend elle-même du taux en oxygène.

Lorsque l'oxygène intracellulaire diminue, la sous-unité alpha forme un dimère alpha/beta stable car l'hydroxylation ne s'est pas produit.

Ce dimère est transcriptionnellement actif ; il pénètre dans le noyau, se lie aux éléments de réponse à l'hypoxie et initie la transcription des gènes sensibles à l'hypoxie, HIF3- α étant le régulateur négatif de HIF1 et HIF2 (**Figure 51**) (Bahir et al. 2020) :

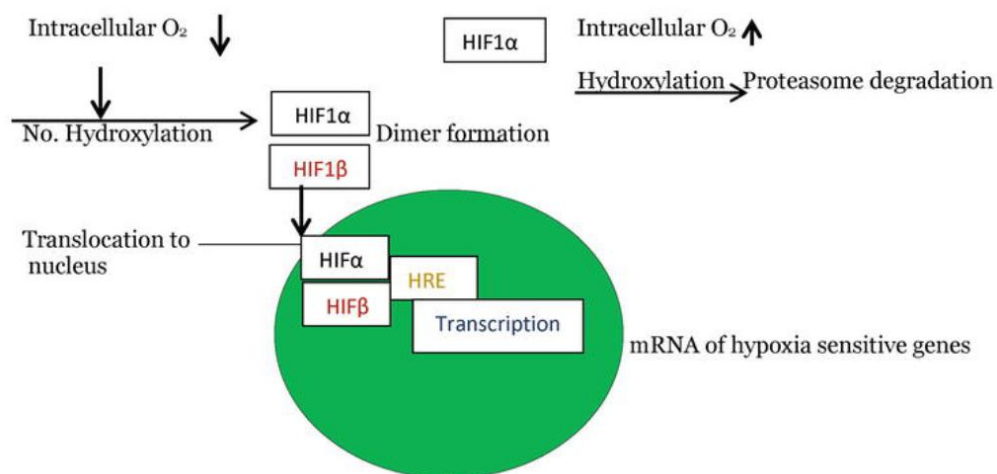


Figure 51 Mécanismes transcriptionnels de HIF1 sous hypoxie (Bahir et al. 2020)

Par ailleurs, le pré conditionnement hypoxique entraîne une régulation positive du NRF2, qui est un facteur de transcription sensible à l'oxydo-réduction impliqué dans la régulation des gènes antioxydants.

Le pré conditionnement hypoxique entraîne une augmentation du métabolisme glycolytique, une diminution de l'activité du cycle TCA et une phosphorylation oxydative.

Ce conditionnement permet de limiter la production de ROS libérés lors de la prolifération et de la différenciation *in vitro* ainsi que dans le

microenvironnement lésé *in vivo* ce qui accroît considérablement les effets thérapeutiques des MSC pour réparer les blessures ; ce mécanisme entraîne par ailleurs par ailleurs une augmentation des niveaux d'enzymes antioxydantes.

Le pré-conditionnement hypoxique augmente ainsi le métabolisme redox entraînant le vieillissement des cellules souches et une diminution de leur prolifération.

Enfin, une étude a montré que les MSC exposées à l'hypoxie sécrétaient des EV qui pouvaient être isolées et utilisées à des fins cliniques ; ces EV sécrétés sous hypoxie étaient enrichis en diverses protéines, ARN non codants (tels que miR-125b-5p, miR-210, miRNA-26a ou lncRNA-UCA1 dont l'expression est accrue dans le cœur), ainsi qu'en facteurs de croissance impliqués dans la modulation et l'amélioration de différents processus biologiques liés à la régénération tissulaire dans différentes pathologies (Pulido-Escribano et al. 2022).

Le pré conditionnement par hypoxie a été proposé comme approche technique pour améliorer le potentiel thérapeutique des MSC.

En culture *in vitro*, les conditions hypoxiques peuvent en effet favoriser la prolifération, la survie et la migration des MSC grâce à diverses réponses cellulaires à la réduction de la tension en oxygène.

En outre, le potentiel de différenciation multilignée des MSC est modifié sous hypoxie, avec des rapports cohérents d'amélioration de la chondrogenèse.

L'hypoxie stimule également les activités paracrines des MSC et augmente la production de sécrétome tant en termes de facteurs solubles que d'EV.

Le sécrétome des MSC préconditionnées sous hypoxie joue un rôle important dans la promotion de la prolifération et de la migration cellulaire, améliorant ainsi l'angiogenèse tout en inhibant l'apoptose et l'inflammation (Yanmeng Yang, Lee, et Yang 2022).

➤ **La mélatonine (MT)**

Il s'agit d'une hormone ayant de nombreuses fonctions biologiques : anti-inflammatoire, agissant sur l'oncostatis, la régulation des rythmes circadien et endocrinien ainsi que l'inhibition des tumeurs.

Les recherches actuelles ont démontré que la MT pouvait réduire la libération de cytokines inflammatoires, améliorer la capacité de prolifération des MSC et éliminer l'apoptose des MSC *in vitro* et *in vivo*.

La MT devient progressivement un agent attractif pour la régénération de divers organes ou tissus, en régulant l'expression des gènes générateurs de ROS et ceux des antioxydants en tant qu'événements en amont de ses mécanismes protecteurs et anti-apoptotiques des MSC (Baranowska et al. 2023).

En plus de l'interaction avec les facteurs de croissance dérivés des MSC, l'interaction de la MT avec des biomatériaux peut améliorer considérablement les effets thérapeutiques de la médecine régénérative (Figure 52) (Hu et Li 2019b) :

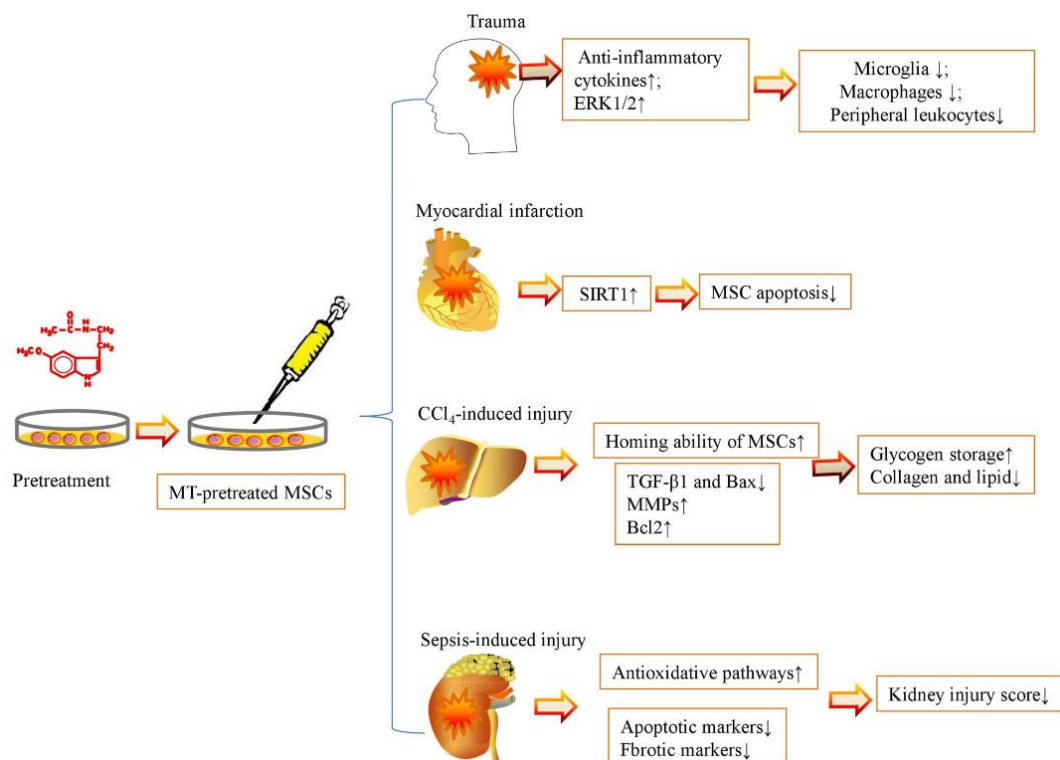


Figure 52 Action bénéfique de la MT sur l'action de réparation des MSC dans différents organes (Hu et Li 2019b)

Une fois la concentration optimale et le moment d'administration optimal déterminés, les effets protecteurs de la MT sur les MSC pourraient être améliorés.

Il convient cependant de noter que des concentrations élevées de MT peuvent nuire à la stabilité épigénétique et génétique des MSC (Hu et Li 2019b).

➤ **Le resvératrol (RSV)**

Cette molécule pourrait améliorer les effets thérapeutiques des MSC en améliorant leur survie, leur auto-renouvellement, leur engagement dans la lignée et leur effet anti-âge.

L'augmentation de l'activité de *Sirt1*, en alimentant des souris avec du resvératrol, activateur de *Sirt1*, induit la biogenèse mitochondriale musculaire et améliore les performances physiques, suggérant un rôle important de *Sirt1* pour la fonction mitochondriale *in vivo* (Lagouge et al. 2006).

Le RSV peut également activer l'AMPK (Dasgupta et Milbrandt 2007) et inhiber efficacement la génération de ROS et d'espèces réactives de l'azote (RNS) principalement grâce à des effets synergiques entre le groupe 4-hydroxyle, le groupe 3-hydroxyle et le groupe 5-hydroxyle (Hu et Li 2019a).

Ainsi cette molécule pourrait améliorer considérablement les effets préventifs et thérapeutiques des MSC contre plusieurs maladies par des mécanismes sous-jacents sur la survie, l'auto-renouvellement et l'engagement de la lignée des MSC *in vitro* et *in vivo* (**Figure 53**) (Hu et Li 2019a) :

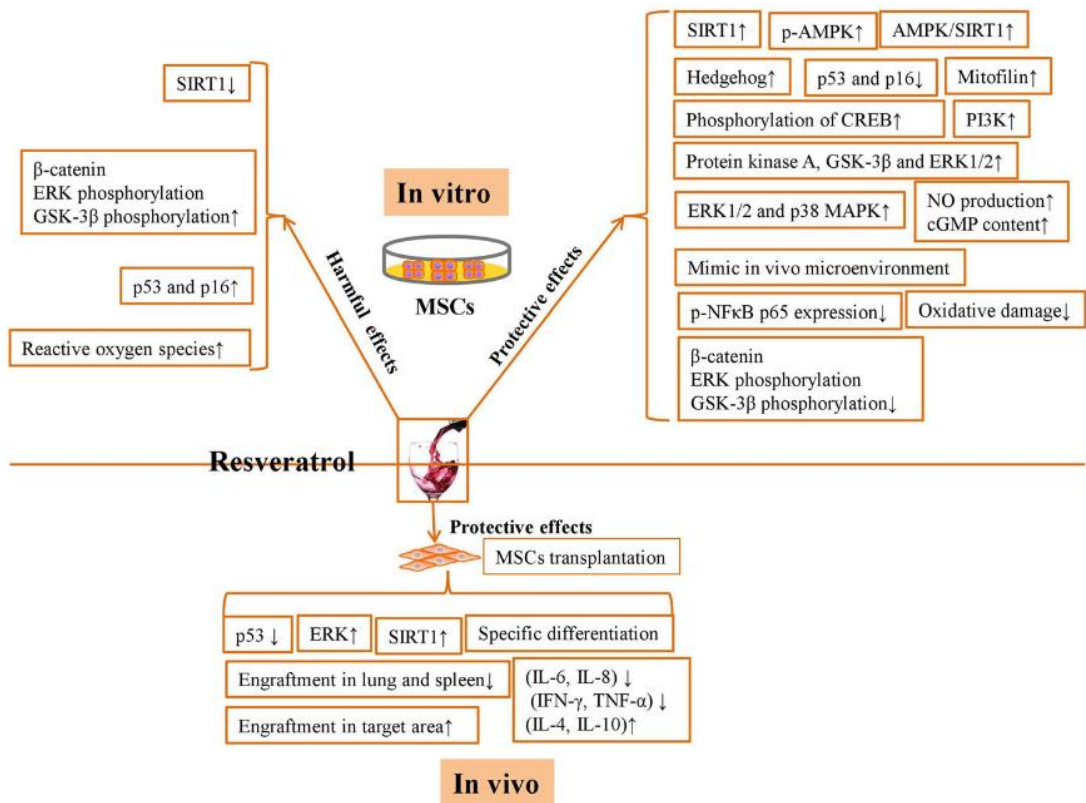


Figure 53 Mécanismes sous-jacent aux effets protecteurs du RSV sur les MSC (Hu et Li 2019a)

OBJECTIF SCIENTIFIQUE

La thérapie cellulaire pour l'insuffisance cardiaque est une approche prometteuse qui vise à réparer les tissus cardiaques endommagés et à améliorer la fonction cardiaque. L'un des types de cellules souches les plus couramment utilisés sont les MSC issues de moelle osseuse (bmMSC) transplantées dans le cœur (Kalou, Al-Khani, et Haider 2023).

Plusieurs études ont montré que les bmMSC pouvaient favoriser l'angiogenèse et sécréter des facteurs de croissance et des cytokines afin de réduire l'inflammation conduisant à une réduction de la fibrose cardiaque (Jimenez-Puerta et al. 2020; Huizhu Chen et al. 2016).

Les bmMSC ont également la capacité de se différencier en différents types de cellules et leur devenir est déterminé par l'équilibre entre le métabolisme énergétique et les modifications épigénétiques.

Comme le statut différencié est caractérisé par une régulation positive du métabolisme oxydatif et une régulation négative de la glycolyse, un faible nombre de mitochondries et un potentiel de membrane mitochondriale interne ($\Delta\psi_m$) réduit peuvent expliquer le métabolisme glycolytique et la conservation du caractère souche.

En 2016, *Sukumar, M. et al.*, (Sukumar et al. 2016) ont montré qu'il était possible de sélectionner des cellules en se basant sur leur métabolisme par l'utilisation du *tri-ethyl-rhodamine methyl ester* (TMRM), un fluorochrome utilisé pour trier les cellules souches en fonction de leur $\Delta\psi_m$.

Notre équipe a montré que les MSC cardiaques, triées selon leur statut TMRM lié à leur statut métabolique présentaient une capacité de régénération et/ou de survie à long terme différentes (Gambini et al. 2020).

Les cellules à faible TMRM avaient un potentiel d'auto-renouvellement plus important et des caractéristiques plus indifférenciées que les cellules à fort potentiel de membrane, suggérant une amélioration possible de leur survie dans les zones hypoxiques.

Nous émettons alors comme hypothèse, en accord avec les travaux de *Gambini, E. et al.*, (Gambini et al. 2020) qu'il y aurait une augmentation des caractères souches des bmMSC conditionnées vers un statut glycolytique, c'est-à-dire une augmentation de leurs capacités de régénération grâce à leurs propriétés d'immunomodulation, de leur prolifération, de leur migration et résistance à un stress oxydant.

En conséquence, une injection de ces cellules dans les zones hypoxiques du cœur chez des patients atteints d'insuffisance cardiaque serait un modèle de thérapie cellulaire qui permettrait une amélioration des capacités cardiovasculaires en augmentant la prolifération des cardiomyocytes et la fraction d'éjection ventriculaire gauche et en diminuant la fibrose cardiaque.

Nous avons soulevé l'interdépendance existant entre le métabolisme énergétique et l'épigénétique pouvant influencer sur le maintien d'un statut favorable des bmMSC *in vivo*.

Les changements épigénétiques, tels que la méthylation de l'ADN, la modification des histones et l'expression de l'ARN non codant, peuvent influencer l'expression des gènes et, à terme, affecter l'état métabolique des MSC. Ainsi, l'inhibition des ADN méthyltransférases peut entraîner une régulation positive des gènes impliqués dans le métabolisme du glucose (R. Ren et al. 2017).

Concernant les modifications des histones, des niveaux de méthylation décroissants entraîne un taux croissant du métabolisme du glucose, tandis que les histones désacétylases affectent l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides (K. Wang et al. 2022; Yang Yang et al. 2022).

D'autres études encore ont montré que certaines enzymes responsables de la régulation épigénétique, telles que les HDAC et les LSD, jouaient un rôle essentiel dans la différenciation des MSC (X.-Y. Yu et al. 2012).

Ces modifications épigénétiques altèrent la structure de l'accessibilité de l'ADN en utilisant des enzymes qui modifient les histones et l'ADN *via* des substrats métaboliques ou des cofacteurs qui sont des intermédiaires du métabolisme cellulaire (Etchegaray et Mostoslavsky 2016).

Parmi ces enzymes, les HDM, nécessitent de l' α -cétoglutarate et du FAD qui sont fournis par le cycle de Krebs ainsi que de l' O_2 pour fonctionner et enlèvent des

groupements méthyles présents sur les lysines des histones. Cela conduit à des structures mono et di-méthylés de la lysine 4 de l'histone H3 ayant un effet activateur sur l'expression des gènes, mais répresseur lors de la mono et di-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 ou de la lysine 27.

De ce fait, il est possible d'imaginer qu'une modification des marques épigénétiques induite par ces enzymes puisse moduler l'expression des gènes et orienter une cellule vers un métabolisme particulier (Pouikli et Tessarz 2021; Wu et al. 2023).

C'est pourquoi, nous avons eu comme objectif d'utiliser et de sélectionner des inhibiteurs des enzymes épigénétiques afin d'orienter et de conditionner les bmMSC vers un métabolisme glycolytique et de comparer ce type de conditionnement avec le tri métabolique des bmMSC sur leur statut TMRM ; nous avons ainsi testé :

- Le GSK-LSD1 qui inhibe spécifiquement LSD1,
- La Decitabine et l'Azacitidine qui inhibent les méthyltransférases de l'ADN,
- La Trichostatine A qui inhibe les histones désacétylases.

Parmi ces inhibiteurs, LSD1 régule l'activité de DNMT1 mais également celle de certains substrats non-histones, notamment p53, STAT3 et E2F1.

Il a été démontré que l'inhibition de l'enzyme LSD1 améliorerait la fonction métabolique dans les MSC, entraînant une augmentation de l'absorption du glucose et de la biogenèse mitochondriale dans les MSC (Guénantin et al. 2021).

Huo et al., ont également montré que le traitement avec un inhibiteur du LSD1 augmentait le nombre et la fonction des MSC dans un modèle d'insuffisance cardiaque chez le rat (Huo et al. 2021).

Cette inhibition conduisant à une amélioration de la fonction cardiaque et à une réduction de la fibrose, fournit des preuves supplémentaires de l'utilisation thérapeutique potentielle d'inhibiteurs de LSD1 dans le traitement de l'insuffisance cardiaque.

En utilisant des approches fonctionnelles, épigénétiques et d'expression génique, nous souhaitons démontrer que les bmMSC sélectionnées pour leur métabolisme glycolytique présenteraient un avantage prolifératif et une résistance au stress oxydatif favorisant la greffe cellulaire dans le cadre des thérapies cardiovasculaires régénératives.

RÉSULTATS

METABOLIC CONDITIONING ENHANCES HUMAN
BMSC CELL THERAPY OF DOXORUBICIN-INDUCED
HEART FAILURE

Metabolic conditioning enhances human bmMSC cell therapy of doxorubicin-induced heart failure

Jacques V^{*1,2,3}, Benaouadi S^{*1,2}, Descamps JG⁴, Reina N^{5,6}, Espagnol N⁴, Boudet A^{1,2}, Pinto C^{1,2}, Farge T^{*1,2,3}, Savagner F^{*1,2,3}

1 : Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, 31062 TOULOUSE, France

2 : Inserm UMR 1297 (Team 9), I2MC, 1 avenue J Poulhes, 31400 TOULOUSE, France

3 : Biochemistry Laboratory, 330 avenue de Grande Bretagne, CHU, 31059 TOULOUSE, France

4 : RESTORE, Université de Toulouse, EFS Occitanie, INP-ENVT, Inserm U1031, France.

5 : Department of Orthopedic Surgery, Hôpital Pierre-Paul-Riquet, CHU de Toulouse, 31059 Toulouse cedex 9

6 : AMIS Laboratory - Laboratoire Anthropologie Moléculaire et Imagerie de Synthèse, Université de Toulouse, UMR 5288 CNRS, UPS, 37 allées Jules Guesde 31000, Toulouse

Corresponding Author: Frédérique Savagner; ORCID Number: 0000-0002-1965-8836.

Address: Inserm UMR 1297 (Team 9), I2MC, 1, avenue Jean Poulhès, 31400 TOULOUSE, France.

Fax: +33 (0)5 67 69 03 77.

Telephone: +33 (05) 67 69 03 75.

Email: frederique.savagner@inserm.fr

Abstract

The therapeutic potential of bone marrow mesenchymal stromal cells (bmMSCs) to address heart failure needs improvement for better engraftment and survival. This study explores the role of metabolic sorting for human bmMSCs on coculture *in vitro* and on doxorubicin-induced heart failure mice models. Using functional, epigenetic and gene expression approaches on cells sorted for mitochondrial membrane potential in terms of their metabolic status, we demonstrated that bmMSCs selected for their glycolytic metabolism presented proliferative advantage and resistance to oxidative stress thereby favoring cell engraftment. Therapeutic use of glycolytic bmMSCs rescued left ventricular ejection fraction and decreased fibrosis in mice models of acute heart failure. Metabolic changes were also related to epigenetic histone modifications as lysine methylation. By targeting LSD1 (lysine-specific demethylase 1) as a conditioning agent to enhance the metabolic profile of bmMSCs, we deciphered the interplay between glycolysis and bmMSC functionality. Our study led to the elucidation of novel strategies for optimizing bmMSC-based treatments to manage heart failure and highlight the metabolic properties of bmMSCs as a promising target producing more effective cardiovascular regenerative therapies.

Introduction

Cell therapy for heart failure is a promising approach that aims to repair damaged heart tissue and improve heart function. One of the most commonly used types of stem cells are mesenchymal stromal cells derived from the patient's own bone marrow (bmMSCs) which are then transplanted into the heart (Kalou, Al-Khani, et Haider 2023). Several studies have demonstrated that they can promote angiogenesis and secrete growth factors and cytokines to reduce inflammation, bringing about a reduction in cardiac fibrosis (Huizhu Chen et al. 2016; Guo et al. 2020). BmMSCs have also the ability to differentiate into various cell types and their fate is determined by the balance between energy metabolism and epigenetic modifications. As differentiate status is characterized by oxidative phosphorylation (OXPHOS) upregulation and glycolysis downregulation, low mitochondrial number and reduced inner mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) can potentially explain glycolytic metabolism and stemness. Recently, we have found that cardiac MSC sorted by TMRM, a fluorescent dye used to sort stem cells based on their $\Delta\psi_m$, could be related to metabolic status, regenerative capacity and/or long-term survival (Gambini et al. 2020).

Different strategies for preconditioning MSCs to expand their therapeutic potential have been proposed (Ferreira et al. 2018; Kahrizi et al. 2023). Hypoxia, melatonin or angiotensin II pretreatments have been tested on MSCs of different origin to reduce oxidative stress and to adapt to external environments as low oxygen level stem cell niches [7-9]. The positive effect of these treatments, which act by increasing angiogenesis, cell proliferation and reducing inflammation but with different results between animal studies and clinical trials, raises the question of better identification of the initial key regulators of MSC adaptation in a hostile environment. Unlike some cell types that predominantly rely on oxidative phosphorylation for energy production, MSCs possess a robust glycolytic machinery and metabolic flexibility to ensure viability and facilitate efficient secretion of paracrine factors, cytokines and extracellular

vesicles. In a previous study (Gambini et al. 2020), we revealed that selecting MSCs based on their metabolic status is an effective strategy to promote survival, migration and cell fate decision needing to focus on regulatory pathways involved in MSC metabolic switch.

Epigenetic changes, such as DNA methylation, histone modification and non-coding RNA expression, can influence gene expression and ultimately affect the metabolic state of MSCs. Studies have conveyed that alterations in the epigenetic landscape of MSCs can lead to changes in their metabolism, including the regulation of glucose and lipid metabolism (R. Ren et al. 2017). Consequently, the inhibition of DNA methyltransferases can result in the upregulation of genes involved in glucose metabolism. With regard to histone modifications, decreased levels of methylation cause a high rate of glucose metabolism whereas histone deacetylases affect the expression of genes involved in lipid metabolism (K. Wang et al. 2022; Yang Yang et al. 2022). Recent studies have evinced that some enzymes responsible for epigenetic regulation, such as histone deacetylases (HDACs) and lysine-specific demethylases (LSDs), play a critical role in the differentiation of MSCs (X.-Y. Yu et al. 2012). Inhibition of the LSD1 enzyme has been shown to improve metabolic function in MSCs, giving rise to increased glucose uptake and mitochondrial biogenesis in MSCs (Guénantin et al. 2021). This inhibition improved cellular energy metabolism and cardiac function, reduced fibrosis and enhanced the therapeutic potential of MSCs in the treatment of heart failure (Huo et al. 2021). Understanding the epigenetic regulation of energy metabolism in MSCs can provide insights into the mechanisms underlying their differentiation and may have implications for the development of therapies to address metabolic disorders.

Our findings suggest that metabolic sorting led to the identification of cells with higher regenerative capacity and long-term survival in close relationship with epigenetic changes.

Material and methods

Cells and treatments

Human bmMSCs were obtained from healthy bone marrow by culturing cells through a collaboration with Occitanie Blood Bank and prepared as previously described (Uzielienė et al. 2019). Cells were incubated at 37°C and 5% CO₂ in Endothelial Growth Medium-2 (EGM2, PromoCell, Germany) supplemented with ASP after adherence. At 70% of confluence, the cells were detached using trypsin EDTA (Thermo Fisher, France) and incubated either at 37°C for 30 minutes with 200 nM tetramethylrhodamine (TMRM) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; #9082,) or treated with epigenetic drugs. After cell resuspension in PBS with 1% FBS and 0.5 mM EDTA, cells were sorted using a BD Influx Cell Sorter (BD Biosciences, Franklin, NJ, USA) to identify and separate high TMRM from low TMRM subpopulations. Sorting setup, based on the scatter and fluorescent parameters as well as appropriate gating to exclude dead and double cells, was established using unlabeled cells. Epigenetic drugs such as decitabine (DNMTi, HY-A0004), trichostatin (HDACi, HY-15144) and GSK-LSD1 (HMDi, HY-18632), all from MedChemTronica (Sollentuna, Sweden), were applied at different concentrations on bmMSCs over 48 hours. Concentration ranges were between 10 to 100 nM for decitabine, 25 to 250 nM for trichostatin and 50 to 200 nM for GSK-LSD1. For coculture studies, 5,000 H9C2 rat myoblast cells were cultured

in DMEM medium supplemented with 1.5 g/L sodium bicarbonate, 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ with either 5,000 low or high TMRM bmMSCs under normoxic (20% oxygen) or hypoxic (1% oxygen) conditions. Cell numbering was carried out in a Malassez counting chamber for proliferation analysis.

FACS Analysis, phenotyping and sorting

Immunophenotypic characterization of bmMSCs was performed using cell surface clusters CD73, CD90, CD105, CD45, CD34 and CD31 (all from BioLegend, San Diego, CA, USA) according to the International Society for Cellular Therapy as previously described (Menard et al. 2013). Data (5,000 events) were collected using a flow cytometer BD LSRFortessa Cell Analyzer (BD Biosciences, Franklin, NJ, USA) and FlowJo v10.8 software (BD Biosciences). The data were analyzed excluding non-viable cells and gating out isotype controls. To study TMRM transition, human bmMSCs were incubated at 37°C for 30 minutes with 200 nM TMRM, then detached and analyzed on BD FACS to identify high and low TMRM cells.

Seahorse Extracellular Flux (XF) Cell Mito Stress Test and Glycolysis Test

Mitochondrial function and glycolysis were evaluated using Seahorse XFe24 Flux Analyzer (Agilent, Santa Clara, CA, USA) by measuring oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR). Sorted or treated bmMSCs were seeded on the Seahorse microplate at a density of 5×10^4 cells per well in DMEM supplemented with L-glutamine (2 mM), sodium pyruvate (1 mM) and glucose (10 mM), pH 7.4 for the Mitostress Test and with L-glutamine 2 mM for the Glycolysis Stress Test. To further define the role of mitochondrial respiration and glycolysis in cell metabolism, the compounds oligomycin (1 µM), carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP, 2 µM) and a mixture of rotenone and antimycin A (RAA, 1 µM) were serially injected to measure basal and maximal OCR. Glucose (10 mM), oligomycin (1 µM) and 2-deoxy-glucose (50 mM) were sequentially injected to measure ECAR. All reagents came from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MI, USA).

ROS assay

ROS was measured using MitoSox Green method (Thermo Fisher Scientific). Low and high TMRM cells were washed with HBSS (Sigma-Aldrich) and incubated with 500 nM MitoSox Green for 20 minutes in the dark at 37°C under 5% CO₂. The relative fluorescence intensity representing the intracellular generation of ROS was explored on a LSRFortessa Cell Analyzer at excitation and emission wavelengths of 488-nm and 510-nm respectively using FlowJo v10.8 software (BD Biosciences).

Mitochondrial DNA Quantification

Total DNA was extracted from human bmMSCs using DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Quantitative PCR (qPCR) was performed with SYBR Premix Ex Taq (Tli RNase H Plus; Takara, Dalian, China). Standard curves were established using primers as previously described and serial dilutions of the NADH dehydrogenase subunit 5 gene (ND5, mitochondrial genome), and β2-microglobulin (B2M, nuclear genome) to calculate absolute copy numbers ((Gambini et al. 2020) and Supplementary Table S1). Data were expressed as mitochondrial DNA (mtDNA) to nuclear DNA (nDNA) ratio for each sample.

Mitochondrial Network / Dynamics

Functional status of mitochondria was evaluated by MitoTracker Red CMXRos (Thermo Fisher Scientific; # M7512) dye, depending on the mitochondrial membrane potential of living cells. BmMSCs were seeded in Nunc Lab-Tek chamber slides (Thermo Fisher Scientific) at a concentration of 5.0×10^4 /well in 500 μ L culture medium, incubated overnight at 37°C and then for 30 minutes with the MitoTracker Red CMXRos at a final concentration of 200 nM in serum-free medium. After cell fixing in 4% formaldehyde, the fluorescent dye 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (Sigma-Aldrich; #10236276001) was applied for 6 minutes (dilution 1:20). Fluorescence of mitochondrial dye was imaged using a Zeiss LSM 780 confocal laser scanning microscope (Zeiss, Baden-Wurtemberg, Germany) and quantitative analyses were performed using NIH ImageJ software (C. A. Schneider, Rasband, et Eliceiri 2012), expressed as percent fluorescence intensity. Mitochondrial morphology and network analysis were explored using the MiNA macro plugin tool on segmented images opened in Image-J as previously stated (Valente et al. 2017).

RNAseq and Gene Expression Analysis

RNASeq

We generated strand-specific RNA libraries from 1 μ g purified RNA using the TruSeq Stranded Total RNA plus Ribo-Zero Kit (Illumina, San Diego, CA, USA). The sequencing was performed at the Genomics and Bioinformatics Core of the I2MC Institute in Toulouse, France. Single end reads per sample were obtained using the HiSeq 2500 platform from Illumina. Reads were first trimmed using Cutadapt to remove the 3'-end adapters and trailing sequences, followed by aligning to human RefSeq mRNAs using TopHat2 (D. Kim et al. 2013). Gene ontology (GO) annotation was carried out using the GOrilla web-based application (Eden et al. 2009). GSEA (gene set enrichment analysis) was conducted using the open source GSEA v.4.0.0 program from the BROAD Institute (<http://www.broadinstitute.org/gsea>) to identify set of genes with concordant differences between low and high TMRM cells. Raw and transformed data are referred to on the GEO database as 251709.

Gene expression

Specific gene expression was assessed *via* quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR). Total RNA was isolated using ReliaPrep RNA Cell Miniprep System (Promega Madison, WI, USA; # Z6012) and cDNA prepared with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific); qRT-PCR was performed using SYBR Premix Ex Taq (Tli RNase H Plus; Takara) in 10 μ L final volume on a StepOne Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). Cyclophilin A (*PPIA*) was used as reference and primers sequence for qRT-PCR, always encompassing two exons for each gene, are described in Supplementary Table S1. Under basal conditions, we evaluated the expression of stem cell markers (*MDR-1*, *MYC*, *NANOG1*) as well as adipogenic (*PPARGC1A*), osteogenic (*RUNX-2*) and smooth muscle markers (*ACTA2*, α -*SMA*). Regenerative capacity of MSC cells were tested by measuring expression of *PDGF* and *TIMP1* genes as previously described (Gambini et al. 2020). The expression of selected genes involved in mitochondrial dynamics (*MFN2*, *FIS1*, *KIF5B*, *Dynein*) and senescence (*CDKN1A*, *CDKN1B*) were also

explored. Gene expression was calculated with the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method and referred to the low TMRM expression ratio.

ChIP-qPCR analysis

ChIP was performed as previously described using the CUT&RUN Assay Kit (Cell Signaling, Danvers, MA, USA; #86652) (Skene et Henikoff 2017). In brief, 100,000 of low and high TMRM bmMSCs were harvested and washed with wash buffer (20 mM HEPES pH7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM spermidine and protease inhibitor cocktail), then 10 μ l pre-washed Concanavalin A coated beads in binding buffer (20 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 1 mM CaCl₂ and 1 mM MnCl₂) were added per sample. Samples were incubated for 10 minutes at room temperature. Beads-bound nuclei were incubated with 1:50 H3K4me1 antibody for 2 hours at 4°C. After washing with Dig-wash buffer, 50 μ l pAG-MNase was added and rotated at 4°C for 1 hour. Beads were washed twice with Dig-wash buffer and put into wet ice, mixed with 2 μ l 100 mM CaCl₂ and incubated for 30 minutes. Digestion was stopped with 2 \times stop buffer (340 mM NaCl, 20 mM EDTA, 4 mM EGTA, 0.02% digitonin, 0.05 mg/ml glycogen and 2 pg/ml heterologous spike-in yeast DNA) and incubated at 37°C for 10 minutes to release fragmented DNA. DNA was purified using DNA purification and column kit (Cell Signaling Cat.; #14209) according to the manufacturer's recommendations. Diluted ChIP products were used for qPCR to analyze the relative enrichments. Gene expression was calculated with the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method and positive (*GAPDH*) and negative (*SAT2*) control genes using primers are referenced in Supplemental Table 1.

Colony and Scratch assay

Human bmMSCs were plated in growth medium on a 96-well plate, one cell by well, using BD Influx Cell Sorter (BD Biosciences). The medium was changed two times per week. After 10 days, cells were stained with DAPI (Sigma-Aldrich; #10236276001, 1:20) for 20 minutes at room temperature and the presence of colonies was analyzed using Axiovert 40C Microscope supplied with AxioCam 503 (Zeiss). Clones and single cell counting were normalized to total cell number.

Scratch assay was performed to evaluate cell migration capacity. Human bmMSCs were seeded into T25 flasks and grown to full confluence. Later, a straight scratch of the cell monolayer was executed with a 1 mL pipet tip. The cell scratch was photographed under a phase-contrast microscope at 0, 8, 24, and 48 hours and cell migration abilities (as the size of area of migrated cells inside the scratch) were evaluated visually using the same magnification in the same location throughout the experience. Three technical replicates were used for each donor.

Cell proliferation and apoptosis assays (γ H2AX)

For the 2D-transwell proliferation assay, H9C2 cardiomyoblasts were cultured in 6-well plates at 5×10^4 cells per well and exposed to 5×10^4 treated bmMSCs in 0.4 μ m pore size transwell inserts during 7 days under normoxic or hypoxic conditions. Cells were counted by automated imaging and quantitative analysis into an Incucyte Zoom system (Sartorius, Göttingen, Germany). For γ H2AX foci staining, treated and control bmMSCs were grown on glass coverslips, fixed with 4% buffered paraformaldehyde (PFA) for 15 minutes at room temperature and permeabilized in PBS containing 0.5% Triton X-100 for 8 minutes. Cells were then incubated with 1:500 diluted polyclonal anti- γ H2AX antibody (Cell Signaling; # 9718S) for 45 minutes at room temperature and detected with a secondary Alexa 488–conjugated goat anti-rabbit IgG (Thermo Fisher

Scientific; #A11008). Coverslips were finally mounted in Vectashield medium (H-1500; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) with DAPI. At least 30 cells were analyzed on an Axio Observer 7 Microscope (Zeiss) using NIH ImageJ software for quantification.

Western Blot analysis

Human bmMSCs were lysed and treated with protease and phosphatase inhibitor cocktails to extract total proteins. After quantification with DC protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), proteins were run on SDS-PAGE gel (NuPAGE precast 4-12%; Thermo Fisher Scientific, MA, USA) and transferred to a Trans-Blot[®] TurboTM nitrocellulose membrane with Trans-Blot[®] TurboTM transfer system (Bio-Rad). Membranes were blocked for 1 hour at room temperature with 5% nonfat dry milk (ChemCruz, Huissen, Netherlands) in PBS containing 0.05% Tween[®] 20 (Sigma-Aldrich) and then incubated with the appropriate primary antibody overnight at 4°C. Primary antibodies used were: monomethyl H3K4 (#9723), monomethyl H3K27 (#7693) and H2B (#12364) at 1:500 dilution, all from Cell Signaling. After PBS containing 0.05% Tween[®] 20 (Sigma-Aldrich) washes, membranes were incubated with the appropriate HRP-conjugated secondary antibody for 1 hour at room temperature. Blots were quantified on a ChemiDoc imaging system (Bio-Rad) using the previously described protocol (Gambini et al. 2020) and normalized by H2B protein expression.

For γ H2Ax western blot analysis on mice tissue, proteins from frozen heart ventricular apex were extracted using a FastPrep-24 instrument (MP Biomedical, Santa Ana, CA, USA) following the manufacturer's recommendations. Membranes were incubated with a polyclonal γ H2Ax antibody (Cell Signaling; # 9718S) and referred to Rho-GDI antibody (Cell Signaling; # 2564S) for quantification as reported in the previous paragraph.

Animal model and bmMSC transplantation

Experiments were performed on C57Bl/6 mice treated with a single intraperitoneal injection of doxorubicin (15 mg/Kg) to induce heart failure. In all experiments, 5 mice were used per group: untreated, treated with low TMRM cells and treated with high TMRM cells (800,000 cells per mouse). Sorted cells were administrated intravenously 7 hours after doxorubicin treatment. Animals were sacrificed after 28 days to harvest hearts for histological procedures.

Cardiac function was evaluated *via* non-invasive echocardiography. Echocardiography was carried out on lightly anaesthetized (1% isoflurane in air) mice placed on a heating pad. The left ventricular dimensions were obtained during Time Movement mode acquisition from the parasternal short-axis view at the midventricular level using a Vevo2100 echograph and a 40 MHz transducer (M550; Fujifilm Visualsonics, Tokyo, Japan). Images were analyzed off line with Vevolab software (Fujifilm Visualsonics).

Histological procedures

Hearts were divided into two sections. The apex was flash frozen in liquid nitrogen for protein expression measurements. The center section of the heart was slowly frozen in OCT (VWR, Radnor, PA, USA; #361603E) using an -80°C isopropanol bath. Briefly, hearts were transversely sectioned using a cryotome (Thermo NX50; Thermo Fisher

Scientific) rinsed quickly in 1 change of acetic acid solution prior to mounting in 95% alcohol with 2 changes in HistoClear solution (Sigma-Aldrich) followed by mounting in synthetic resin. Slides were fixed in 4% PFA in 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.4 for 10 minutes before staining. Picrosirius red staining was performed to detect fibrosis according to the protocol of Junqueira *et al.* (Junqueira, Bignolas, et Brentani 1979). Cross sectional area (CSA) was accessed with WGA-FITC (Thermo Fisher Scientific; #W11261) at 5 µg/ml for 10 minutes at room temperature to visualize cell membrane as referred (Emde et al. 2014). Myocyte cell surface area and total fibrotic area were quantified by using NIH ImageJ software after scanning on a NanoZoomer (Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan).

Statistical analysis

Statistical analyses among different groups were performed with GraphPad Prism 9. Comparisons between the two groups were made using unpaired Student t test with unequal variances assumed while multiple group comparisons were carried out by 2-way ANOVA or linear regression analysis. Data are presented as mean ± SEM; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Results

Metabolic and gene expression profiles after cell sorting

After bone marrow isolation from human adults and first expansion, isolation of cells with low and high TMRM staining took place by fluorescence activating cell sorting (FACS) and the two population of cells were evaluated (Figure 1A). Immediately after sorting, the gated high TMRM and low TMRM populations were analyzed by FACS to assess differences in the expression of mesenchymal stem cells and endothelial markers. The results demonstrated that these two populations were phenotypically indistinguishable with positive marker staining for CD 73, 90 and 105 and negative staining for CD 31, 34 and 45 (Supplemental Figure 1).

The bioenergetic profile (Figures 1B and 1C) showed that high TMRM cells had significantly greater levels of basal and maximal respiration in relation to considerably higher mitochondrial mass ($n = 8$, $1.8 \cdot 10^4 \pm 0.9$ low TMRM vs. $4.1 \cdot 10^4 \pm 1.3$ high TMRM; $p < 0.001$) and mitochondrial DNA copies ($n = 14$, mtDNA/nDNA ratio 180 ± 98 low TMRM vs. 372 ± 142 high TMRM; $p < 0.05$) (Figures 1D and 1E). Differences in mtDNA/nDNA ratio were related to mitochondrial density reflecting variation in mitochondrial biogenesis and not just in mtDNA copy number per mitochondria. On the contrary, the glycolysis test showed that low TMRM cells presented a significantly 2-fold higher level of extracellular acidification rate (ECAR) as an indicator of glycolysis metabolism (Figures 1F and 1G). In terms of energy phenotype, high TMRM cells were more oxidative than low ones which were more glycolytic.

Finally, the regenerative capacity of metabolic sorted bmMSCs was explored by measuring the gene expression of *TIMP-1* related to trophic factor and *PDGFB* related to VEGF-induced angiogenesis (Nie, Zhang, et Wang 2020). We conveyed that low TMRM cells presenting a more glycolytic phenotype were able to ensure better regenerative capacity ($n = 7$, *PDGFB* relative expression 1.6-fold increased for low TMRM compared to high TMRM; $p < 0.01$) associated with lower growth and

differentiation control ($n=7$, *TIMP1* relative expression 1.3-fold decrease compared to high TMRM $p < 0.001$) (Figures 1H and 1I).

RNAseq analyses reveal epigenetic targets controlling metabolism

We started by investigating global transcriptomic changes related to glycolytic or oxidative metabolism of bmMSCs. Differential expression analysis of pairwise comparison identified 799 differentially expressed genes (DEGs) with fold discovery rate (FDR) < 0.05 related to 4 clusters (Figure 2A). Volcano plot for the DEG at FDR < 0.05 with an absolute value of \log_2 Fold change ≥ 1 identified 407 genes upregulated in high TMRM cells and 392 genes upregulated in low TMRM cells that were used for functional analysis (Figure 2B).

Focusing on functional enrichment for low TMRM cells, we performed GO analysis using GOrilla based on biological process (Eden et al. 2009). Most highly significant upregulated genes in low TMRM populations were correlated with cell proliferation (Figure 2C; $p < 0.001$) while substantial enrichments were related to epigenetic modifications and response to DNA damage for other clusters of upregulated genes in low TMRM cells (Figures 2D and 2E). We were not able to identify a significant upregulated expression for genes involved in the oxidative metabolism of high TMRM cells, suggesting that the significant changes we observed for functional metabolic profiles should also be linked to post-transcriptomic regulations (Supplemental Figure 2).

Mitochondrial dynamics are closely related to changes in cell metabolism

RNA-seq analysis of eight low TMRM and high TMRM cells revealed differential changes in mitochondrial distribution throughout the cytoplasm (Figure 3A; $p=0.03$). To evaluate the mitochondrial dynamics, MitoTracker Red CMXRos was used as a red fluorescent dye that accumulates in living cells with functional mitochondria. The mitochondrial network was well defined at the perinuclear level of the low TMRM cells while fluorescence was more diffusely stained throughout the cytoplasm for the high counterparts (Supplemental Figures S3 and film for mitochondrial movement speed measurement). Using the Fiji macro tool MiNA, we were able to explore the dynamic nature of mitochondria in both sorted cells. While fragmented mitochondria are mainly represented in high TMRM cells (2.1-fold increase compared to low cells; $p < 0.05$), fused mitochondria are significantly associated with low TMRM cells (2.3-fold compared to high cells; $p < 0.05$) (Figures 3B and 3C) even though fused mitochondria have been previously associated with cell survival mechanisms (Rambold et al. 2011). Changes in mitochondrial network structure were related to considerably higher length and speed along microtubule networks for high TMRM cells (Figures 3D and 3E; $p < 0.05$) and higher expression of motor *KIF5B* (kinesin1) and *DYNEIN* genes (Figures 3E and 3F; 1.8-fold and 1.35-fold increase respectively; $p < 0.05$) while fusion/fission process was unchanged in relation to *MFN2* and *FIS1* gene expression (Figures 3H to 3I). Consequently, compacting mitochondria in the perinuclear area for low TMRM cells was related to short length but a highly structured network suggesting the existence of cell survival mechanisms while distribution through the entire cytoplasm for high TMRM cells was linked with longer length but a less dense network allowing faster movement of mitochondria to change cell fate.

Epigenetic methylation is involved in mitochondrial metabolism and cell differentiation

RNA-seq analysis of eight low TMRM and high TMRM cells demonstrated highly differential changes in epigenetic markers, especially for methyl transferase activity (Figures 4A & 4B; $p < 0.001$) which we confirmed using ChIP-H3K4 and recovery rate for the positively GAPDH methylated gene compared to non-methylated reference (Figure 4C). We explored different epigenetic modifiers for histone methylation, acetylation and DNA methylation using GSK-LSD1 (GSK), decitabine (DAC) and trichostatin (TRI) drugs respectively (Supplemental Figures S4) and identified that methylation changes were the main epigenetic process controlling bmMSC metabolism using Seahorse analysis (OCR) and cell numbering. By focusing on lysine specific demethylase 1 (LSD1) as a fundamental player in the balance of repressive demethylation of H3K4 and stimulatory demethylation of H3K27 associated with cell fate decision (Adamo et al. 2011), we investigated monomethyl modification on lysine residues 4 and 27 of histone H3 for low and high TMRM cells (Figures 4D and 4E). We showed that LSD1 inhibition by 50 nM GSK was able to increase ($p = 0.052$) the methylation status of the K27 residue in the bmMSCs while the methylation status of the K4 residue was not affected. Moreover, GSK treatment led to a significant decrease in oxidative metabolism at 48h (D2) (Figures 4F and 4G, 25% decrease in basal respiration for GSK treated bmMSCs; $p < 0.01$) that was restored at day 7 (D7) and a considerable increase in cell proliferation at D2 (Figure 4H; 1.3-fold increase for GSK treated bmMSCs: $p < 0.05$). Relative to non-treated cells (bulk), gene expression analyses showed that 50 nM GSK treatment was able to substantially decrease the expression for genes of undifferentiation (*MDR1* and *NANOG1*; $p < 0.01$; *MYC*; $p < 0.05$), cell lineage (*ACTA2*; $p < 0.01$; *RUNX2* and *PPARG*; $p < 0.05$), mitochondrial dynamics (*FIS1* and *MFN2*; $p < 0.001$) and senescence (*CDKN1B*; $p < 0.05$) (Figure 4J). The *CDKN1A* gene was not differentially expressed in GSK treated cells compared to bulk. The fission/fusion balance was conserved even if gene expression was less effective with GSK treatment.

Therapeutic advantage of Low-TMRM bmMSC in vitro

RNA-seq analysis of eight low TMRM and high TMRM cells indicated highly differential changes in proliferation and oxidative stress status (Figures 5A to 5C; $p < 0.01$). The results showed that cell scratch closure speed in low TMRM cells was faster suggesting stronger cell migration ability (Figures 5D and 5E). After 48 hours (D2), we observed a significant reduction in scratch width to 50% versus 24 hours in low TMRM cells ($p < 0.05$) whereas no change in scratch width was noticed for high TMRM cells at 24 and 48 hours. A single cell cloning assay revealed that low TMRM cells were more prone to produce clones than high TMRM ones (Figure 5F; $p < 0.05$). Relative to less oxidative metabolism, low TMRM cells presented significantly reduced DNA damage with doxorubicin (doxo) treatment (1.8-fold decrease of γ H2AX fluorescence for low TMRM versus high; $p < 0.05$) (Figure 5G and Supplemental Figure S5) while basal ROS production was increased in high TMRM populations but not to a large extent (Supplemental Figure S6). Under normoxic conditions, coculture of H9C2 with either low or high TMRM cells did not present any proliferative advantage at Day 3 (D3) or Day 7 (D7) compared to H9C2 alone. On the contrary, under hypoxic conditions, coculture of H9C2 with low TMRM cells led to proliferative advantage at D7 in contrast to both H9C2 alone or when cocultured with high TMRM cells (1.75 higher cell number than D7 control and 1.57 higher cell number than high TMRM+H9C2 respectively; $p < 0.001$) (Figures 5H and 5I).

Therapeutic advantage of Low-TMRM bmMSC in vivo

In vivo studies were conducted on mice subjected to a single intraperitoneal (IP) injection of doxorubicin (doxo) at a dose of 15 mg/kg, with an overall monitoring period of 28 days (D28). The intravenous (IV) administration of 800,000 TMRM low or high cells was carried out 7 hours after the doxo injection (Figure 6A). The study focused on assessing the systolic and diastolic functions of the left ventricle (LV) as indicators of cardiac dysfunction induced by doxo. 7 days (D7) after treatment, we observed no difference (Figure 6B) while both low and high TMRM cells produced a reduction in left ventricular end-diastolic anterior wall (LVAW) thickness at Day 21 (D21) (Figure 6E, $p < 0.05$). M-mode imaging following treatment with low or high TMRM cells for doxo-induced cardiac dysfunction revealed that ejection fraction (EF) and fractional shortening (FS) were restored at D7 in both groups (Figures 6C and 6D). On contrary, at 21 days post-treatment, EF and FS were still comparable to control conditions only when using low TMRM cells (Figures 6F and 6G). Restoring cardiac ejection fraction, even in the presence of a reduced LVAW emphasizes the remarkable efficacy of the low TMRM treatment when doxo-induced heart failure.

Cardiac hypertrophy was assessed by measuring collagen volume and cardiac cross-sectional area (CSA) after 28 days of treatment (D28). In mice treated with low TMRM cells, both cardiac CSA and collagen volume showed improvement compared to doxo-induced cardiac dysfunction although they did not return to control levels (Figures 6H and 6I and supplemental Figure S7). This was related to reduced but non-significant DNA damage at D28 for tissue treated with low TMRM cells in the context of known oxidative stress injury induced by doxo (Figure 6J and supplemental figure S8). Consequently, cardiac function was more effectively restored at 28 days with low TMRM cell treatment compared to high TMRM cell therapy, without any specific effect on doxo-induced fibrosis that remain below 10% even in the doxo-treated control mice.

Discussion

Successful mesenchymal stem cell therapy requires optimal engraftment and proliferation into selected tissues. The use of bmMSCs for heart failure therapy has been largely described in the literature with disparate results due to trial design and the quality of cell preparation (Kalou, Al-Khani, et Haider 2023; Guo et al. 2020). We have previously demonstrated that metabolic shift was a primary mechanism impacting cell fate and the survival of human cardiac MSCs (Gambini et al. 2020). Metabolic modulation is an effective strategy for enhancing functional properties and improving bmMSC therapeutic potency. Conditioning with 2 days or more of hypoxia has been used to boost bmMSC immunoregulatory and induce higher cell retention after transplantation (Beegle et al. 2015). Accordingly, we have shown that under hypoxic conditions, bmMSCs presenting low TMRM exhibit a higher level of glycolytic metabolism which favor H9C2 cell survival in relation to reduced oxidative stress and higher proliferative capacity.

RNAseq analysis identified that molecular basis associated to regenerative capacity of low TMRM bmMSCs was mainly related to epigenetic modifications and DNA damage repair. Integrative analysis of DNA methylome and transcriptome for porcine bmMSCs have shown the critical role of epigenetics mechanisms in determining differences in biological characteristics (Feng et al. 2021). To date bmMSC transcriptomic analysis are mainly studied in the context of cell senescence and aging leading to decline in

tissue repair and regeneration (Xiaoyu Li et al. 2022). On contrary bmMSCs used for cellular therapy should reverse the effects of senescence and maintain their beneficial properties. As we observed for low TMRM cells their glycolytic metabolism was able to stimulate DNA repair and cell proliferation through epigenetic modifications that should enhance the stability and the therapeutic potential of bmMSCs but also their immunomodulatory properties (Walewska et al. 2023). Regulation of metabolic activity is therefore a relevant therapeutic target to intensify the regenerative functions of bmMSCs.

In tissues where damage is linked to oxidative stress, glycolytic bmMSCs could efficiently salvage the damage. Doxorubicin-induced heart failure is known to have a direct effect on cardiac fibroblasts inducing a profibrotic phenotype (Levick et al. 2019). Here we show that the increased collagen percentage observed at 28 days after 15 mg/kg treatment with doxorubicin was attenuated by bmMSCs injection, possibly through paracrine effects (Mias et al. 2009; Podyacheva et al. 2022). Through the secretion of trophic factors and cytokines, glycolytic bmMSCs can modulate the local microenvironment, promote angiogenesis, reduce inflammation, and stimulate endogenous repair mechanisms. We observed that the intravenous bmMSCs injection given just after doxorubicin administration led to unchanged ejection fraction at 7 days for both low and high TMRM cells as a previously described preventive strategy (Di et al. 2012). However, this ability to ensure a protective effect against oxidative stress injury at 21 days was observed only for low TMRM bmMSCs. In parallel to regeneration of cardiac ejection fraction related to reduced cardiomyocyte size, we therefore confirmed that glycolytic bmMSCs were able to decrease fibrosis post-injury (M. Correia et al. 2022). This emphasizes the higher control exerted by redox environments *in vivo* for bmMSCs presenting glycolytic metabolism. The perinuclear mitochondrial distribution and associated network dynamics we also observed for low TMRM cells could be linked with resistance to oxidative stress induced by efficient retrograde signaling of perinuclear mitochondria (Al-Mehdi et al. 2012; Walker et Moraes 2022). We suggest that retrograde signaling in glycolytic bmMSCs should be able to manage cell reprogramming through metabolic pathways and epigenetic changes as an adaptative response to environment (Guha et Avadhani 2013; Santos 2021).

Similarly to hypoxia, epigenetic regulation of gene expression could be addressed as a means of maintaining metabolism according to glycolytic status as a reciprocal regulation of metabolic programming (Yi Zhao et al. 2022). By focusing on LSD1 inhibitors, we confirmed the existence of epigenetic changes as histone methylation favored glycolytic metabolism of bmMSCs. As LSD1 was known to catalyze the mono and demethylated form of lysine residues from H3, LSD1 knockdown has shown a major effect of monomethylation on residues K4, K9 and K27 compared to K36 leading to immunomodulation and metabolic reprogramming (Beegle et al. 2015; Xiuchun Li et al. 2022). However, the metabolic impact of LSD1 depended on its association with multiple cofactors generating controversial results for glucose homeostasis depending on tissue (D. Wang et al. 2022). Here we have demonstrated that LSD1 inhibition in bmMSCs mainly induced H3K27 methylation according to its predominant role in bone marrow regenerative capacity (Yujue Li et al. 2023). Therefore, if the use of epigenetic drugs could be discussed as a metabolic preconditioner for bmMSC therapy, epigenetic changes should be reversible as described for aging-related disease (K. Wang et al. 2022).

In conclusion, glycolytic bmMSCs might exhibit enhanced survival, functionality and therapeutic efficacy in the context of doxorubicin-induced cardiac injury. By integrating glycolytic bmMSC therapy with epigenetic modulation, it may be possible to enhance the regenerative capacity of bmMSCs and improve their therapeutic efficacy. Their ability to evolve under conditions of limited oxygen availability and their potential to secrete paracrine factors known for their cardio-protective and regenerative properties make them a promising candidate to mitigate heart damage. Further preclinical and clinical studies are needed to optimize these strategies and translate them into effective therapies.

References

- 1 Kalou Y, Al-Khani AM, Haider KH. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells for Heart Failure Treatment: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Heart, Lung and Circulation* 2023;32:870–880.
- 2 Chen H, Xia R, Li Z, et al. Mesenchymal Stem Cells Combined with Hepatocyte Growth Factor Therapy for Attenuating Ischaemic Myocardial Fibrosis: Assessment using Multimodal Molecular Imaging. *Sci Rep* 2016;6:33700.
- 3 Guo Y, Yu Y, Hu S, et al. The therapeutic potential of mesenchymal stem cells for cardiovascular diseases. *Cell Death Dis* 2020;11:1–10.
- 4 Gambini E, Martinelli I, Stadiotti I, et al. Differences in Mitochondrial Membrane Potential Identify Distinct Populations of Human Cardiac Mesenchymal Progenitor Cells. *Int J Mol Sci* 2020;21:7467.
- 5 Ferreira JR, Teixeira GQ, Santos SG, et al. Mesenchymal Stromal Cell Secretome: Influencing Therapeutic Potential by Cellular Pre-conditioning. *Front Immunol* 2018;9:2837.
- 6 Kahrizi MS, Mousavi E, Khosravi A, et al. Recent advances in pre-conditioned mesenchymal stem/stromal cell (MSCs) therapy in organ failure; a comprehensive review of preclinical studies. *Stem Cell Research & Therapy* 2023;14:155.
- 7 Gharibi B, Hughes FJ. Effects of medium supplements on proliferation, differentiation potential, and in vitro expansion of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Transl Med* 2012;1:771–782.
- 8 Liu W, Tang P, Wang J, et al. Extracellular vesicles derived from melatonin-preconditioned mesenchymal stem cells containing USP29 repair traumatic spinal cord injury by stabilizing NRF2. *J Pineal Res* 2021;71:e12769.
- 9 Liu J, Hao H, Xia L, et al. Hypoxia Pretreatment of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Facilitates Angiogenesis by Improving the Function of Endothelial Cells in Diabetic Rats with Lower Ischemia. *PLoS One* 2015;10:e0126715.
- 10 Ren R, Ocampo A, Liu G-H, et al. Regulation of Stem Cell Aging by Metabolism and Epigenetics. *Cell Metab* 2017;26:460–474.
- 11 Wang K, Liu H, Hu Q, et al. Epigenetic regulation of aging: implications for interventions of aging and diseases. *Sig Transduct Target Ther* 2022;7:1–22.
- 12 Yang Y, Luan Y, Feng Q, et al. Epigenetics and Beyond: Targeting Histone Methylation to Treat Type 2 Diabetes Mellitus. *Front Pharmacol* 2022;12:807413.
- 13 Yu X-Y, Geng Y-J, Liang J-L, et al. High levels of glucose induce “metabolic memory” in cardiomyocyte via epigenetic histone H3 lysine 9 methylation. *Mol Biol Rep* 2012;39:8891–8898.
- 14 Guénant A-C, Jebeniani I, Leschik J, et al. Targeting the histone demethylase LSD1 prevents cardiomyopathy in a mouse model of laminopathy. *J Clin Invest* 131:e136488.
- 15 Huo J-L, Jiao L, An Q, et al. Myofibroblast Deficiency of LSD1 Alleviates TAC-Induced Heart Failure. *Circulation Research* 2021;129:400–413.
- 16 Uzielienė I, Bernotienė E, Rakauskienė G, et al. The Antihypertensive Drug Nifedipine Modulates the Metabolism of Chondrocytes and Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019;10:756.
- 17 Menard C, Pacelli L, Bassi G, et al. Clinical-grade mesenchymal stromal cells produced under various good manufacturing practice processes differ in their immunomodulatory properties: standardization of immune quality controls. *Stem Cells Dev* 2013;22:1789–1801.

- 18 Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012;9:671–675.
- 19 Valente AJ, Maddalena LA, Robb EL, et al. A simple ImageJ macro tool for analyzing mitochondrial network morphology in mammalian cell culture. *Acta Histochem* 2017;119:315–326.
- 20 Kim D, Pertea G, Trapnell C, et al. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology* 2013;14:R36.
- 21 Eden E, Navon R, Steinfeld I, et al. GOrrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics* 2009;10:48.
- 22 Skene PJ, Henikoff S. An efficient targeted nuclease strategy for high-resolution mapping of DNA binding sites. *Elife* 2017;6:e21856.
- 23 Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 1979;11:447–455.
- 24 Emde B, Heinen A, Gödecke A, et al. Wheat germ agglutinin staining as a suitable method for detection and quantification of fibrosis in cardiac tissue after myocardial infarction. *Eur J Histochem* 2014;58:2448.
- 25 Nie W-B, Zhang D, Wang L-S. Growth Factor Gene-Modified Mesenchymal Stem Cells in Tissue Regeneration. *Drug Des Devel Ther* 2020;14:1241–1256.
- 26 Rambold AS, Kostelecky B, Elia N, et al. Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011;108:10190–10195.
- 27 Adamo A, Sesé B, Boue S, et al. LSD1 regulates the balance between self-renewal and differentiation in human embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 2011;13:652–659.
- 28 Beegle J, Lakatos K, Kalomoiris S, et al. Hypoxic preconditioning of mesenchymal stromal cells induces metabolic changes, enhances survival, and promotes cell retention in vivo. *Stem Cells* 2015;33:1818–1828.
- 29 Feng Z, Yang Y, Liu Z, et al. Integrated analysis of DNA methylome and transcriptome reveals the differences in biological characteristics of porcine mesenchymal stem cells. *BMC Genomic Data* 2021;22:56.
- 30 Li X, Wang X, Zhang C, et al. Dysfunction of metabolic activity of bone marrow mesenchymal stem cells in aged mice. *Cell Prolif* 2022;55:e13191.
- 31 Walewska A, Janucik A, Tynecka M, et al. Mesenchymal stem cells under epigenetic control - the role of epigenetic machinery in fate decision and functional properties. *Cell Death Dis* 2023;14:720.
- 32 Levick SP, Soto-Pantoja DR, Bi J, et al. Doxorubicin-Induced Myocardial Fibrosis Involves the Neurokinin-1 Receptor and Direct Effects on Cardiac Fibroblasts. *Heart Lung Circ* 2019;28:1598–1605.
- 33 Mias C, Lairez O, Trouche E, et al. Mesenchymal Stem Cells Promote Matrix Metalloproteinase Secretion by Cardiac Fibroblasts and Reduce Cardiac Ventricular Fibrosis After Myocardial Infarction. *STEM CELLS* 2009;27:2734–2743.
- 34 Podyacheva E, Shmakova T, Kushnareva E, et al. Modeling Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy With Fibrotic Myocardial Damage in Wistar Rats. *Cardiol Res* 2022;13:339–356.
- 35 Di G-H, Jiang S, Li F-Q, et al. Human umbilical cord mesenchymal stromal cells mitigate chemotherapy-associated tissue injury in a pre-clinical mouse model. *Cytotherapy* 2012;14:412–422.
- 36 Correia M, Santos F, da Silva Ferreira R, et al. Metabolic Determinants in Cardiomyocyte Function and Heart Regenerative Strategies. *Metabolites*

- 2022;12:500.
- 37Al-Mehdi A-B, Pastukh VM, Swiger BM, et al. Perinuclear mitochondrial clustering creates an oxidant-rich nuclear domain required for hypoxia-induced transcription. *Sci Signal* 2012;5:ra47.
- 38Walker BR, Moraes CT. Nuclear-Mitochondrial Interactions. *Biomolecules* 2022;12:427.
- 39Guha M, Avadhani NG. Mitochondrial Retrograde Signaling at the crossroads of tumor bioenergetics, genetics and epigenetics. *Mitochondrion* 2013;13:10.1016/j.mito.2013.08.007.
- 40Santos JH. Mitochondria signaling to the epigenome: A novel role for an old organelle. *Free Radic Biol Med* 2021;170:59–69.
- 41Zhao Y, He J, Qiu T, et al. Epigenetic therapy targeting bone marrow mesenchymal stem cells for age-related bone diseases. *Stem Cell Research & Therapy* 2022;13:201.
- 42Wang D, Kuang Y, Zhang G, et al. Lysine-Specific Demethylase 1 in Energy Metabolism: A Novel Target for Obesity. *The Journal of Nutrition* 2022;152:1611–1620.
- 43Li Y, Hu M, Xie J, et al. Dysregulation of histone modifications in bone marrow mesenchymal stem cells during skeletal ageing: roles and therapeutic prospects. *Stem Cell Research & Therapy* 2023;14:166.
- 44Wang K, Liu H, Hu Q, et al. Epigenetic regulation of aging: implications for interventions of aging and diseases. *Signal Transduct Target Ther* 2022;7:374.

Figure legends

Figure 1: bmMSCs Sorted on Low and High TMRM Present Opposite Metabolic Pathway and Cell Lineage

(A) Isolation and expansion of human bmMSCs by flow cytometry: 15% of cells with the lowest and highest mitochondrial membrane potential were collected and defined as low mitochondrial membrane potential (low TMRM) and high mitochondrial membrane potential (high TMRM).

(B-C) Oxygen respiration rate (OCR) and basal respiration for high and low TMRM population using Mitostress Test on Seahorse XFe 24 Analyzer apparatus (n=5).

(D-E) mt DNA copy number and mitochondrial mass for high and low TMRM populations (n=14).

(F-G) Extracellular acidification rate (ECAR) profile and basal acidification for high and low TMRM populations using Glycolysis Stress Test on Seahorse XFe 24 Analyzer apparatus (n=3).

(H) Expression levels for PGDFB and TIMP1 genes in low and high TMRM populations (n=7)

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Figure 2: RNAseq Analysis of Low and High TMRM Population (n=8)

(A) Heatmap of most differential genes for low and high TMRM cells.

(B) Volcano plot for differential expressed genes in low and high TMRM cells with FDR < 0.05 and Log₂Fold change ≥ 1 .

(C-E) Gene ontology analysis of significant biological process enrichment in low TMRM bmMSCs.

* $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$.

Figure 3: Mitochondrial Network Dynamics

(A) Gene set enrichment analysis (GSEA) plots depict the differentially expressed genes (DEGs) identified between low and high TMRM groups.

(B-C) Mitochondrial morphology analysis using MiNA workflow on segmented images opened in ImageJ (n=7).

(D-E) Quantitative analysis of mitochondrial length branch and speed movement using confocal laser scanning microscopy and ImageJ (n=7).

(F-I) MFN2, FIS1, Dynein and KIF5B (Kinesin 1) gene expression for low and high TMRM populations (n=12) * $p < 0.05$.

Figure 4: Epigenetic Pathways and bmMSCs Conditioning with 50 nM GSK

(A-B) Gene set enrichment analysis (GSEA) plots depict the differentially expressed genes (DEGs) identified between low and high TMRM groups for histones methylation pathway.

(C) Global H3K4 ChIP- analysis for low and high TMRM cells.

(D-E) Western blot analyses of histones methylation after 48 hours (D2) 50 nM GSK treatment compared to untreated cells (bulk) and 5-day follow-up after GSK (D7; n=5).

(F-G) Metabolic analyses after 48 hours (D2) 50 nM GSK treatment and 5-day follow-up after GSK (D7; n=7).

(H) Cell proliferation analyses after 48 hours (D2) 50 nM GSK treatment.

(I) Expression analysis of genes involved in differentiation, cell fate, mitochondrial dynamics and senescence after 48 hours (D2) 50 nM GSK treatment (n=5). Fold change expression to control gene (cyclophilin A) and relative to bulk.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Figure 5: Therapeutic Advantages of Sorted bmMSCs *in vitro*

(A-C) Gene set enrichment analysis (GSEA) plots depict the differentially expressed genes (DEGs) identified between low and high TMRM groups: proliferation, KI67 and ROS signalling pathway categories.

(D-F) Scratch test (n=4) and colony formation (n=11) for low and high TMRM cells.

(G) DNA damage in low and high TMRM populations analyzed by confocal microscopy and γ H2Ax staining (n=6).

(H-I) 7-days coculture of H9C2 with low and high TMRM populations under normoxia (20% oxygen) or hypoxia (1% oxygen) (n=5) * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

Figure 6: Therapeutic Advantages of Sorted bmMSCs *in vivo*

(A) Therapeutic Scheme of C57Bl/6 mice.

(B-G) Electrocardiographic analysis of mice at D7 and D21 of doxorubicin-induced heart failure treated by low and high TMRM cells: LV AW, EF and FS.

(H-J) Phenotypic characterization of cardiac fibrosis, cross sectional area and γ H2Ax western blot analysis at D28 of doxorubicin-induced mice treated with low and high TMRM bmMSCs.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Supplemental data

Supplemental Table 1

Supplemental Figures S1 to S7

Figure 1

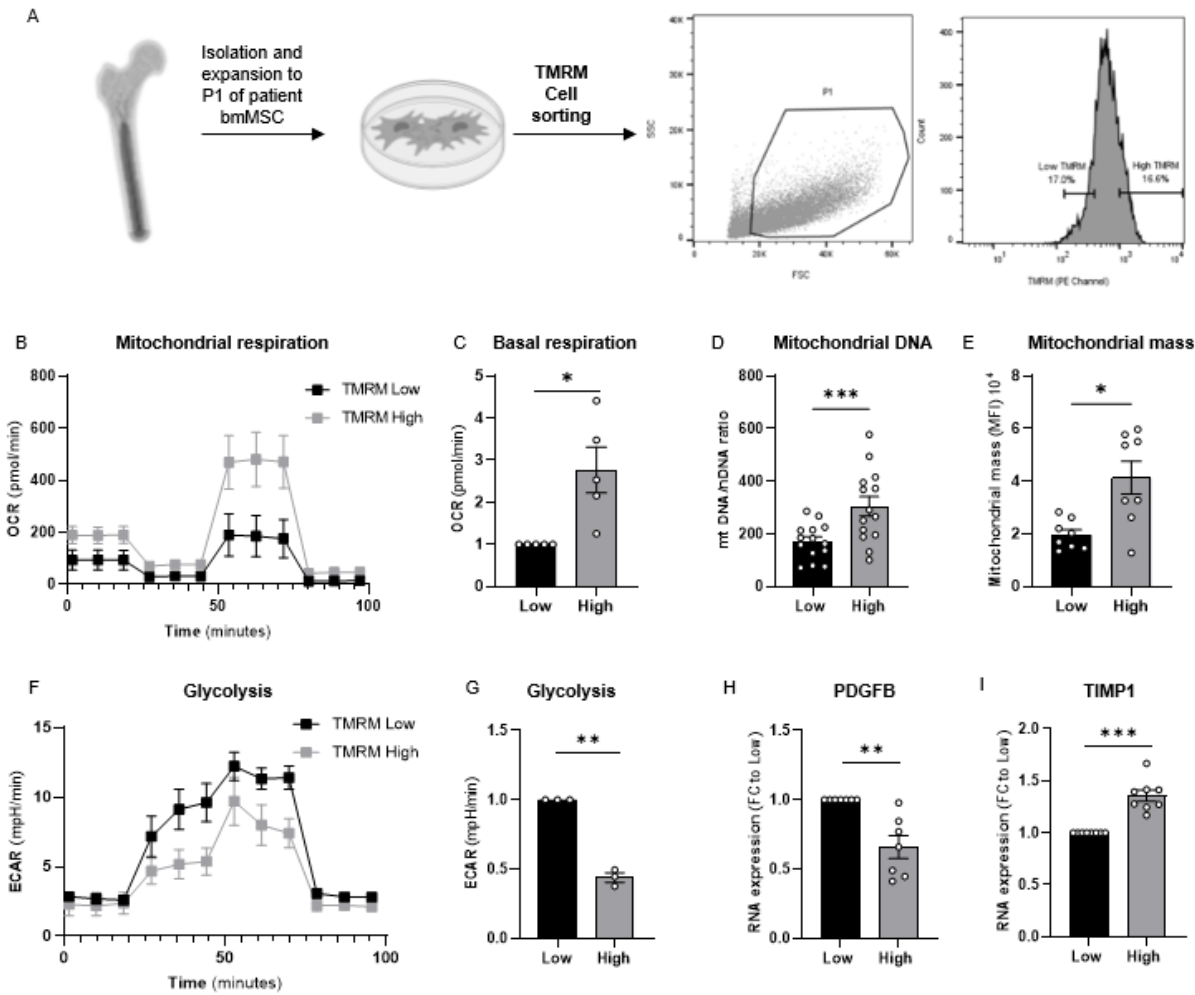


Figure 2

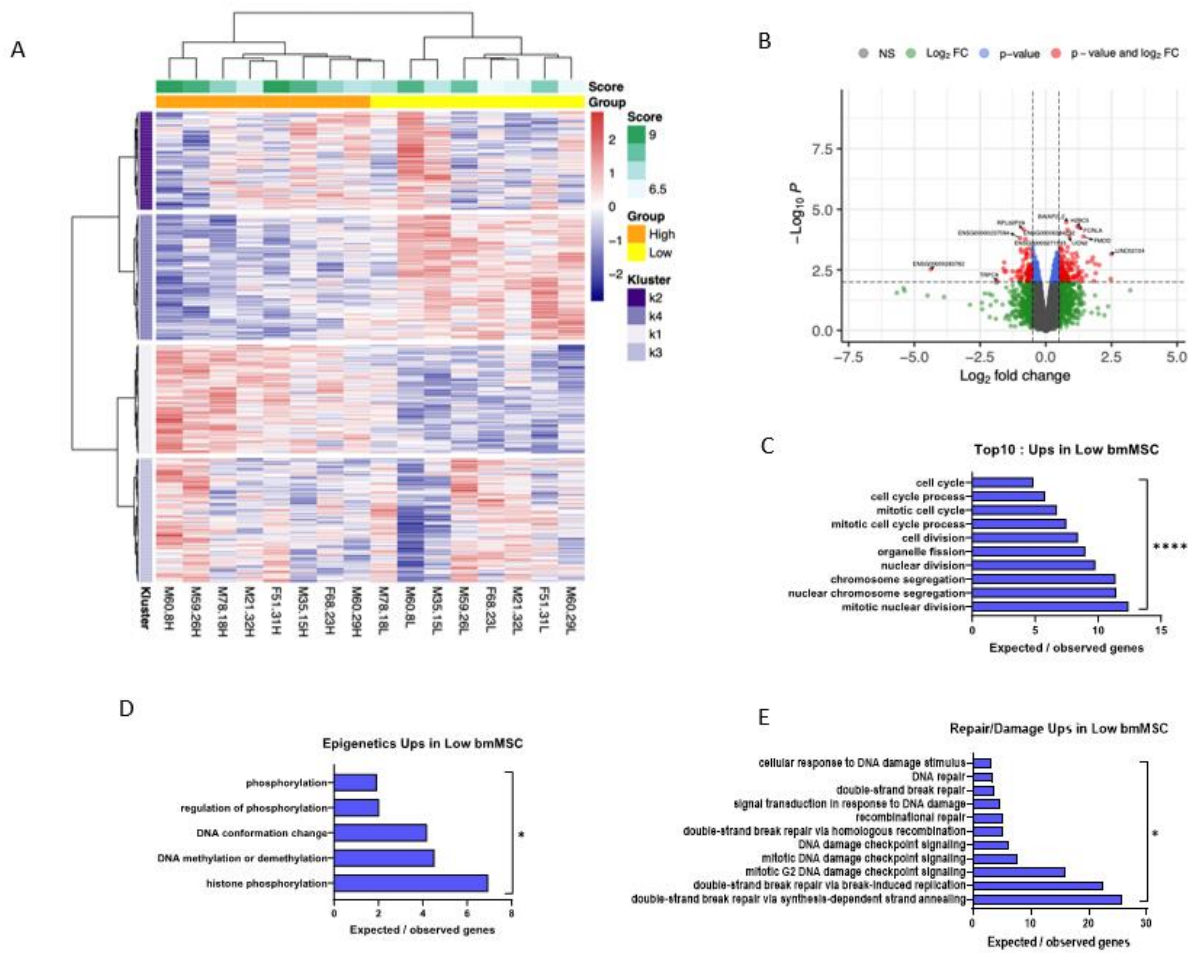


Figure 3

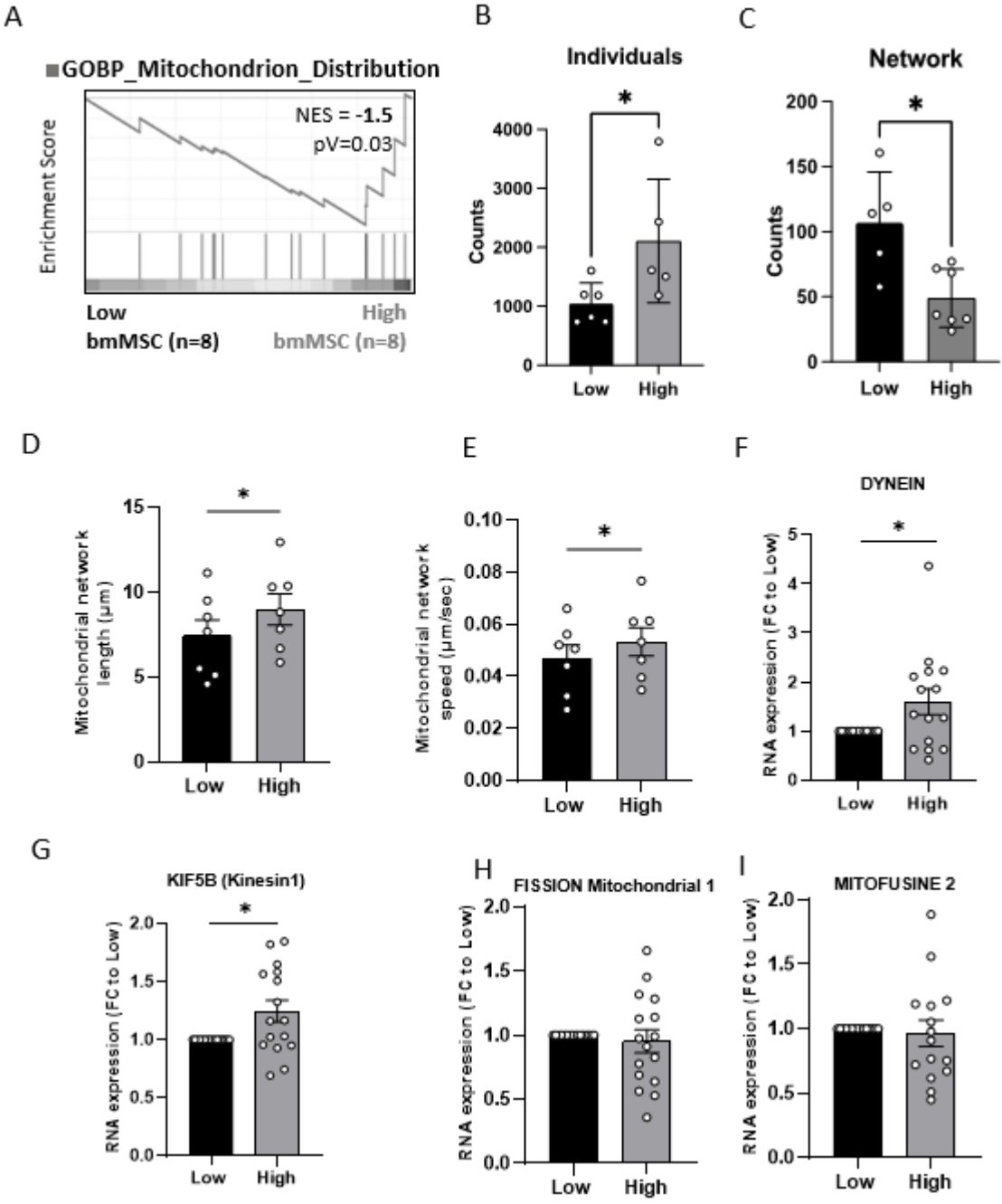


Figure 4

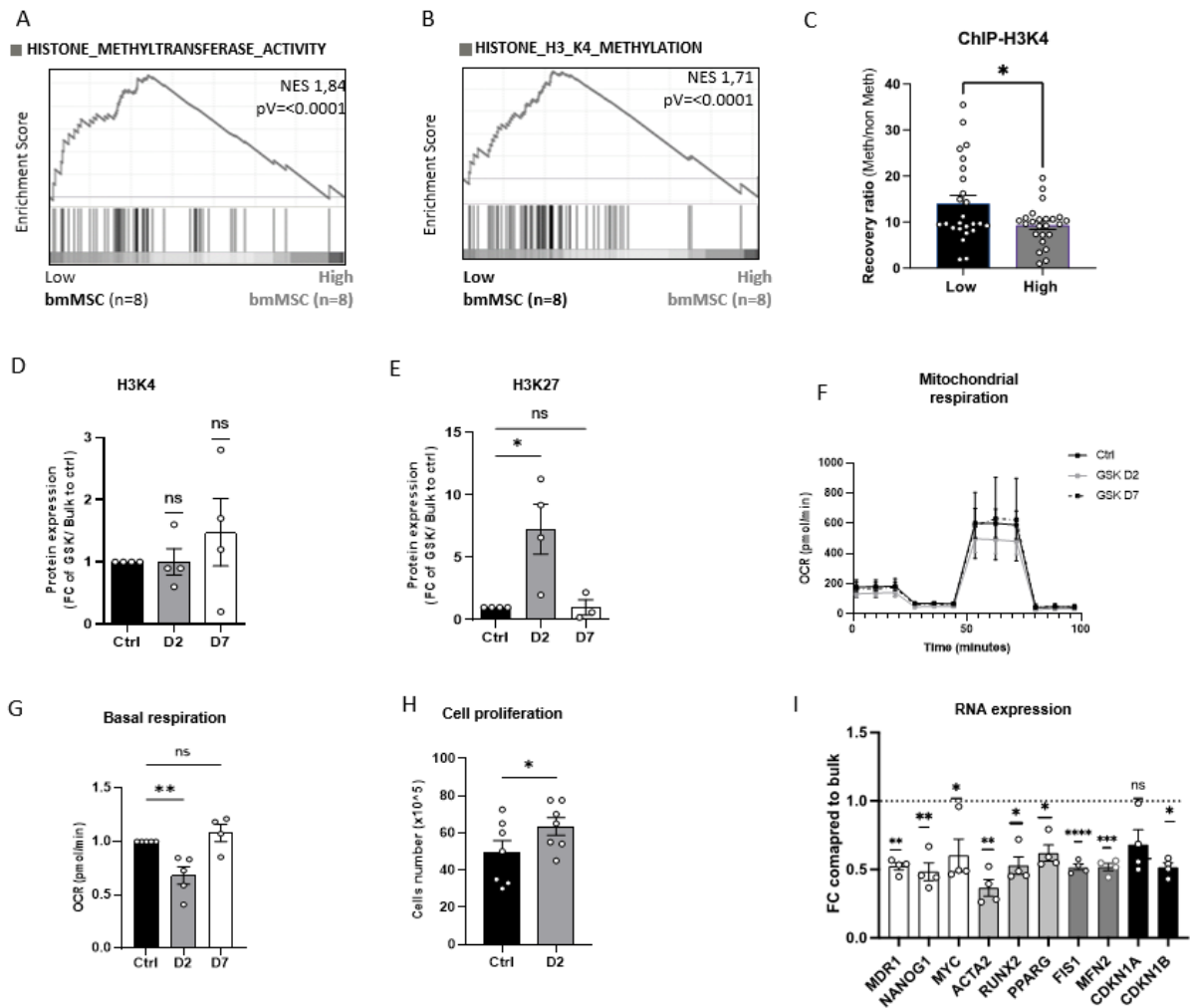


Figure 5

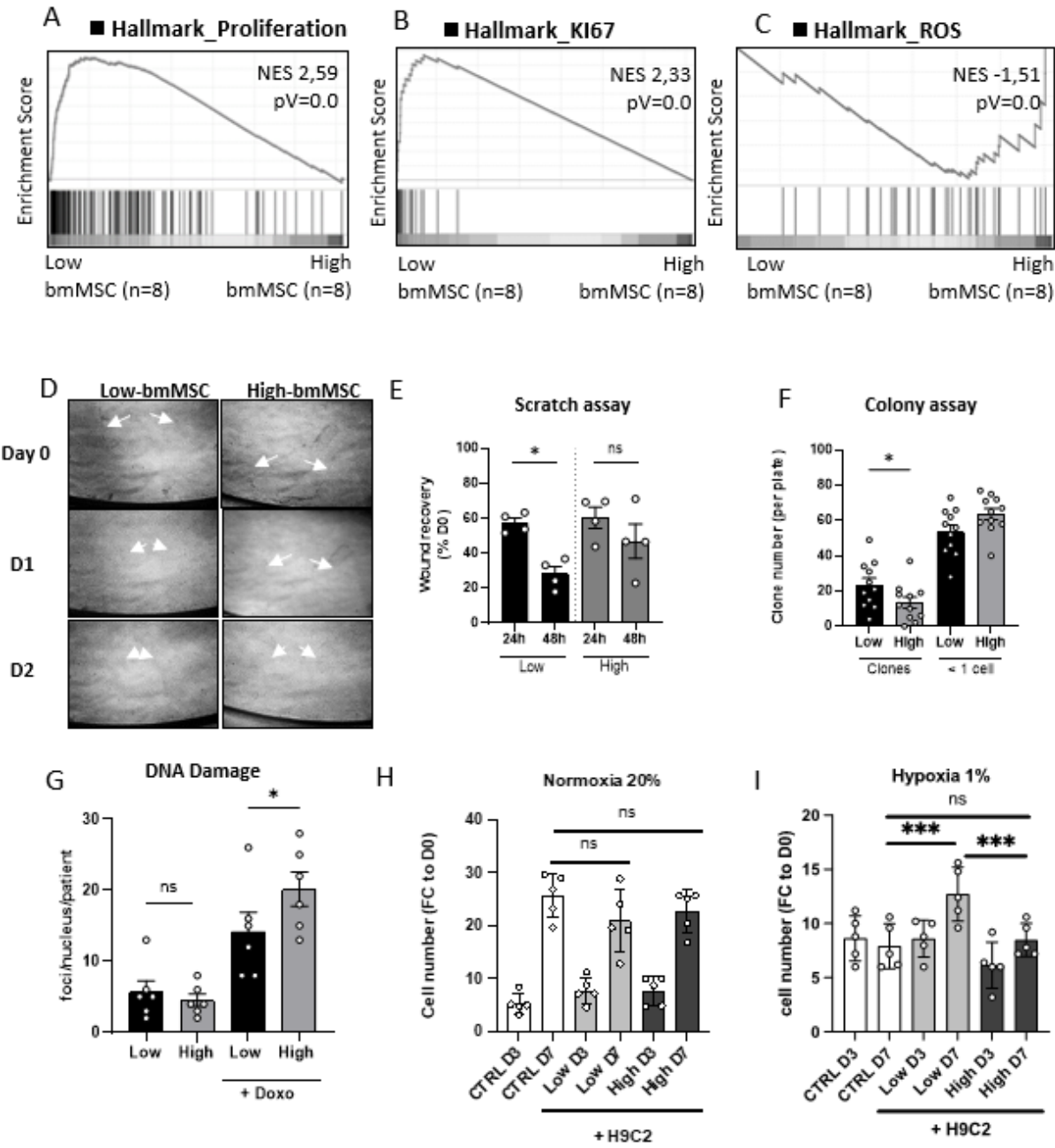
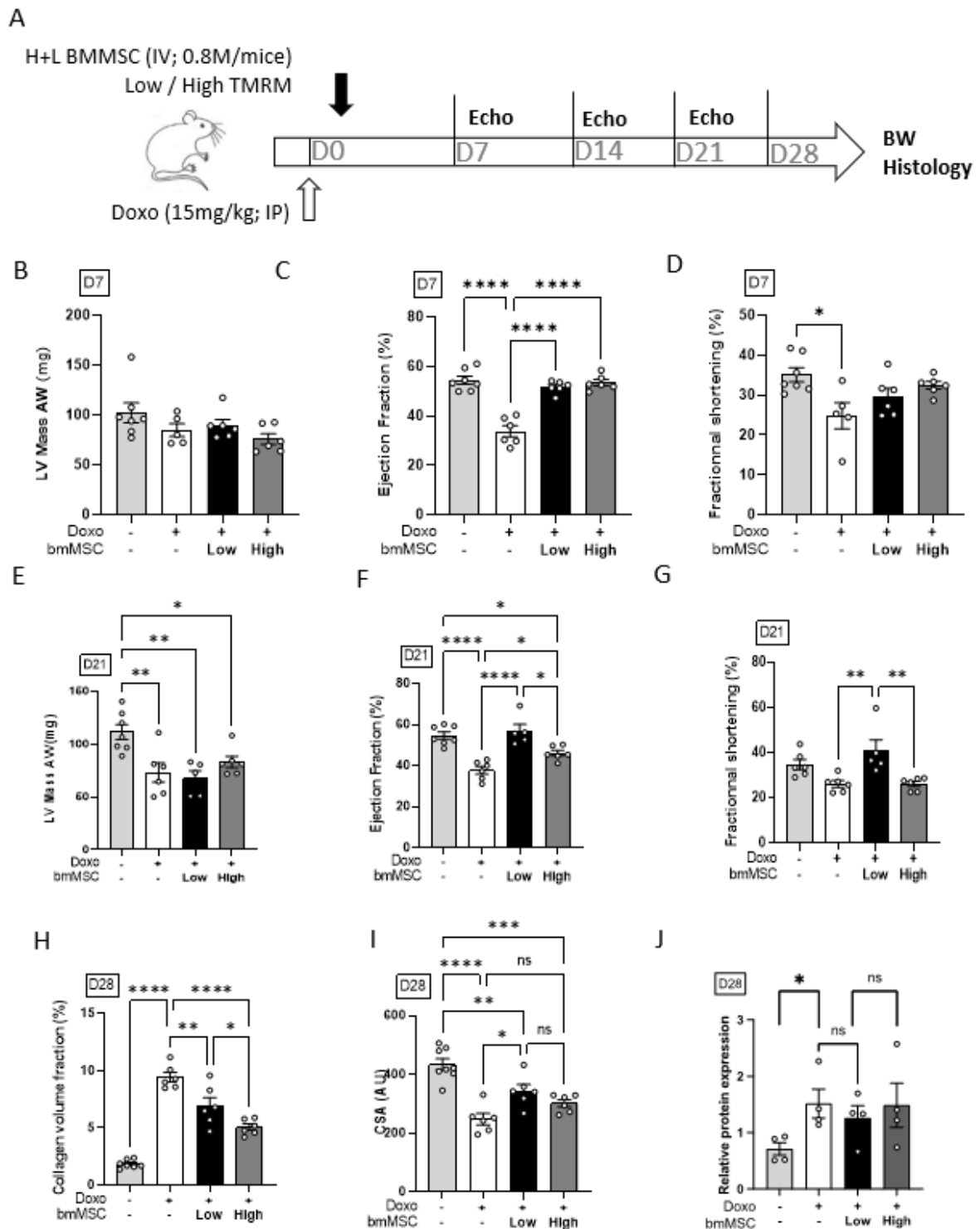


Figure 6



Supplemental data

Supplemental Table 1: Primer sequences for RT-qPCR, ChIP-qPCR and mtDNA analyses

GENE	FORWARD	REVERSE
<i>Gene Expression Analysis</i>		
RUNX2	5'-TCTGGCCTTCCACTCTCAGT-3'	5'-GACTGGCGGGGTGTAAGTA-3'
PPARGC1A	5'-ACTCAAGTGGTGCAGTGACC3'	5'-CTGGGTACTGAGACCACTGC-3'
NANOG1	5'-AATACCTCAGCCTCCAGCAGATG-3'	5'-TCGGTCACACCATTGCTATTCTTC-3'
MYC	5'-TTCTCTCCGTCCTCGGATTCTCT-3'	5'-AGACTCTGATCCAGACTCTGACCT-3'
MFN2	5'-CCCCCTGTCTTTATGCTGATGTT-3'	5'-TTTTGGGAGAGGTGTTGCTTATTTC-3'
FIS1	5'-GGAGGAACAGCGGGATTACGT-3'	5'-CTTCATGGCCTTGCAATGAGC-3'
MDR1	5'-GGCTCCGATACATGGTTTTCC-3'	5'-CCAGTGGTGTITTTAGGGTCATC-3'
CDKN1A	5'-GGAAGACCATGTGGACCTGT-3'	5'-GGATTAGGGCTTCTCTTGG-3'
CDKN1B	5'-ACCTGCAACCGACGATTCTTC-3'	5'-GGCGTCTGCTCCACAGA-3'
DYNEIN	5'-ACGCAGGCCATGGAGAAGTACA-3'	5'-TGTCTCGTGTGACGTAGCTG-3'
KIF5B (KINESIN-1)	5'-GAGTTAGCAGCATGTCAGCTTCG-3'	5'-GCATCGACAGATTCCTCCAAGT-3'
ACTA2 (alpha-SMA)	5'-GCTCCCCTAAATCCCAAGGC-3'	5'-ATCACCTGAATCCAGGACGAT-3'
PDGFB	5'-GAGATGCTGAGTGACCACTCGA-3'	5'-GTCATGTTCAAGTCCAAGTCCG-3'
TIMP1	5'-GGAGAGTGTCTGCGGATACTTC-3'	5'-GCAGGTAGTGATGTGCAAGAGTC-3'
Cyclophilin	5'-GGCAAATGCTGGACCCAACACA-3'	5'-TGCTGGTCTTGCCATTCCTGGA-3'
SAT2	5'-CTGAGAGCAGATGGCTTTGGAG-3'	5'-CCTCCAGATAAATGGTGCCTCC-3'
GAPDH	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
<i>mtDNA quantification</i>		
ND5	5'-GGGGATTGTGCGGTGTGTG-3'	5'-CTTCTCCTATTTATGGGGGT-3'
B2M	5'-TTGTCTTTCAGCAAGGACTG-3'	5'-CTTCTCCTATTTATGGGGGT-3'

Supplemental Figures S1 to S9

Figure S1: Phenotypes of Low and High TMRM bmMSC populations using FACS analysis. Low-TMRM in blue and High-TMRM in red

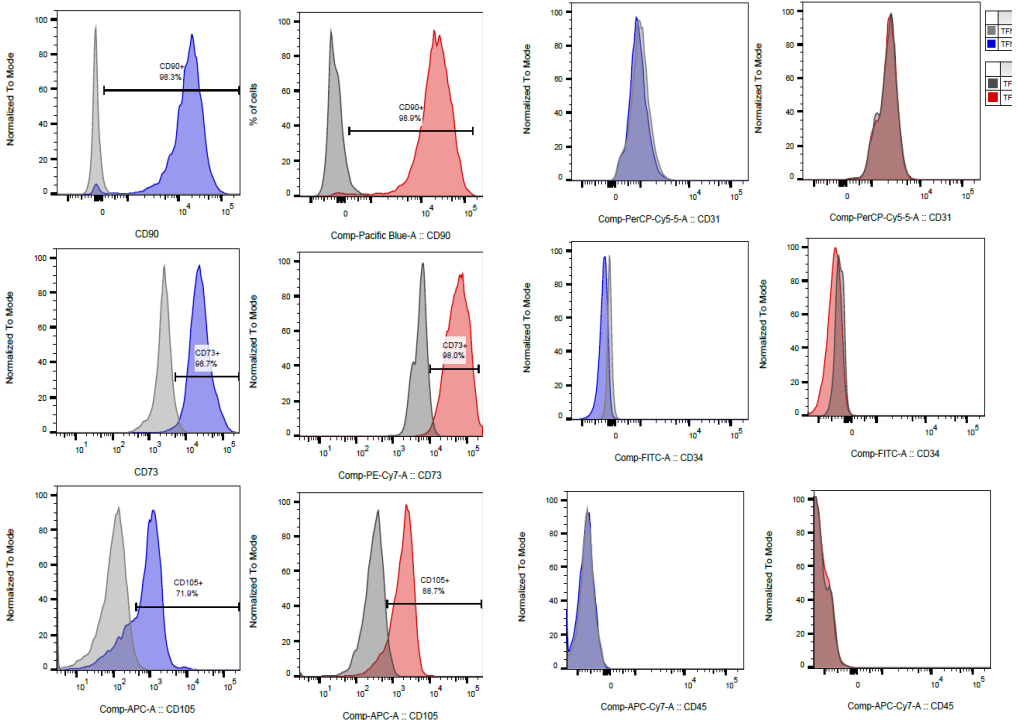


Figure S2: Mitochondrial network analysis using live cell Imaging on Low and High TMRM bmMSC

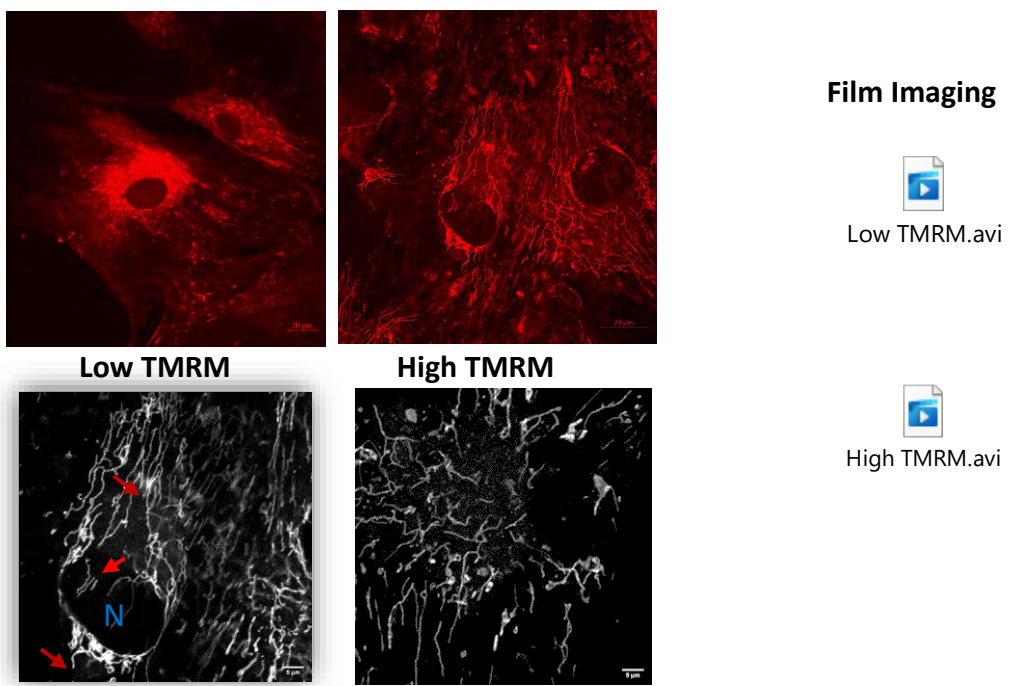


Figure S3: Gene set enrichment analysis (GSEA) between Low and High TMRM cells for Glycolysis and Oxidative metabolic pathways

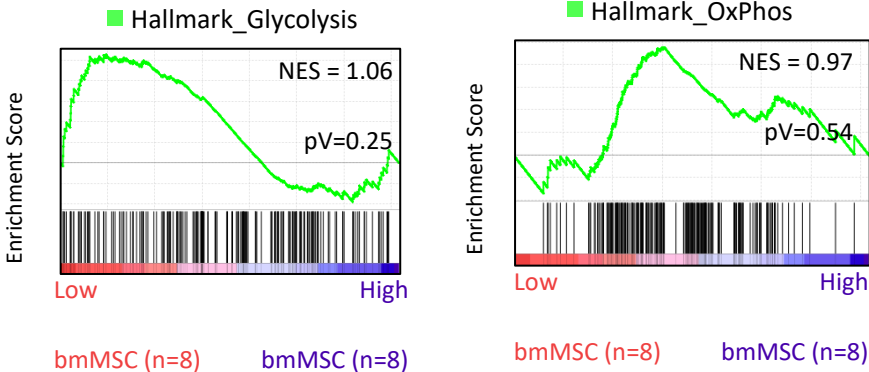


Figure S4: Effect of treatment by Decitabine (DAC), Trichostatin (TRI) and GSK LSD1 (GSK) on bulk bmMSC proliferation and Oxygen Consumption Rate (OCR) analyzed on a Seahorse XFe 24 apparatus. (n=3)

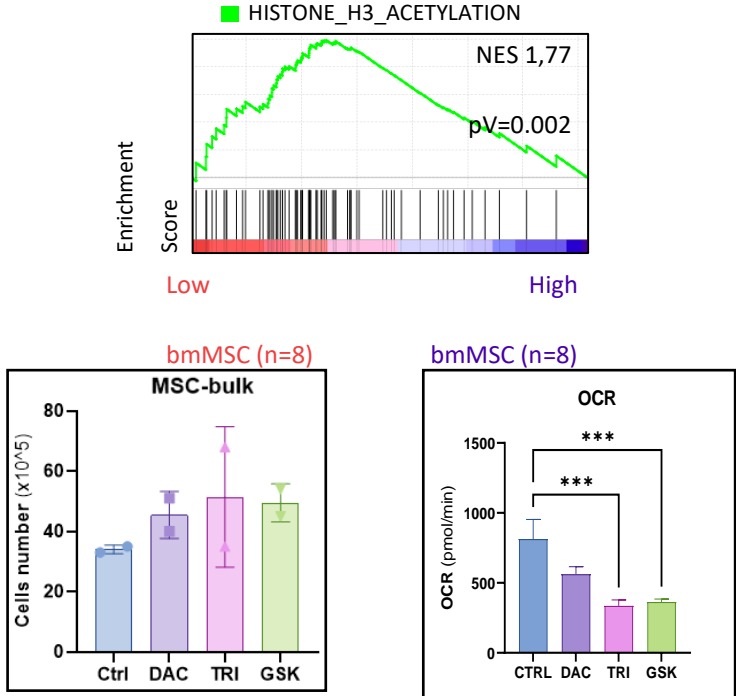


Figure S5: Western blot H3K4me1, H3K27me1 referred to H2B for bulk bmMSC after 2 days (D2) and 7 days (D7) of 50 nM GSK LSD1 (GSK) (n=3)

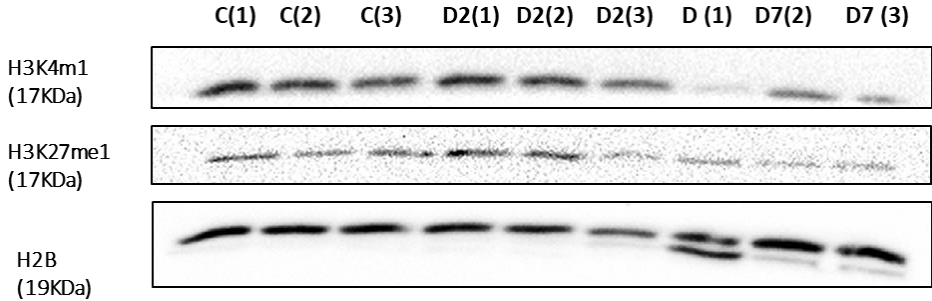


Figure S6: γH2AX foci staining relative to DAPI after doxorubicin treatment on low and high TMRM bmMSC

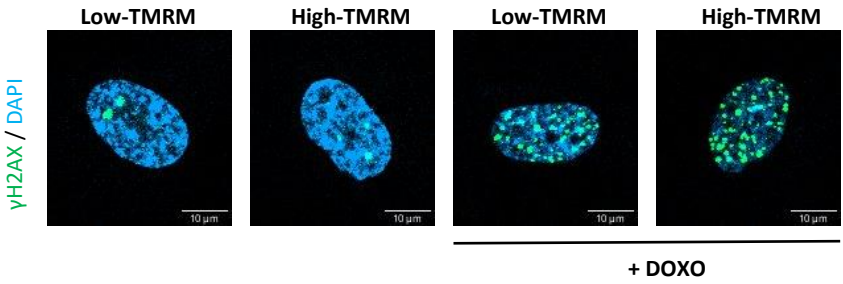


Figure S7 : ROS production in low and high TMRM bmMSC using mitoxox staining and FACS apparatus

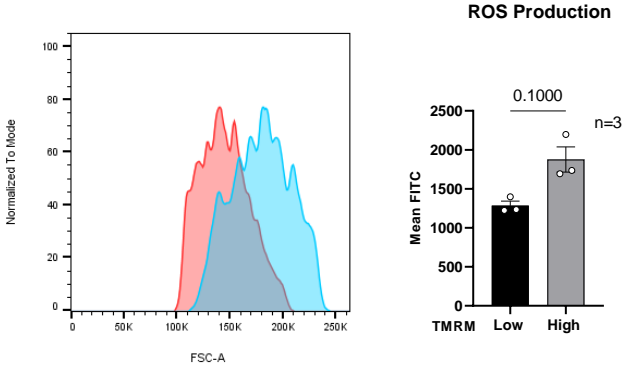


Figure S8: Picosirius red (PSR) and Wheat Germ Agglutinin (WGA) analysis after doxorubicin (Doxo)-induced heart disease in mice model treated with low and High TMRM bmMSC

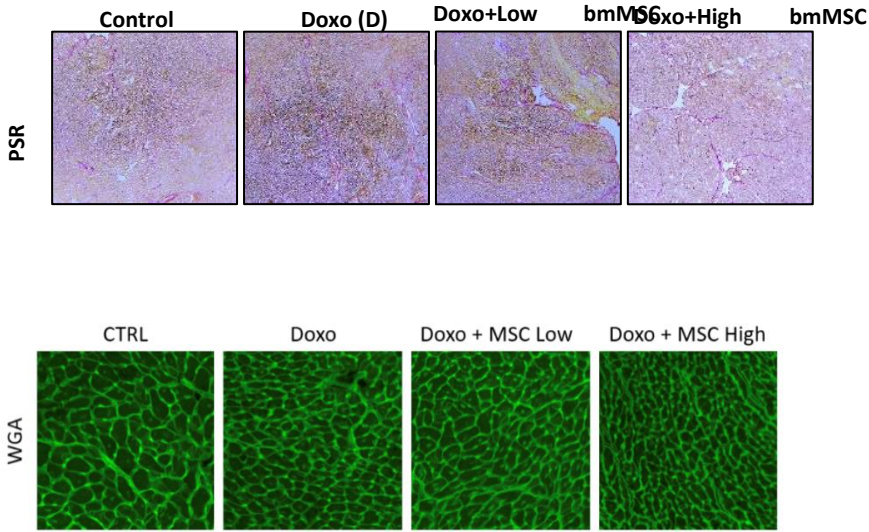
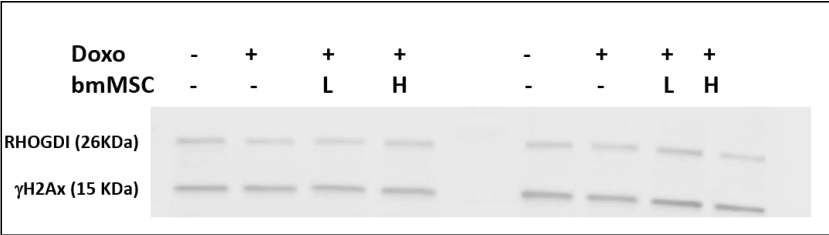


Figure S9: Western blot γ H2Ax referred to RhoGD1 staining for doxorubicin (Doxo)-induced heart disease in mice model treated with low (L) and High (H) TMRM bmMSC.



DISCUSSION

Pour considérer qu'une thérapie cellulaire basée sur des cellules stromales mésenchymateuses soit un succès, cela nécessite d'une part le maintien de la greffe mais aussi une prolifération optimale des cellules dans les tissus d'intérêt.

L'utilisation de bmMSC pour le traitement de l'insuffisance cardiaque a été largement décrite dans la littérature avec des résultats disparates en raison de la conception des essais mais également de la qualité de la préparation cellulaire (Kalou, Al-Khani, et Haider 2023; Guo et al. 2020).

Nous avons précédemment montré que les modifications métaboliques étaient précurseur du devenir et de la survie des MSC cardiaques humaines (Gambini et al. 2020).

Ainsi, la modulation métabolique serait une stratégie efficace pour améliorer les propriétés fonctionnelles et l'impact thérapeutique des bmMSC.

Un conditionnement des bmMSC *via* une hypoxie de deux jours ou plus a déjà été utilisée pour améliorer l'immunorégulation des bmMSC et induire une rétention cellulaire plus élevée après la transplantation (Beegle et al. 2015).

De la même manière, nous avons montré que dans des conditions hypoxiques, les bmMSC sélectionnées pour leur métabolisme glycolytique (faible TMRM) pouvaient favoriser la survie des cellules H9C2 (myoblastes de rat) en maintenant un stress oxydatif bas et une capacité de prolifération plus élevée par rapport à la plupart des cellules de métabolisme plus oxydatif soit à haut potentiel de membrane mitochondrial (marquage TMRM intense).

In vivo dans un modèle de souris présentant un stress oxydatif aigu lié à l'administration de Doxorubicine, nous avons confirmé l'avantage des bmMSC glycolytique dans la récupération de la fonction cardiaque (fraction d'éjection ventriculaire) (M. Correia et al. 2022).

Si la fibrose cardiaque (pourcentage de collagène) induite par la Doxorubicine a été atténuée par l'injection des deux types de bmMSC (glycolytique et oxydative) il n'a pas été possible d'identifier un avantage lié spécifiquement aux bmMSC glycolytiques.

Cette atténuation semble être essentiellement liée aux effets paracrines des bmMSC sur la fibrose comme précédemment décrit (Podyacheva et al. 2022; Mias et al. 2009).

Cependant la fibrose observée à 28 jours post traitement reste inférieure à 10% dans notre modèle et n'a pas entravé l'amélioration de la fonction cardiaque.

Il s'avère donc que la régulation de l'activité métabolique est une cible thérapeutique pertinente pour améliorer les fonctions régénératrices des bmMSC, comme décrit pour des souris âgées (Xiaoyu Li et al. 2022).

L'injection des bmMSC glycolytique dans un environnement relativement plus élevé en oxygène peut initier la biogenèse mitochondriale et la génération de ROS, essentielles à l'engagement de la lignée ; ceci peut s'avérer critique pour la régénération optimale du tissu cardiaque.

La question de savoir si les bmMSC conservent alors un phénotype glycolytique ou si elles s'orientent vers un métabolisme oxydatif pour favoriser la différenciation après transplantation reste une question non résolue à ce jour.

Dans le cadre de la thérapie cellulaire c'est une question qui doit être posée si un pré conditionnement pharmacologique est utilisé.

Ainsi, si l'utilisation de drogues épigénétiques pouvait être discutée pour le conditionnement métabolique des bmMSC, les changements épigénétiques devraient être réversibles comme décrit pour les maladies liées au vieillissement (K. Wang et al. 2022).

Dans notre étude, l'utilisation de GSK-LSD1 50nM a montré une réversion du phénotype métabolique à 7 jours, suggérant à la fois un arrêt du conditionnement épigénétique et le switch des bmMSC pouvant avoir été correctement greffées vers un métabolisme plus oxydatif et donc un phénotype différencié pouvant être bénéfique à la régénération cardiaque.

Comme pour l'hypoxie, la régulation épigénétique de l'expression des gènes pourrait être abordée pour maintenir le métabolisme en un état glycolytique en tant que régulation réciproque de la programmation métabolique (Yi Zhao et al. 2022).

En se focalisant sur l'inhibiteur du LSD1, soit le GSK-LSD1, nous avons confirmé que les changements épigénétiques liés à la méthylation des histones favorisaient le métabolisme glycolytique des bmMSC.

Comme le LSD1 catalyse la formation de structures mono- et di-méthylées des résidus lysine de H3, l'inactivation du LSD1 a montré un effet majeur dans la mono-méthylation des résidus K4, K9 et K27 par rapport au K36 conduisant à une immunomodulation et une reprogrammation métabolique (Chianese et al. 2022; Jin et al. 2017).

Cependant, l'impact métabolique du LSD1 dépendrait de son association avec de multiples cofacteurs conduisant à des résultats controversés sur l'homéostasie du glucose en fonction des tissus (D. Wang et al. 2022).

Nous avons montré dans ce travail que l'inhibition du LSD1 dans les bmMSC induisait principalement la mono méthylation de H3K27, conformément à son rôle prédominant dans la capacité de régénération de la moelle osseuse (Yujue Li et al. 2023).

Notre étude conduit à éclaircir de nouvelles stratégies pour optimiser les thérapies basées sur les bmMSC dans le traitement de l'insuffisance cardiaque et à mettre en évidence les propriétés métaboliques des bmMSC en tant que cible prometteuse pour des thérapies régénératives cardiovasculaires plus efficaces.

Cependant, certains points nécessitent encore d'être approfondis :

- **Réaliser une cartographie des cibles épigénétiques des populations de bmMSC**

Récemment, l'épigénome, a été analysé en profondeur pour comprendre les signatures moléculaires qui spécifient l'identité cellulaire (Kelsey, Stegle, et Reik 2017).

Chaque type de cellule possède un épigénome unique qui est utilisé pour établir les programmes d'expression génique spécifiques qui dépendent de protéines régulatrices telles que des facteurs de transcription, l'ARN polymérase ou des re modeleurs de chromatine.

L'analyse des facteurs de transcription et des modifications de la chromatine à l'échelle du génome fournit en effet des informations sur les processus de régulation des gènes, tels que la transcription, la différenciation cellulaire et la réponse cellulaire.

Nous avons initié, en complément des techniques exposées ci-dessus, une étude de cartographie des nucléosomes et d'accessibilité de la chromatine aux facteurs de régulation de la transcription par *Cleavage Under Target & Release Using Nuclease* (CUT & RUN).

Ceci nous a permis de confirmer l'impact des mécanismes de mono méthylation des histones dans la régulation fine du *switch* métabolique des bmMSC humaines.

Nous souhaitons cartographier à l'échelle du génome les interactions ADN/protéine H3K4me1 et H3K27me1 (avec pour contrôle H3K4me3) et ainsi déterminer quelles seraient les cibles épigénétiques spécifiques des populations de bmMSC glycolytiques et oxydatives (Low et High TMRM) ainsi que des populations de bmMSC traitées ou non par le conditionneur GSK-LSD1.

Cela permettra par ailleurs de comparer les profils épigénétiques aux profils transcriptomiques que nous avons identifiés pour les bmMSC Low et High TMRM et qui ont démontré un rôle essentiel du mécanisme épigénétique en lien avec le métabolisme des cellules.

- **Compléter les tests *in vitro* par des tests de coculture de cellules traitées par le conditionneur épigénétique GSK-LSD1**

Des conditionneurs épigénétiques tels que GSK-LSD1 à 50nM ont été appliqués à différentes concentrations sur les bmMSC pendant 48 heures.

Pour les études de coculture, 5000 cellules myoblastiques de rat H9C2 ont été cultivées dans un milieu DMEM avec 5000 cellules bmMSC à TMRM faible ou élevée dans des conditions de normoxie (20 % d'oxygène) ou d'hypoxie (1 % d'oxygène).

Des myoblastes de rat, H9C2 seront cultivées sur *transwells* avec des bmMSC traitées ou non avec ce conditionneur à différentes concentrations permettant d'identifier la dose adaptée à une amélioration de la prolifération et la survie cellulaire tout en permettant la réversion de l'effet épigénétique dans une perspective de thérapie humaine.

Il a déjà été initié des expériences de coculture 3D ou sphéroïdes avec des cellules H9C2 et des bmMSC triées bas et haut-TMRM ainsi qu'avec des bmMSC conditionnées ou non GSK-LSD1 afin de confirmer les résultats des cocultures 2D et mimer les conditions hypoxiques.

Nous avons observé une amélioration de la survie des sphéroïdes constitués d'H9C2 et de bmMSC glycolytiques mais ces résultats doivent encore être confirmés.

➤ **Compléter les tests *in vivo* par l'injection de cellules conditionnées par GSK-LSD1**

Un objectif intéressant à atteindre serait de substituer le tri des bmMSC selon leur TMRM par un tri épigénétique en utilisant un conditionneur permettant une sélection des cellules présentant un profil glycolytique d'intérêt dans la thérapie cellulaire.

La prochaine étape sera donc de reproduire les expériences *in vivo* sur un nombre suffisant de souris C57Bl/6 traitées une fois avec 15mg/kg de doxorubicine puis de les utiliser selon différents groupes : non traitées et traitées avec des cellules conditionnées GSK-LSD1.

Il sera important de définir la dose de GSK-LSD1 minimale efficace au cours de ces tests (entre 50 et 200nM) comme cela aura été fait pour les tests *in vitro*.

➤ **Tester l'efficacité thérapeutique des bmMSC métaboliquement sélectionnées sur un modèle murin d'insuffisance cardiaque chronique**

Le modèle murin TAC ou de constriction aortique transverse développé dans le laboratoire de l'I2MC pourrait être utilisé pour tester les différents conditionneurs métaboliques des bmMSC (X. Wang et al. 2023; Loyer et al. 2008).

En conclusion, les bmMSC glycolytiques présentent une capacité de survie améliorée *in vitro* et *in vivo* ainsi qu'une fonctionnalité et une efficacité thérapeutique dans le contexte d'une lésion cardiaque induite par la Doxorubicine.

Le facteur limitant reste le tri cellulaire, nécessaire dans un laps de temps limité pour la culture cellulaire si une injection thérapeutique est envisagée chez l'homme.

Le conditionnement épigénétique des bmMSC peut être une voie prometteuse mais l'innocuité du produit et la réversion des phénomènes épigénétiques restent à valider avant d'envisager leur utilisation en thérapie cellulaire cardiaque chez l'homme (B. Sun et al. 2023).

PARTIE II : INTERACTION
EPIGENETIQUE ET
REGULATION METABOLIQUE
DANS LE MODELE DES
CELLULES TUMORALES
CIRCULANTES

CONTEXTE SCIENTIFIQUE

EPIDEMIOLOGIE DES NEOPLASIES NEUROENDOCRINES

Les néoplasies neuroendocrines (NNE) représentent un groupe diversifié de tumeurs qui proviennent le plus souvent de l'axe gastro-entéro-pancréatique (GEP) représentant 55 à 70% de toutes les NNE ; la majorité de ces tumeurs sont sporadiques et les facteurs étiologiques restent le plus souvent inconnus.

On distingue classiquement les tumeurs fonctionnelles, responsables de symptômes liés à une production tumorale de peptides ou d'amines, des tumeurs non fonctionnelles, non sécrétantes.

Bien que la plupart des NNE soient des tumeurs indolentes, 10 à 20% des NNE sont des carcinomes neuroendocrines (CNE), qui sont des tumeurs hautement prolifératives caractérisées par une progression rapide de la maladie (Das et Dasari 2021) ; selon la localisation de la tumeur primitive, la survie et les sites des métastases varient (Q. Yao, Chen, et Zhou 2019).

Les NNE intestinales représentent le contingent des NNE-GEP le plus fréquent avec une incidence en augmentation et une survie moyenne à 5 ans au stade métastatique inférieure à 50% (Leoncini et al. 2017) ; en second se trouvent les NNE thoraciques, qui sont représentées notamment par les contingents pulmonaire et bronchique (J. C. Yao et al. 2008).

Les néoplasies neuroendocrines intestinales ont un potentiel de malignité très élevé, elles tendent à progresser de manière asymptomatique contrairement aux autres tumeurs de l'axe GEP, notamment gastriques ou rectales, qui présentent un faible potentiel de malignité mais une expression plus agressive au niveau symptomatique.

Les NNE-GEP peuvent par ailleurs être associées à un syndrome carcinoïde, habituellement corrélé à la présence de métastases hépatiques.

Le pronostic de ces tumeurs neuroendocrines demeure moins sévère par rapport aux autres types de cancers.

Aujourd'hui les NNE sont mieux maîtrisées par les professionnels de santé, mais cela n'a pas toujours été le cas ; en effet, du fait de leur hétérogénéité, il est très difficile de réaliser le recueil des données épidémiologiques mondiales des NNE (Das et Dasari 2021).

Ainsi, il persiste encore d'un pays à l'autre une importante disparité dans les méthodes diagnostiques de ces tumeurs du fait de leur complexité, d'un spectre de manifestations cliniques très vaste mettant en porte à faux le diagnostic de ces tumeurs.

Bien que généralement considérées comme rares, l'incidence des NNE a significativement augmenté au cours de ces dernières décennies ; selon la base de données *Surveillance, Epidemiology, and End Results program* (SEER), un programme fournissant des informations sur les statistiques du cancer parmi la population américaine, leur incidence est passée de 1,09/100 000 en 1973 à 5,25/100 000 habitants en 2004 pour une prévalence de 35/100 000 habitants aux Etats-Unis (Figure 54) (J. C. Yao et al. 2008) :

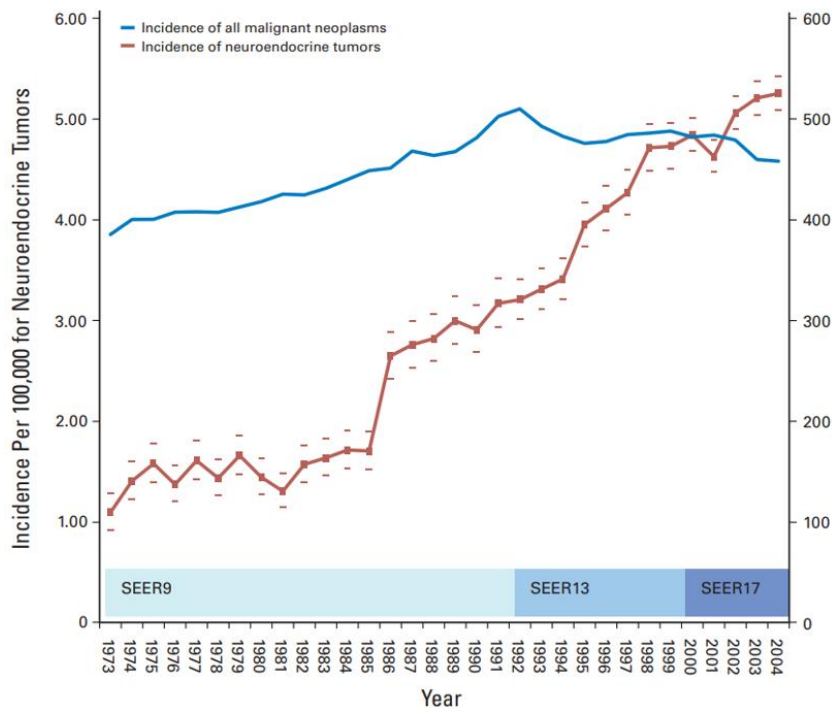


Figure 54 Incidence des NNE selon la base de données du SEER (J. C. Yao et al. 2008)

L'incidence et la prévalence des NNE continuent d'augmenter à l'échelle mondiale, avec les taux d'augmentation les plus élevés dans des pays comme les États-Unis, le Canada et la Norvège (Leoncini et al. 2017).

Rien qu'aux États-Unis, l'incidence des NNE a été multipliée par plus de six au cours des quatre dernières décennies, avec une augmentation prédominante des tumeurs localisées plutôt que des tumeurs métastatiques ; la prévalence actuelle des NNE aux États-Unis est d'environ 170 000 patients (Chauhan, Kohn, et Del Rivero 2020).

Cependant, les registres du SEER ne prennent en compte que les CNE, les données sur les tumeurs bénignes étant souvent exclues de ces registres or pour la plupart des tumeurs épithéliales, l'invasion de la membrane basale détermine une preuve histologique de malignité.

Devant l'absence de comportement malin évident, telle que l'invasion directe des organes adjacents, des ganglions lymphatiques régionaux ou de la présence de métastases, il devient difficile de classer une NNE dans la catégorie bénigne ou maligne.

Bien que les données du registre SEER fournissent des informations importantes sur les CNE, il reste plus difficile de savoir dans quelles mesures ces données sous-estiment la fréquence des NNE bénignes.

En France, l'incidence des CNE malignes est estimée à 1,1/100 000 chez l'homme et 0,9/100 000 chez la femme (C Lepage et al. 2004).

L'augmentation de l'incidence s'explique par une meilleure connaissance de ces tumeurs par les cliniciens, l'uniformisation de leur classification (Irvin M Modlin et al. 2008) et les progrès réalisés dans le domaine de l'imagerie (**Figure 55**) :

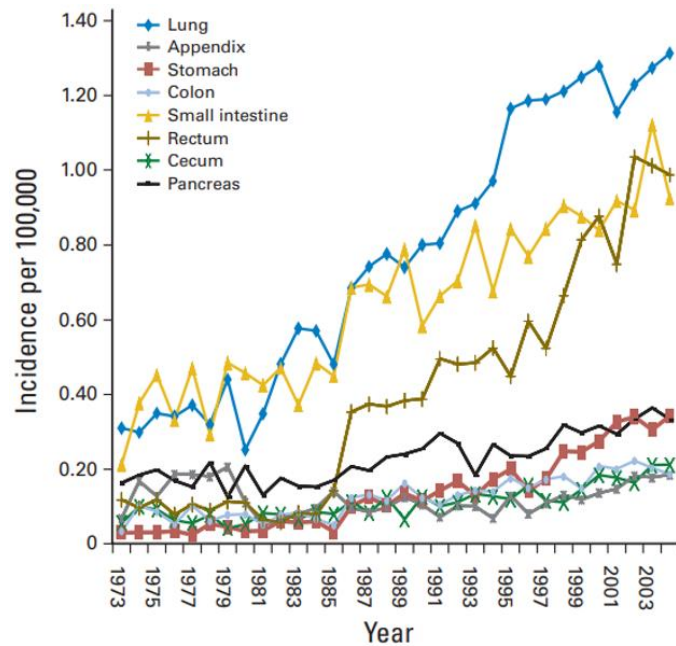


Figure 55 Incidence des NNE selon leur localisation (J. C. Yao et al. 2008)

Le sexe ratio est de l'ordre de 1 pour les tumeurs bénignes et légèrement plus fréquent chez les hommes pour les tumeurs malignes (Lombard-Bohas et al. 2009) ; l'âge de survenue est quant à lui généralement situé entre 40 et 60 ans mais l'âge moyen au moment du diagnostic est de 60 ans rendant compte d'un diagnostic relativement tardif.

Plus spécifiquement, les NNE digestives (NNED) représentent environ 1% des cancers digestifs en France (C Lepage et al. 2004) ; aux Etats Unis, toujours selon la base de données SEER, elles se placent en seconde position des cancers digestifs, derrière le cancer colorectal.

Au sein du contingent digestif, la localisation la plus fréquemment retrouvée avec le rectum est l'intestin grêle ou *small intestine*.

En effet, les NNE intestinales représentent à elles seules environ 30% des NNED (Figure 56) :

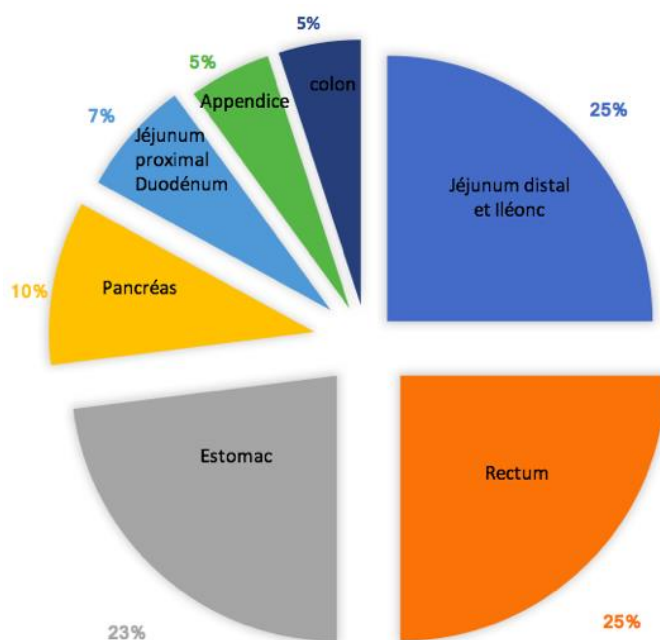


Figure 56 Incidence des NNED en fonction du site anatomique, selon la base de données du SEER

Dans la plupart des cas, les NNED sont des tumeurs bien différenciées (>80%) (Côme Lepage, Rachet, et Coleman 2007) et de nature non fonctionnelle.

Les NNED fonctionnelles, plus rares (< 20%), sont le plus fréquemment représentées par les tumeurs carcinoïdes, les insulinomes et les gastrinomes.

Plus de 50% des NNE intestinales sont diagnostiquées au stade métastatique, principalement au niveau hépatique ; la survie moyenne au stade métastatique à 5 ans est estimée inférieure à 50% (J. C. Yao et al. 2008) mais en fonction de la localisation du primitif et de l'invasion tumorale, cette moyenne peut varier.

Parmi les principaux facteurs de mauvais pronostic se placent, le caractère peu différencié de la tumeur, le grade élevé (indice de prolifération, index mitotique) et le stade métastatique.

L'évaluation de ces facteurs histologiques va permettre d'établir un arbre décisionnel qui définira les différentes options thérapeutiques (Irvin M Modlin et al. 2008).

RADIOTHERAPIE METABOLIQUE

Les alternatives thérapeutiques pour les NNE intestinales non éligibles à une exérèse chirurgicale complète restent très limitées.

La radiothérapie interne vectorisée (RIV) par *peptide receptor radionuclide therapy* (PRRT) au : ^{177}Lu -[DOTA^o,Tyr³] octreotate (^{177}Lu -DOTATATE) délivre localement à bas débit de dose plusieurs centaines de grays au niveau des tissus tumoraux sur-exprimant les récepteurs à la somatostatine de type 2 (SST2) sans irradier significativement les tissus environnants (Kwekkeboom et al. 2008).

Lors de l'essai clinique récent de phase III NETTER-1 (J. Strosberg et al. 2017) mené chez des patients atteints de NNE intestinales progressives métastatiques et inopérables, le traitement par PRRT a démontré sa supériorité en termes de réponse thérapeutique et d'amélioration du délai de survie globale sans progression par rapport au traitement standard par analogue de la somatostatine (aSST).

L'essai NETTER-2, en cours de publication, montre que l'utilisation d'une PRRT en première ligne pour des patients avec NNE-GEP G2 ou G3 améliore significativement la survie sans progression.

Le ^{177}Lu -DOTATATE a obtenu l'AMM en octobre 2017 dans le cadre du traitement des NNE intestinales inopérables ou métastatiques, progressives, bien différenciées (G1 et G2) et exprimant des récepteurs de la somatostatine (SSTR) chez l'adulte.

A cela s'ajoute l'obtention d'une Amélioration du Service Médical Rendu (ASMR) de grade III en juillet 2018 (« LUTATHERA (^{177}Lu lutécium oxodotrétotide), radiopharmaceutique », s. d.).

La lutathérapie (PRRT au ^{177}Lu -DOTATATE) appartient à une nouvelle catégorie de molécules qualifiées de « théranostiques » (Baum et Kulkarni 2012).

L'engouement pour ces nouveaux traitements reste cependant modéré en raison du peu de recul existant vis-à-vis de leur gestion et la crainte que suscite ces nouveaux acteurs métaboliques radioactifs révèle un besoin pressant d'outils performants permettant de cadrer rigoureusement leur utilisation.

En effet, chaque individu possède une radiosensibilité différente ; ainsi, l'évaluation de la radiosensibilité individuelle permettrait de proposer un schéma thérapeutique personnalisé.

La diversité des options thérapeutiques et des profils évolutifs chez ces patients rend nécessaire l'identification de marqueurs biologiques permettant de guider la stratégie thérapeutique.

A l'heure actuelle, seul le profil NETest établissant un score PPQ (Modlin) semble proposer des biomarqueurs assez robustes dans la prise en charge de ce type de tumeur et leur suivi thérapeutique.

Cependant ce NETest n'est pas disponible en France et l'établissement du score reste complexe voire opaque pour une application à d'autres laboratoires.

Devant la recherche permanente d'une prise en charge plus personnalisée des patients et la prise en compte de la radiosensibilité individuelle, une approche qualifiée de « biodosimétrie » nécessite la mise au point de marqueurs biologiques d'efficacité et de toxicité (Bolcaen et al. 2023).

Le protocole GENEbioLuNET se proposait d'étudier la variabilité radio-induite de l'expression de gènes du métabolisme et de sa régulation chez les patients atteints de NNE intestinales et traités par PRRT.

L'hypothèse de cette étude pilote est, que le suivi de biomarqueurs moléculaires au cours du traitement, permettrait de proposer une adaptation du schéma thérapeutique de façon plus focalisée sur les marqueurs de radiosensibilité des patients.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I. DEFINITION ET CLASSIFICATION DES TUMEURS NEUROENDOCRINES

Les NNE se définissent par l'expression de protéines de structure et de produits de sécrétion hormonale communs aux neurones et à l'ensemble des cellules endocrines.

En 1907, le terme de « carcinoïde » est introduit pour définir un groupe de tumeurs iléales mais ce n'est qu'en 1963 qu'une classification voit le jour et intègre l'origine embryologique de la tumeur (Williams et Sandler 1963).

Aujourd'hui, des critères histologiques et immunohistochimiques bien définis permettent aux cliniciens d'identifier de manière fiable les NNE et de les différencier des autres types de tumeurs.

Les critères de classification des NNE établis par l'OMS en 2010 puis réactualisés en 2017 et 2022 ont permis d'uniformiser leur classification et ont remplacé toutes classifications et termes antérieurs tels que les tumeurs du système *amine precursor uptake and decarboxylation* (APUD), les tumeurs argentaffines et les tumeurs carcinoïdes (Klöppel 2017).

I.1. ORIGINE ET SITE ANATOMIQUE

Le système « neuroendocrinien » est un système vaste et complexe.

Les cellules neuroendocrines peuvent s'organiser au niveau (André, Valo, et Guyétant 2003) :

- **D'organes** ou parties d'organes :
 - Hypothalamus,
 - Antéhypophyse,

- Médullo-surrénale,
- Parathyroïdes,
- **D'amas bien individualisés** à l'intérieur d'un organe : pancréas endocrine,
- **De réseau de cellules** dispersées à l'intérieur d'un organe,
- **De la thyroïde,**
- **Du tube digestif,**
- **Du poumon,**
- **Du thymus,**
- **De l'appareil urinaire,**
- **De l'appareil génital.**

Les cellules neuroendocrines du tube digestif, du pancréas et de l'appareil respiratoire dérivent de l'endoderme alors que les cellules neuroendocrines de l'intestin ont la particularité de dériver des cellules entéro-chromaffines dites de Kultchinsky.

L'origine embryologique des cellules neuroendocrines et de leur clone tumoral, permet de différencier (**Figure 57**) (Lawrence et al. 2011) :

- **Les tumeurs développées à partir de l'intestin antérieur** ou « *foregut* » (classification anglo-saxonne) qui comprennent :
 - Les NNE de l'appareil respiratoire (larynx, trachée, bronches) et du thymus,
 - Les NNE digestives dites « hautes » comprenant l'œsophage, l'estomac, le duodénum, le haut jéjunum, et le pancréas.
- **Les tumeurs développées à partir de l'intestin moyen** ou « *midgut* ». Elles comprennent les NNE jéjunales, iléales, appendiculaires et caecales.
- **Les tumeurs développées à partir de l'intestin postérieur** ou « *hindgut* ». Elles comprennent les NNE coliques et rectales.

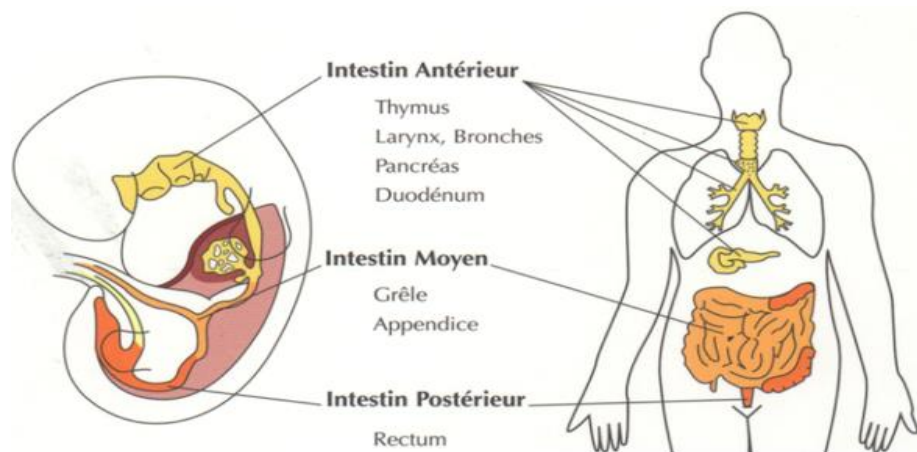


Figure 57 Origine embryologique des NNE (Bournaud-Salinas, s. d.)

I.2. MANIFESTATIONS CLINIQUES

Les NNE intestinales se caractérisent par la manifestation de symptômes cliniques aspécifiques (Niederle et al. 2016).

Elles sont, dans 60% des cas, asymptomatiques et de découverte fortuite.

Les symptômes dépendent généralement du siège, de la taille de la tumeur ainsi que de sa différenciation tumorale.

Les signes fonctionnels ou symptômes les plus fréquemment retrouvés sont :

- Douleurs abdominales,
- Altération de l'état général (anorexie, asthénie, amaigrissement),
- Nausées, vomissements,
- Météorisme abdominal,
- Syndrome occlusif en cas de masse tumorale volumineuse.

Il est fréquent de retrouver un syndrome carcinoïde (20 à 30%), associé à la présence de métastases hépatiques ; celui-ci peut se manifester chez tous les patients atteints de NNE mais il est plus couramment retrouvé en présence de NNE intestinales.

Le syndrome carcinoïde se manifeste par un ensemble de symptômes liés à l'hypersécrétion de sérotonine, majoritairement, et d'autres peptides (histamine,

bradykinine...) dans le sang ; il se caractérise par des signes fonctionnels et symptômes typiques :

- Flush, typique chez environ 90% des patients, qui se caractérise par une coloration rouge ou violacée touchant le visage et la partie supérieure du tronc, d'apparition brutale, favorisée par le stress et la prise d'alcool,
- Diarrhées, chez 70% des patients, qui peuvent être de type moteur et sécrétoire,
- Tachycardie et diminution de la pression artérielle,
- Autres atteintes : cardiopathie carcinoïde, bronchoconstriction pulmonaire...

Seulement 20% des tumeurs digestives sont fonctionnelles ce qui implique qu'elles peuvent sécréter :

- Des hormones,
- Des facteurs de croissance,
- Des neurotransmetteurs,

A l'origine de symptômes cliniques typiques et bruyants (**Figure 58**) :

PRINCIPALES SECRETIONS HORMONALE	PRINCIPAUX SYNDROMES SECRETOIRES	SIEGES LES PLUS FREQUENTS
Sérotonine	Syndrome carcinoïde	Iléon Bronches
Insuline	Insulinome	Pancréas
Glucagon	Glucagonome	Pancréas
Gastrine	Gastrinome	Duodénum Pancréas
<i>Vasoactive intestinal peptide (VIP)</i>	Vipome	Pancréas Surrénale (phéochromocytome)
Somatostatine	Somatostatinome	Pancréas Duodénum Bronches
Cortisol	Syndrome de Cushing	Bronches Thymus Pancréas

Figure 58 Principaux syndromes sécrétoires des NNE fonctionnelles

Plus fréquentes, les NNE non fonctionnelles auxquelles appartiennent les NNE intestinales, sont souvent silencieuses.

Généralement de découverte fortuite, elles se manifestent par des symptômes cliniques aspécifiques pouvant passer inaperçus, ce qui peut être à l'origine d'un important retard diagnostique (Klöppel, Perren, et Heitz 2004).

L'intensité de ces symptômes va être proportionnelle à la progression et à l'invasion tumorale (syndrome de masse) ce qui explique leur découverte à des stades avancés de la maladie.

I.3. CLASSIFICATION

L'analyse anatomo-pathologique de la tumeur doit être obtenue (par biopsie ou chirurgie) avant tout traitement médicamenteux afin d'obtenir le *grading* et le *staging*.

La dernière version adaptée de la classification OMS 2022 des NNE par la Société savante des maladies et cancers de l'appareil digestif (SNFGE) est résumée ci-dessous (Figure 59) :

	Ki-67*	Indice mitotique**
Grade 1 (G1)	< 3%	< 2
Grade 2 (G2)	3% - 20%	2 - 20
Grade 3 (G3)	> 20%	> 20
	Grade	Différenciation
TNE G1	G1	Bien différencié
TNE G2	G2	Bien différencié
TNE G3	G3	Bien différencié
CNE***	G3	Peu différencié, à grandes ou petites cellules
MINEN		Néoplasie mixe neuroendocrine - non neuroendocrine

*CNE, carcinome neuroendocrine ; TNE, tumeur neuroendocrine. * L'index de prolifération Ki-67 est déterminé par comptage d'au moins 500 cellules dans les régions de plus fort marquage (hot-spots) pour les biopsies et 2000 cellules pour les pièces opératoires. ** L'indice mitotique doit être exprimé comme le nombre de mitoses par 2 mm² (équivalent à 10 champs à fort grossissement à x40), déterminé par le comptage de 50 champs de 0,2 mm² (soit une aire totale 10 mm²). Le grade final est basé sur celui des deux indices de prolifération classant la lésion dans la catégorie de plus haut grade. *** Les CNE sont considérés comme de haut grade (G3) par définition.*

Figure 59 Classification 2022 des Néoplasies Neuroendocrines selon l'OMS. Adapté et modifié d'après (Rindi et al. 2022)

Cette classification permet de différencier les NNE en fonction de leur degré de différenciation cellulaire par l'utilisation d'outils immunohistochimiques ; ainsi, les NNE-GEP peuvent être classées en tant que NNE G1, G2 ou CNE G3 composées respectivement de cellules tumorales bien, moyennement ou peu différenciées (Klöppel 2017).

Les NNED font également l'objet d'une classification *tumor nodes metastasis* (TNM), mise à jour par l'*Union for International Cancer Control* (UICC) en 2022 (« TNM Classification of Malignant Tumours, 8th Edition | UICC », s. d.) ; celle-ci intègre les particularités des NNED à la classification TNM classique conçue sous l'égide de l'*European Neuro Endocrine Tumor Society* (ENETS) (Niederle et al. 2016) et permet d'établir une stadification tumorale (**Figure 60**) :

T	TUMEUR ENDOCRINE PRIMITIVE
TX	Tumeur primaire non évaluable
T0	Pas de tumeur primitive décelable
T1	Tumeur envahit la muqueuse ou la sous-muqueuse et est < 1cm
T2	Tumeur envahit la musculature ou > 1cm
T3	Tumeur envahit la sous séreuse (respecte la séreuse)
T4	Tumeur envahit la séreuse ou d'autres organes/structures adjacents
N	ADENOPATHIE(S) REGIONALE(S)
NX	Adénopathie(s) régionale(s) non évaluable(s)
N0	Absence de métastase ganglionnaire
N1	Présence de métastases ganglionnaires régionales < 12 ganglions
M	METASTASE(S)
MX	Métastase(s) à distance non évaluable(s)
M0	Absence de métastase à distance
M1	Présence de métastase(s) à distance M1a : hépatiques, M1b : dans au moins un site extra-hépatique, M1c : hépatiques et osseuses

Figure 60 Classification TNM des NNE du jéjunum/iléum d'après l'UICC 2022 (« TNM Classification of Malignant Tumors, 8th Edition | UICC », s. d.)

II. DIAGNOSTIC DES TUMEURS NEUROENDOCRINES

Tous les dossiers de patients atteints de NNE doivent être discutés en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) régionale puis soumis au Réseau National de référence de prise en charge des Tumeurs Neuroendocrines malignes sporadiques et héréditaires (RENATEN).

Le réseau RENATEN comprend dix-sept centres experts répartis sur l'ensemble du territoire français, spécialisés dans la prise en charge des patients porteurs de NNE ; chaque dossier patient y est soumis afin de vérifier les critères d'éligibilité à un traitement et de discuter des alternatives thérapeutiques.

Le réseau RENATEN est la branche clinique du Groupe d'étude des Tumeurs Endocrines (GTE).

Le GTE est une société savante créée en 2002 qui réunit les différentes spécialités impliquées dans la prise en charge des NNE : anatomopathologistes, biologistes, chirurgiens, endocrinologues, gastroentérologues, généticiens, médecins nucléaires, oncologues et radiologues (« ENDOCAN - RENATEN », s. d.).

A ses côtés, on retrouve les réseaux nationaux d'expertise pour le diagnostic anatomopathologique et génétique des néoplasies neuroendocrines (TENpath et TENgen).

II.1. IMAGERIE MEDICALE

Face à la grande diversité des modes de présentation des NNE : type, grade, fonctionnelle ou non, les besoins en terme d'imagerie sont très divers (van Essen et al. 2014) et toutes les caractéristiques de ces tumeurs doivent être prises en compte pour orienter le choix de l'imagerie.

II.1.1. TECHNIQUES CONVENTIONNELLES

Au même titre que les examens biologiques de routine et comme dans toute nouvelle démarche diagnostique en cancérologie, un bilan d'imagerie conventionnelle est en premier lieu réalisé.

L'imagerie conventionnelle comprend, selon les recommandations publiées dans le Thésaurus National de Cancérologie Digestive (TNCD) en 2023 et réalisé sous l'égide de la SNFGE, les examens suivants :

➤ **Endoscopie/iléo-coloscopie**

Ce sont les examens d'imagerie conventionnelle indispensables avant tout acte chirurgical pour :

- Rechercher la lésion primitive,
- Apprécier son extension,
- Réaliser des biopsies.

L'iléo-coloscopie permet notamment de rechercher un cancer du côlon associé.

- **Scanner thoraco-abdomino-pelvien** avec réalisation d'un temps artériel tardif dans le but de rechercher un autre cancer associé.
- **IRM hépatique** ou scanner hépatique 3D dans le cas de présence de métastases résécables afin d'évaluer l'étendue de l'invasion hépatique.
- **Scintigraphie osseuse**, couplée au scanner, en cas de suspicion de métastase(s) osseuse(s) non retrouvée(s) par les autres examens d'imagerie.

II.1.2. TECHNIQUES MOLECULAIRES

L'imagerie moléculaire joue un rôle clé dans la prise en charge des NNE intestinales du fait de leur richesse en SSTR et plus particulièrement en récepteurs SST2 (J. Reubi et al. 2001).

De nombreux progrès ont permis de mettre au point de nouvelles techniques d'imagerie fonctionnelles qualifiées de « moléculaires » or celles-ci sont particulièrement adaptées au diagnostic et à la prise en charge des NNE puisqu'elles utilisent des aSST radiomarqués.

Il existe plusieurs techniques d'imagerie dites « nucléaires » utilisant des traceurs radioactifs :

- La scintigraphie,
- La tomographie par émission mono-photonique (TEMP),
- La tomographie par émission de positons (TEP).

Les radionucléides utilisés pour la scintigraphie émettent des rayons gamma (γ) d'énergies bien définies et sont détectés par les cristaux de scintillation dans une caméra gamma (van Essen et al. 2014).

Le choix de l'imagerie fonctionnelle est à discuter en RCP or dans un premier temps il sera orienté selon le grade tumoral établi par la classification OMS 2017.

Ainsi, pour les NNE bien différenciées (G1 ou G2), l'imagerie moléculaire utilisant les analogues de la somatostatine sera privilégiée pour établir le stade de la tumeur et évaluer l'expression des récepteurs SST2, marqueur pronostique et de sélection pour la PRRT ; pour les NNE peu ou pas différenciées (G3) et dès que l'indice du ki67 est supérieur à 10-15%, le TEP-18 fluoro désoxy-glucose (FDG) sera utilisé.

L'imagerie moléculaire va permettre de :

- **Localiser la lésion primitive** et caractériser la tumeur,
- **Confirmer la nature** différenciée (SST2+) / non différenciée (SST2- et FDG +),
- **Permettre un bilan d'extension** lésionnel corps entier,
- **Aider à la décision thérapeutique** et permettre une évaluation pronostique (en fonction du profil SST2+ ou SST2-).

Voici par ailleurs, les différents examens d'imagerie moléculaire réalisables :

- **La scintigraphie à l'octreotide** ou Octréoscan
L'octreotide, analogue de synthèse de la SST, en raison de son fort taux d'absorption, fut en 1989 le premier aSST radiomarqué utilisé couplé à une technique de scintigraphie pour visualiser *in vivo* des tumeurs SST+ (Ep et al. 1993; 1989).
- **La TEP-Di-hydroxy-phénylalanine (DOPA)** est utilisée pour les tumeurs bien différenciées.

- **La TEP-18FDG** est utilisée pour les tumeurs peu différenciées ou en cas de TEP-DOPA négatif.

- **La TEP-[⁶⁸Ga-DOTA⁰⁻¹Nal³] octreotide (⁶⁸GA-DOTANOC)**

Une étude utilisant le ⁶⁸Ga-DOTANOC a mis en évidence une sensibilité de 92% et une spécificité de 98% (Ambrosini et al. 2012) de cette technique, supérieure au Ga-DOTATOC et au Ga-DOTATATE précédemment utilisés. L'avantage que présente le TEP ⁶⁸Ga-DOTANOC est donc de pouvoir détecter de plus petites lésions.

Ainsi, l'Association Européenne de Médecine Nucléaire a publié des directives de procédure pour l'imagerie au ⁶⁸Ga-DOTA-SSA (**Figure 61**) (I et al. 2010) :

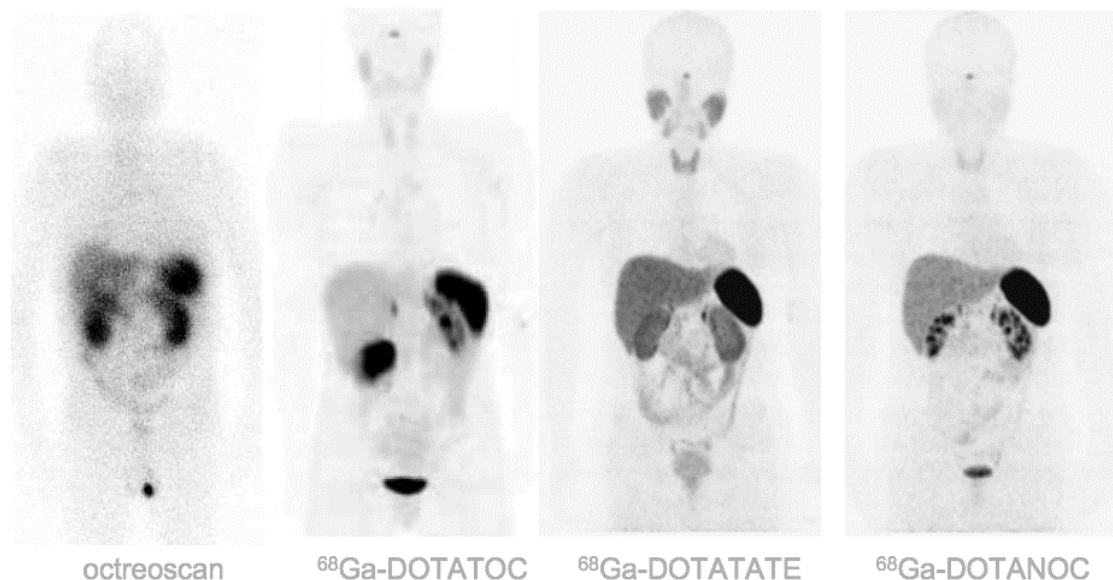


Figure 61 Exemple d'imagerie moléculaire utilisant les aSST radiomarqués (« Imagerie TEP aux analogues de la somatostatine marqués au 68 Ga dans les Tumeurs endocrines digestives bien différenciées - PDF Free Download », s. d.)

L'imagerie moléculaire présente de nombreux avantages, le gain en termes de performance diagnostique est indéniable, la TEP apportant une meilleure résolution spatiale et possédant une meilleure sensibilité par rapport à la TEMP, lorsqu'elle est combinée à l'utilisation de traceurs plus performants ayant une meilleure affinité pour les SSTR (Mm et al. 2011; A et H 2008) ; ceci est lié au choix de l'aSST ainsi qu'au radio-marquage par le ⁶⁸Gallium qui présente un spectre d'affinité aux récepteurs de la somatostatine plus large.

Au cours de ces dernières années, l'imagerie est devenue une des pierres angulaires de la prise en charge des NNE dans le cadre du diagnostic ou pour orienter la prise en charge thérapeutique.

II.2. BIOMARQUEURS

Le bilan biologique outre le bilan classique (ionogramme sanguin, exploration de la fonction rénale, formule sanguine) comprend l'évaluation de biomarqueurs spécifiques propres à ce type de tumeur.

Ces biomarqueurs jouent un rôle dans l'évaluation de la réponse tumorale, la surveillance de la progression de la maladie et sont utilisés comme indicateurs pronostiques (Je et B 2003).

Cependant, une élévation isolée de ces marqueurs n'est généralement pas suffisante pour établir un diagnostic sans confirmation anatomopathologique.

Parmi ces biomarqueurs, on distingue les marqueurs « généraux », utilisés pour l'ensemble des NNE, des marqueurs spécifiques à certains types de tumeurs comme les NNE fonctionnelles.

L'expression de ces marqueurs par les clones tumoraux démontre la conservation du phénotype endocrine par les NNED, que ce soit sur le plan structurel ou fonctionnel.

II.2.1. CHROMOGRANINE A

La Chromogranine A (CgA) est le biomarqueur neuroendocrinien tumoral de référence, c'est un marqueur sensible, précis à 60-85% pour les NNED (Irvin M Modlin et al. 2008) mais cependant non spécifique ; son taux est augmenté chez 50 à 100% des patients atteints de NNE (Eriksson, Oberg, et Stridsberg 2000).

Il est à l'heure actuelle le meilleur marqueur pour le diagnostic, le suivi mais également le pronostic de la maladie car son taux est directement corrélé à la progression tumorale et à la réponse thérapeutique (S et al. 2010; R et al. 2008).

La CgA est une glycoprotéine de quatre cent trente-neuf acides aminés codée par le chromosome 14, largement présente dans les granules de sécrétion des cellules neuroendocrines et est sécrétée par la quasi-totalité des NNED.

Pour les tumeurs bien différenciées, les taux plasmatiques de CgA peuvent être directement corrélés à la taille de la tumeur et à l'envahissement des tissus adjacents, notamment en présence de métastases hépatiques.

Son dosage est réalisé par une méthode immunologique *d'enzyme linked immunosorbant assay sandwich* (ELISA), le seuil de pathogénicité étant fixé à 100ng/mL (ou 200U/L).

De plus, son augmentation au cours du suivi de l'évolution tumorale est un facteur de mauvais pronostic (**Figure 62**) :

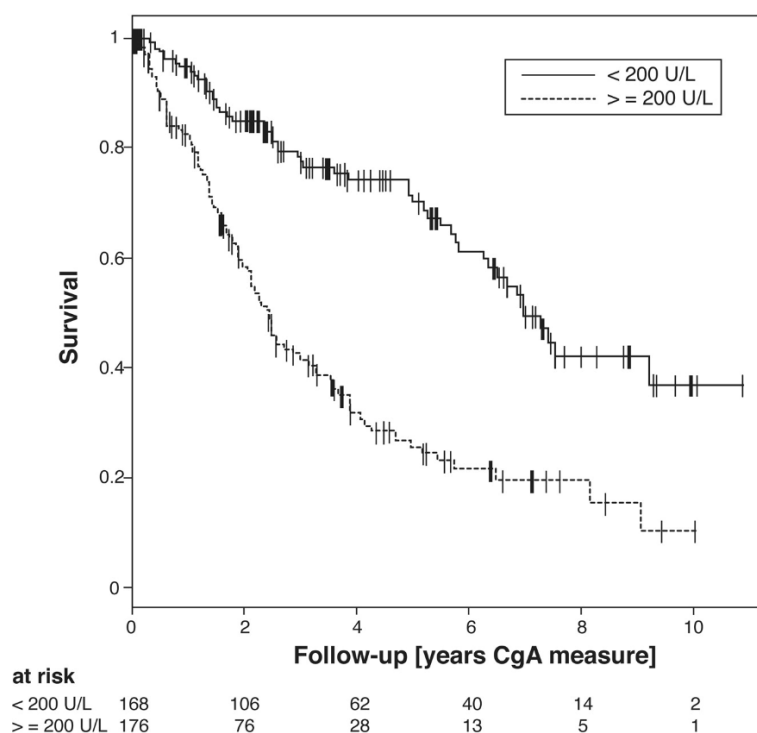


Figure 62 Diagramme de Kaplan-Meier comparant la survie de patients atteints de NNED en fonction du taux de CgA (R et al. 2008)

Le CgA reste cependant un marqueur controversé en raison de sa faible spécificité. Son élévation peut correspondre à une prolifération non spécifique (10 à 35%) et sa valeur peut être surestimée dans les situations suivantes : traitement par inhibiteurs de la pompe à proton (P. M et al. 2005), gastrite chronique, insuffisance rénale,

insuffisance hépatique, maladie de Parkinson, hypertension artérielle non traitée, grossesse, traitement par stéroïdes ou glucocorticoïdes, épisode infectieux...

A contrario, chez les patients traités par les aSST, le taux de CgA circulant peut être abaissé et son utilité questionnée chez ce groupe de patients (S et al. 2010).

II.2.2. ACIDE 5-HYDROXY INDOLE ACETIQUE

L'acide 5-hydroxy-indole acétique (5-HIAA) est le biomarqueur spécifique du syndrome carcinoïde.

Les 5-HIAA sont des produits de dégradation issus du métabolisme hépatique de la sérotonine et éliminés par voie urinaire (Meijer et al. 2000).

Le dosage des 5-HIAA est réalisé sur sérum, urines de la nuit ou urines de 24h, il présente une sensibilité de 70 à 75% et une spécificité proche de 100% pour le diagnostic des NNE intestinales.

Pour le syndrome carcinoïde, ce dosage présente une excellente sensibilité de l'ordre de 100% et une très bonne spécificité de l'ordre de 85 à 90% (De Mestier et al. 2021; Jm et Tm 1986).

Il présente certains inconvénients concernant les conditions de recueil avec des restrictions alimentaires strictes 48h avant le dosage (excluant le café, thé, la banane, les fruits secs, l'avocat, les mollusques...) afin d'éviter des faux positifs (D et al. 2009).

II.2.3. BIOMARQUEURS MOLECULAIRES

L'identification de biomarqueurs sensibles et robustes pour établir le diagnostic, suivre la progression de la maladie et surveiller l'efficacité du traitement représente le principal challenge de ces dernières années, le retard au diagnostic des NNE entraînant des répercussions sur l'efficacité du traitement.

L'enjeu actuel est de proposer des outils capables de fournir un diagnostic précoce et un suivi fiable de l'évolution de la maladie, il existe donc un besoin crucial en biomarqueurs de NNE sensibles et spécifiques (K et al. 2015), plus informatifs et précis.

➤ Analyse de transcrits de gènes

Au cours de ces dernières décennies, le paysage thérapeutique et génomique des NNE a été largement étudié (C. J et al. 2014), la découverte de mutations et d'anomalies d'expression de certains gènes a ouvert des perspectives pour l'utilisation de nouveaux biomarqueurs.

Qui plus est, l'étude d'une empreinte moléculaire a déjà bien été investiguée et utilisée dans d'autres cancers tel que le cancer du sein avec le *MammaPrint*® qui étudie une signature moléculaire de soixante-douze gènes.

Les *microArrays* sont utilisés en cancérologie pour le typage tumoral en fonction des profils d'expression génique, permettant de cribler simultanément plusieurs milliers de gènes et de fournir une signature moléculaire d'un type cellulaire donné ; Modlin *et al* ont mis au point, en 2013, une « signature moléculaire multi-transcrits » spécifique des NNE GEP, à partir d'un panel de cinquante-et-un gènes et réalisée sur biopsie liquide (**Figure 63**) (Irvin M. Modlin, Drozdov, et Kidd 2013) :

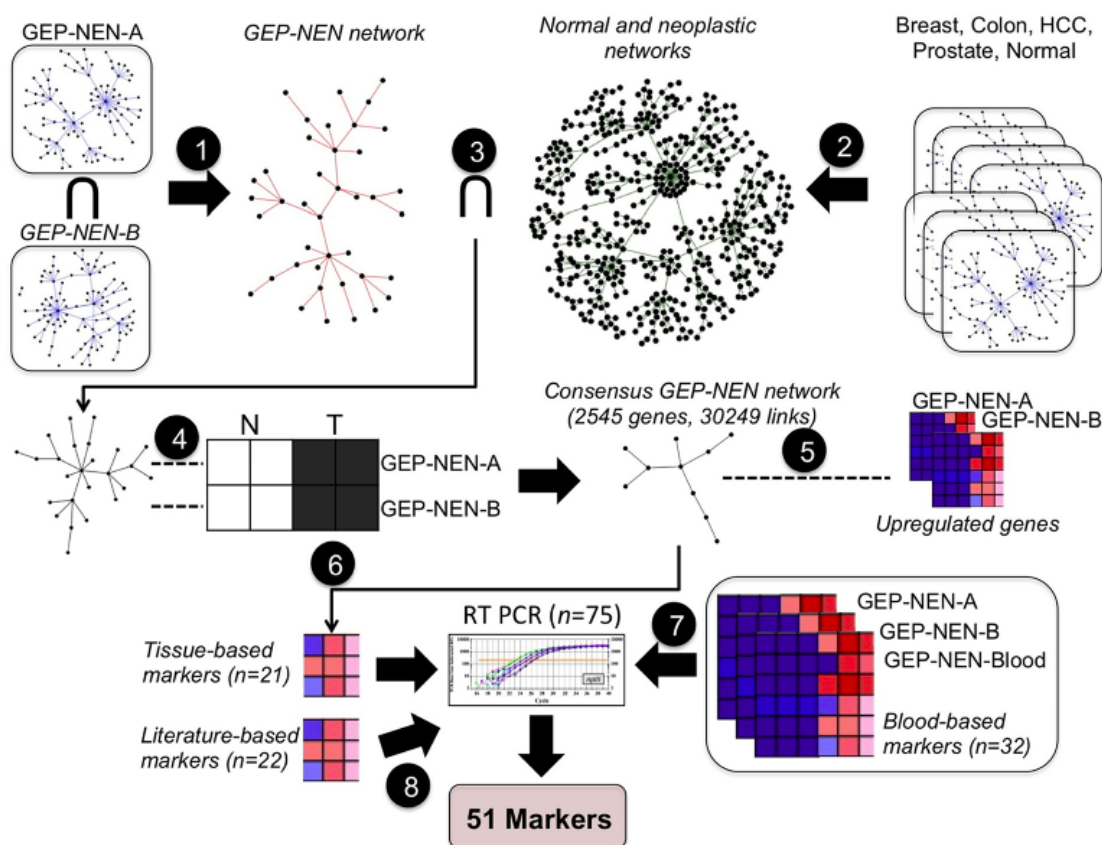


Figure 63 Identification des 51 marqueurs moléculaires des NNE (Irvin M. Modlin, Drozdov, et Kidd 2013)

Ils ont d'abord analysé les données de profils d'expression géniques issues de tissus sains et de tissus tumoraux provenant essentiellement de cancers hépatiques, du sein, du colon, de la prostate et du poumon, obtenus par *microArrays* et extraites à partir de la base de données *ArrayExpress* (Parkinson et al. 2009).

Puis ils ont analysé des données provenant de *microArrays* réalisés sur des tissus normaux et NNE :

- Le GEP-NEN-A, sur muqueuse intestinale normale, NNE primaires et NNE métastatiques (K. M et al. 2007),
- Le GEP-NEN-B, sur muqueuse iléale normale, NNE de l'intestin moyen, et métastases hépatiques (Leja et al. 2009).

Et enfin l'expression de gènes provenant de quatorze échantillons sanguins de sujets sains et de sujets atteints de NNE GEP par *microArrays* (S. J et al. 2005).

Ils ont ensuite réalisé une analyse bio-informatique de l'ensemble de ces données, ce qui a permis de présélectionner soixante-quinze gènes et de définir trois panels de potentiels gènes d'intérêt :

- Un panel composé de gènes surexprimés dans les tissus de NNE (coexprimés dans les GEP-NEN A et B),
- Un panel composé de gènes surexprimés dans le sang de patients atteints de NNE (coexprimés avec les GEP-NEN A et B),
- Un panel issu de treize gènes décrits dans la littérature tels que les gènes SSTR (Muscarella et al. 2011; K. M et al. 2006).

Pour finir, ces trois panels ont été analysés par RT-PCR quantitative (RT-qPCR) sur des échantillons sanguins de sujets sains et de sujets atteints de NNE.

Ainsi l'étude du profil d'expression des soixante-quinze gènes a permis d'identifier cinquante-et-un gènes d'intérêt.

Parallèlement, l'analyse bio-informatique des ontologies fonctionnelles a permis de mettre en évidence une surexpression des gènes impliqués dans les voies du métabolisme cellulaire ; cette signature moléculaire a ensuite été intégrée au NETest (Irvin M. Modlin et al. 2018).

Ce test, qualifié de « multi-analytes », fait l'analyse des profils d'expression des cinquante-et-un gènes du panel à partir d'ARNm circulants par RT-qPCR qui sont ensuite intégrés à deux algorithmes mathématiques distincts non explicités par les auteurs (**Figure 64**) :

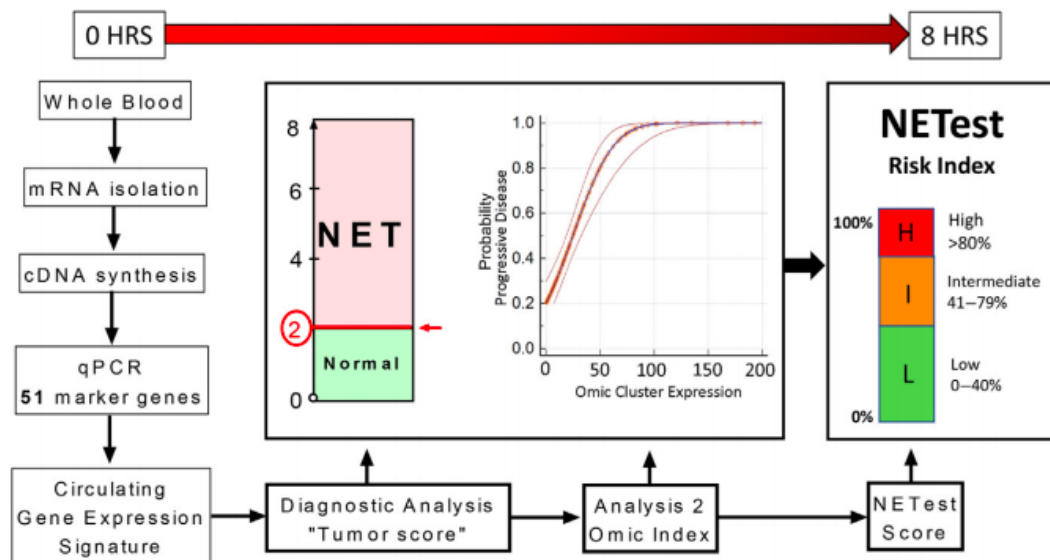


Figure 64 Principe du NETest (Irvin M. Modlin et al. 2018)

Le « *tumor score* » identifie si l'échantillon est une NNE ou non (score 0–8) ; les échantillons notés de 0 à 2 sont classés comme normaux et ceux de 3 à 8 sont classés comme des NNE.

La deuxième analyse « *omic index* », évalue l'expression de gènes biologiquement pertinents impliqués dans les voies de développement des NNE ; ainsi, les valeurs omiques supérieures ou égales à 50 ont une probabilité d'identification en tant que maladie progressive supérieure à 75%.

Ces deux ensembles d'information sont condensés en un seul score, qui est mis à l'échelle 0 à 100%, le « *NETest score* » ; cette mise à l'échelle est fonction de la pondération du score de classification (analyse 1), par l'expression biologique liée au statut de la maladie (analyse 2).

Le NETest détermine pour chaque patient la catégorie de risque tumoral :

- Faible <40%,
- Modéré 40% à 79%,

- Elevé >80% d'activité de la maladie.

Il présente une excellente sensibilité et spécificité (> 95%) pour la détection NNED et se veut nettement plus précis que le dosage du CgA lui-même qualifié de test « mono-analyte ».

Ce test permet de fournir une évaluation multidimensionnelle (grâce à l'analyse de groupes de gènes) pour diagnostiquer la NNE et évaluer le statut de la maladie.

➤ Analyse des miARN

Autres marqueurs moléculaires d'intérêt, les miARN participent à la régulation des gènes au niveau post-transcriptionnel.

Plusieurs miARN agissent soit comme oncogènes, soit comme suppresseurs de tumeurs, influençant ainsi la croissance et la dissémination des tumeurs.

Jusqu'à récemment, les données sur les profils d'expression de miARN dans les NNED étaient encore rares mais les miARN sont aujourd'hui considérés comme de potentiels biomarqueurs d'intérêt (Zimmermann et al. 2018) grâce à l'étude de leurs profils d'expression en fonction du site de la tumeur primitive, de la présence ou non de métastases et de leurs sites métastatiques (**Figure 65**) :

SITE PRIMAIRE	PANCREAS	ILEUM	APPENDICE	RECTUM
miRNA sur-exprimés	let-7e, miR-126, miR-127, miR-30a-3p, miR-409-3p, miR-539, miR-652, miR-95	Let-7g, miR-16, miR200a, miR-320, miR-324-3p, miR-331, miR-342-3p, miR-744	miR-125b	miR-151-3p
miRNA sous-exprimés	miR-155, miR-193b, miR-28-3p, miR-642, miR-886-5p		miR-200c, miR-223, miR-24	

Figure 65 Profil d'expression de certains miRNA dans les NNED

De nombreuses études tendent aujourd'hui à établir le profil miARN des NNE intestinales à la recherche de nouveaux biomarqueurs pronostiques (Arvidsson et al. 2018).

Cependant, la mesure de miARN reste complexe par son utilisation en pratique clinique courante (Malczewska et al. 2018).

De surcroit, ces biomarqueurs moléculaires ne semblent pas être affectés par l'alimentation, l'âge, le sexe, l'origine ethnique ou l'utilisation à long terme des inhibiteurs de la pompe à protons (IPP), contrairement à la CgA ou à la 5-HIAA (Irvin M. Modlin, Drozdov, et Kidd 2014).

Cela conforte l'idée que les biomarqueurs moléculaires peuvent fournir une information précise et sensible pour identifier les NNE et évaluer la progression de la maladie.

Ainsi toutes ces études soulignent un besoin crucial en biomarqueurs de haute précision pour le diagnostic et la gestion des NNE.

La mise au point d'un test « multidimensionnel » capable de fournir des informations sur le diagnostic, le pronostic, le volume de la tumeur et la réactivité au traitement tout en tenant compte des spécificités propres de chaque tumeur (*grading* et *staging*) serait un outil majeur dans la prise en charge de ces tumeurs complexes chez ces patients lourds.

Or actuellement aucun test ne répond à ces besoins ou est disponibles pour tous les services cliniques et les données concernant l'expression d'ARNm et miARN dans les NNE sont encore relativement rares comparées à divers autres types de tumeurs.

II.3. ANATOMO-PATHOLOGIE

L'obtention d'une analyse histologique est bien évidemment indispensable dans la démarche diagnostique et rejoint la classification vue au paragraphe I.3.

III. TRAITEMENT DES TUMEURS NEUROENDOCRINES

III.1. ROLE DE LA SOMATOSTATINE

III.1.1. SOMATOSTATINE ET ANALOGUES

La SST a été découverte en 1973 (Guillemin et Gerich 1976) ; il s'agit d'une hormone protéique inhibitrice de l'hormone de croissance *growth hormone releasing hormone* (GHRH) qui existe sous deux formes :

- Une forme de quatorze acides aminés majoritairement sécrétée au niveau digestif,
- Une forme de vingt-huit acides aminés prédominante au niveau du système nerveux.

Outre sa sécrétion au niveau de l'hypothalamus elle est également sécrétée au niveau gastro-intestinal par les cellules D, réparties de manière diffuse au niveau du tractus digestif mais leur quantité diminue de l'estomac jusqu'au colon.

La principale action de la somatostatine est d'inhiber les sécrétions exocrines et endocrines du tractus digestif mais elle a diverses autres fonctions (**Figure 66**) (Lamberts, Krenning, et Reubi 1991) :

INHIBITION DES SECRETIONS EXOCRINES	INHIBITION DES SECRETIONS ENDOCRINES	AUTRES ACTIONS
⇒ Salivaire : amylase ⇒ Gastrique : acide chlorhydrique ⇒ Hépatique : bile ⇒ Pancréatique : amylase, trypsine, lipase	⇒ Digestives : sécrétine, VIP... ⇒ Pancréatiques : glucagon, insuline.	⇒ Inhibition de la motilité gastrique et intestinale ⇒ Hémodynamiques : diminution du flux sanguin splanchnique, diminution de la pression du système porte ⇒ Contrôle de la prolifération cellulaire dans les tissus normaux et tumoraux

Figure 66 Modes d'action de la SST (Harris 1994)

Les aSST présentent certains avantages par rapport à la somatostatine naturelle (Harris 1994), ils possèdent une demi-vie plus longue et se fixent avec une plus forte affinité aux récepteurs SST2.

Historiquement, l'Octreotide fut le premier analogue de la somatostatine développé.

Leurs mécanismes d'action antitumoraux sont décrits ci-dessous (Figure 67) (Mestier et al. 2014) :

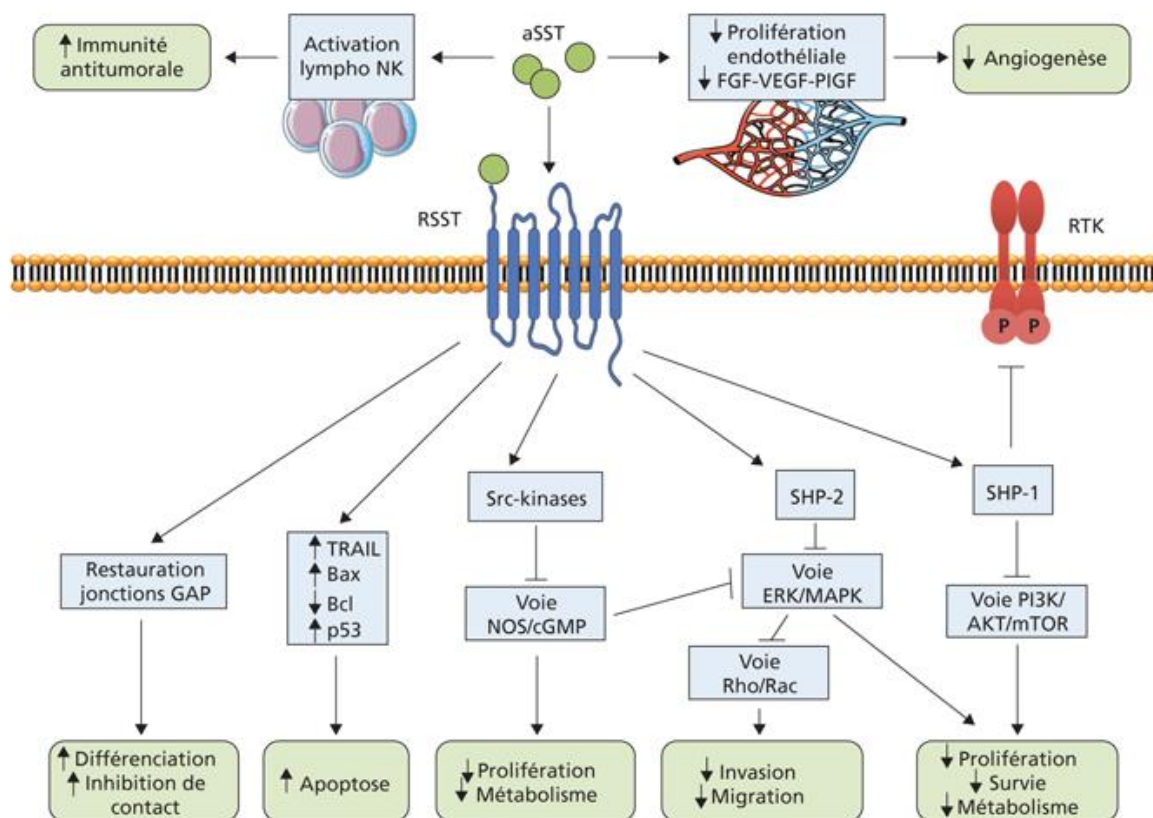


Figure 67 Mécanismes directs et indirects de l'activité antitumorale des aSST dans les NNED (Mestier et al. 2014)

III.1.2. RECEPTEURS DE LA SOMATOSTATINE

Les SSTR sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires (Figure 68) (Weckbecker et al. 2003) :

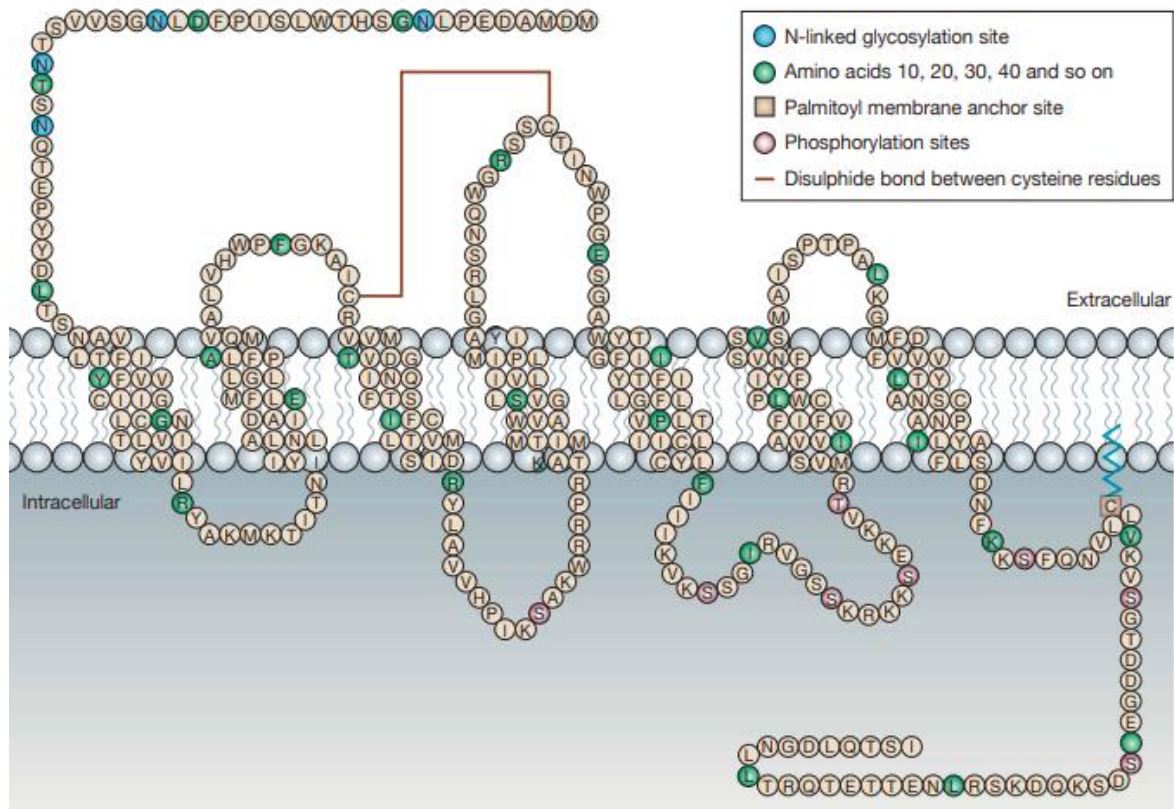


Figure 68 Structure des SSTR avec l'exemple du sous-type SSTR2A (Weckbecker et al. 2003)

Au début des années 1990, cinq sous-types de SSTR ont été clonés et caractérisés, SST1 à SST5 (Hoyer et al. 1995) ; ces cinq SSTR diffèrent par leur capacité à internaliser le ligand lié au récepteur. Or cette étape d'internalisation va jouer un rôle clé dans le choix de la RIV par PRRT.

Une des principales caractéristiques des NNE est leur richesse d'expression en SSTR ; en effet, ceux-ci sont présents à la surface de 75-90% d'entre elles (Hofland et Lamberts 2003).

La majorité des tumeurs dites SST+ expriment simultanément plusieurs sous-types de SSTR.

Il existe une variation considérable de l'expression des sous-types de SSTR entre les différents types de tumeurs et entre les tumeurs du même type, SST2 restant cependant le sous-type le plus largement retrouvé dans les cellules tumorales.

Les implications cliniques de la présence des SSTR dans les NNE sont multiples, que ce soit comme marqueur prédictif d'efficacité d'un traitement par aSST ou en tant que

marqueur diagnostique, pronostique et comme cible radiothérapeutique potentielle (J. C. Reubi et al. 1992).

Ainsi, la richesse d'expression de ces récepteurs, la connaissance de leur mode d'expression et de fonctionnement des différents sous types dans les NNE ont permis d'élargir les possibilités thérapeutiques en ciblant spécifiquement les SSTR.

La « positivité SSTR », notamment en SST2, des NNE intestinales en font une cible de choix pour le développement de nouvelles molécules tels que les aSST radiomarqués, utilisés dans le cadre diagnostique (imagerie moléculaire) ou en thérapeutique par PRRT (J. Reubi et al. 2001).

III.2. TRAITEMENT DES TUMEURS NEUROENDOCRINES INTESTINALES

Il existe différentes alternatives thérapeutiques pour la prise en charge de ce groupe complexe de tumeur.

III.2.1. CHIRURGIE

Actuellement, la chirurgie est le seul traitement curatif pour les tumeurs localisées mais 40% des patients présentent des métastases au diagnostic.

Le tableau ci-dessous présente les différentes options thérapeutiques proposées selon les caractéristiques des NNE (**Figure 69**) :

CARACTERISTIQUES	NNE BIEN DIFFERENCIEE	NNE MOYENNEMENT DIFFERENCIEE	NNE PEU DIFFERENCIEE OU CNE
GRADE*	G1	G2	G3
INDEX DU Ki 67 ET/OU INDEX MITOTIQUE*	Ki67 < 3% et < 2 mitoses	Ki67 < 3-20% ou 2-20 mitoses	Ki67 > 20% ou > 20 mitoses
EVOLUTION CLINIQUE ET RESULTATS TDM ou IRM	Progression lente	Intermédiaire	Progression rapide
NOMBRE DE LESIONS TEP- FDG+	Faible	Intermédiaire	Elevée
EXPRESSION SSTR	Élevée	Intermédiaire	Faible
PRONOSTIC	Bon	Moyen	Mauvais
TRAITEMENT DE 1 ^{ERE} INTENTION	Chirurgie curative		
TRAITEMENT DE 2 ^{EME} INTENTION	⇒ Chirurgie : réduction de la tumeur primitive +/- métastases ⇒ aSST** ⇒ Thérapie ciblée : Everolimus, Sunitinib ⇒ PRRT** ⇒ Chimiothérapie ⇒ Interféron ⇒ Chimio embolisation		⇒ Chimiothérapie

*selon les recommandations de l'OMS 2019 thérapeutiques (« Référence Tumeurs neuroendocrines du grêle », s. d.) et de l'ENETS (van Essen et al. 2014)

**condition : surexpression des récepteurs à la SST

Figure 69 Caractéristiques des NNE et options thérapeutiques (« Référence Tumeurs neuroendocrines du grêle », s. d.)

III.2.2. PRRT AU ¹⁷⁷LU-DOTATATE

Nous nous intéresserons ici au traitement des NNE intestinales bien différenciées (G1 ou G2) localement avancées ou métastatiques, qui représentent nos tumeurs d'intérêt et dont l'arbre décisionnel est présenté ci-dessous (**Figure 70**) :

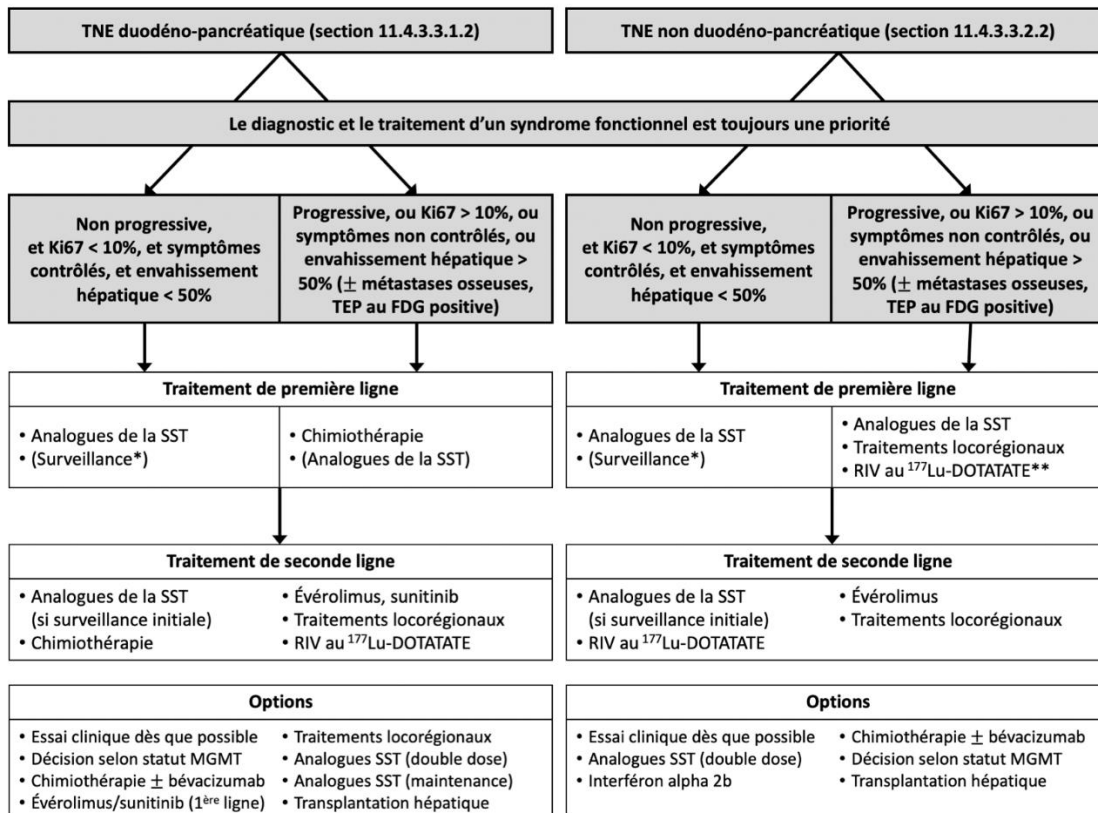


Figure 70 Arbre décisionnel d'aide à la prise en charge des NNE intestinales métastatiques (selon TNCD SNFGE 2023 et PRRT)

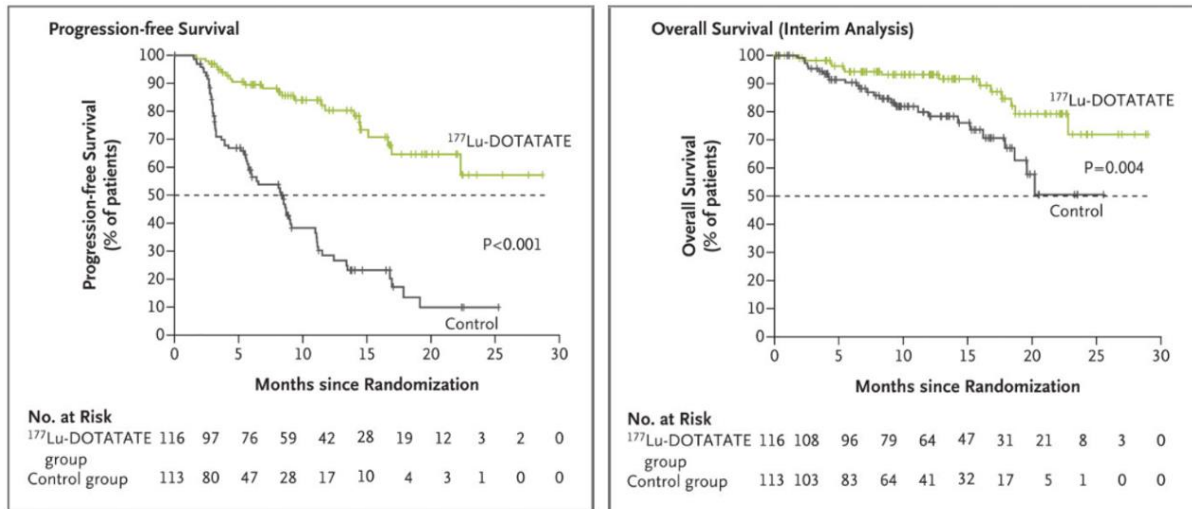
La RIV par PRRT est une forme de radiothérapie systémique qui permet la délivrance ciblée d'un radionucléide à des cellules tumorales exprimant un haut niveau de récepteurs à la somatostatine sans irradier le tissu sain environnant (Cives et Strosberg 2017; Kwekkeboom et al. 2008).

Il existe à ce jour peu d'options thérapeutiques pour la prise en charge des patients atteints de NNE avancées, progressives sous traitement standard par aSST.

L'essai clinique randomisé de phase III NETTER-1 a montré un haut niveau de preuve dans l'évaluation de l'efficacité et l'innocuité du ¹⁷⁷Lu-DOTATATE chez des patients atteints de NNE inopérables, bien différenciées de l'intestin moyen (G1 et G2), métastatiques ou localement avancées, progressives selon les critères de *response evaluation criteria in solid tumors* (RECIST) (J. Strosberg et al. 2017; Eisenhauer et al. 2009) ; cette efficacité a été récemment soulignée par les résultats de NETTER-2 sur des NNE digestives G2 et G3.

Les deux principaux critères d'inclusion étaient la progression de la maladie sous aSST à dose standard et la surexpression des SSTR, révélée par scintigraphie.

L'objectif étant d'évaluer la survie sans progression (PFS) chez des patients traités par ¹⁷⁷Lu-DOTATATE et octreotide LP 30mg (¹⁷⁷Lu-Dotatate à la dose de 7,4 GBq toutes les 8 semaines pour 4 injections) versus octreotide LP à 60mg seul, un analogue pharmacologique de la SST (**Figure 71**) :



	¹⁷⁷ LU-DOTATATE + OCTREOTIDE <i>n</i> =111	OCTREOTIDE <i>n</i> =110	HAZARD RATIO (HR)
PFS A 20MOIS	65,2%	10,8%	HR = 0,21 IC95 (0,13 – 0,33)
TAUX DE REPONSE OBJECTIVE	18%	3%	p <0,001
RESULTATS PRELIMINAIRES DE SURVIE GLOBALE			HR = 0,4 p = 0,04

Figure 71 Résultats de l'essai clinique de phase III NETTER-1 illustrant le gain de survie sans progression apporté par le traitement ¹⁷⁷Lu-DOTATATE (J. Strosberg et al. 2017, 3)

La PRRT présente l'avantage d'être la seule option thérapeutique pour les NNE utilisant un biomarqueur prédictif d'efficacité clair, l'expression de SSTR (Van Essen et al. 2007).

Au préalable, les candidats à la PRRT sont sélectionnés à l'aide de la scintigraphie à l'octreotide (ou du TEP-⁶⁸Ga), ce qui permet de quantifier l'expression des SSTR de la tumeur (Kolasińska-Ćwikła et al. 2018).

Outre le niveau d'expression des récepteurs, la réponse tumorale ne dépend pas que de la dose reçue mais également de la masse tumorale, de la biologie du cancer et de son potentiel de résistance ainsi que du choix du radionucléide (émetteur beta ou gamma).

Par ailleurs, du fait de la toxicité au niveau de la moelle osseuse et du rein, les patients doivent présenter une fonction rénale normale avec un débit de filtration glomérulaire (DFG) > 50mL/min et une moelle fonctionnelle pour être éligibles à la PRRT.

Après fixation du radio peptide sur les SSTR, le complexe récepteur/radio peptide va être internalisé par endocytose, les produits de dégradation de ces radio peptides sont ensuite stockés dans le lysosome permettant la libération et la rétention de la radioactivité ; cette rétention cellulaire de la radioactivité conduit à une exposition prolongée des cellules tumorales (Capello et al. 2003).

Plusieurs facteurs permettent de déterminer la quantité d'absorption d'aSST radiomarqués (Hofland et Lamberts 2003) :

- La stabilité du radio peptide,
- Les niveaux d'expression et le type de SSTR exprimé chez le patient,
- L'affinité du radio peptide pour les SSTR exprimés,
- L'efficacité de l'internalisation,
- La rétention des radio-isotopes par la cellule tumorale,
- La masse du radiopharmaceutique injecté.

Le ^{177}Lu -DOTATATE se compose de trois éléments :

- **Un radionucléide isotope, le ^{177}Lu lutécium**

Le ^{177}Lu lutécium (^{177}Lu) est une beta-particule de moyenne énergie mais également gamma-émetteur de faible énergie.

Cette petite particule présente une meilleure absorption dans les plus petites tumeurs et sa toxicité est plus faible au niveau de la moelle osseuse et du rein ; elle possède par ailleurs une énergie maximale de 0,498MeV et une pénétration tissulaire de 1,7mm ainsi qu'une demi-vie égale à 162h.

Grace à son émission gamma, elle peut être utilisée en imagerie pour détecter les récepteurs à la somatostatine mais également pour la dosimétrie et la surveillance de la réponse tumorale (Pool et al. 2010), ses spécificités en faisant un outil théranostique efficace.

- **Un aSST, l'octreotate**, un analogue possédant une plus forte affinité pour les SST2.
- **Un chélateur, l'acide tétra-acétique de tétra-azacyclododécane (DOTA)**
Ce dernier va permettre de lier les deux éléments cités précédemment et de les stabiliser en formant un complexe.

Le ¹⁷⁷Lu-DOTATATE, a obtenu l'AMM en Octobre 2017, pour le traitement des NNED inopérables ou métastatiques, progressives, bien différenciées (G1 et G2) et exprimant des récepteurs de somatostatine chez les adultes.

Les recommandations de la HAS (« LUTATHERA (177Lutécium oxodotrétotide), radiopharmaceutique », s. d.) concernant le ¹⁷⁷Lu-DOTATATE (Lutathera®) vis-à-vis des NNE intestinales sont les suivantes : « La radiothérapie interne vectorisée avec Lutathera® est un traitement de deuxième intention, après progression de la maladie avec octréotide dans les NNE intestinales métastatiques, progressives, bien différenciées (G1, G2) et exprimant des récepteurs de somatostatine. Par ailleurs, la Commission recommande que pour les patients présentant des tumeurs d'emblée progressives ou avec une masse tumorale hépatique importante (>50%), l'utilisation de Lutathera®, sans avoir reçu de l'octréotide au préalable, pourra être discuté lors des RCP du réseau RENATEN. »

La PRRT est aujourd'hui de plus en plus utilisée et alors que ses effets toxiques sont essentiellement comparés à ceux de la radiothérapie externe, notamment pour les dommages à l'ADN.

Il est important de noter que divers types de lésions de l'ADN se produisent notamment en fonction des types de radiation subies (α , β , γ , ions lourds) par les cellules or selon l'importance des lésions, l'intégrité génomique des cellules est mise en péril.

Ainsi, au moment de la division cellulaire, des processus se coordonnent pour assurer le maintien de la stabilité du génome et la préservation du matériel nucléaire ; ces processus sont appelés réponses aux dommages à l'ADN (DDR) et sont répertoriés ci-dessous (**Figure 72**) :

MÉCANISMES DE REPARATION DE L'ADN	AGENTS DE DOMMAGE A L'ADN / GENOTOXIQUES	CARACTERISTIQUES DES LESIONS A L'ADN	EXEMPLES DE LESIONS DE L'ADN	FONCTIONS DE REPARATION DE L'ADN
REPARATION PAR EXCISION DE BASES (BER)	ROS, Rayons X, Agents alcalinisants	Lésion oxydative	Oxydation de l'uracile (8-oxo-G), Cassure simple brin	Retrait de base par N-glycosylase, Retrait de sucre abasique, Remplacement
REPARATION PAR EXCISION DE NUCLEOTIDES (NER)	UV, Hydrocarbures aromatiques polycycliques	Lésion de distorsion d'hélice	Réticulation inter-brin	Retrait de fragment ADN et remplacement
REPARATION DES DECALAGES (MMR)	Réplication	Erreur de réplication	Mésappariement A-G / T-C, Insertion, Délétion	Retrait de brin par exonuclease, Digestion, Remplacement
REPARATION DES CASSURES DOUBLE-BRIN (DSBR)	Rayons X, Radiations ionisantes, ROS, Agents antitumoraux	Cassures ADN double-brin	Cassures ADN double-brin, Réticulation inter-brin	Détente, Alignement, Ligation

Figure 72 Systèmes DDR

La capacité de signalisation du DDR, peut, si elle n'est pas assez efficace, engendrer des mutations.

Afin de contrecarrer les lésions oxydatives de l'ADN, la réparation par excision de bases (BER) est considérée comme la principale voie permettant d'éliminer les modifications formées en grande partie sur les bases de l'ADN, notamment la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoG), l'oxydation de base purique la plus répandue avec un potentiel mutagène élevé.

Parallèlement, il a été démontré que la réparation par excision de nucléotides (NER), le système de réparation de l'ADN le plus polyvalent dans les cellules humaines, fonctionne activement pour neutraliser l'oxydation de l'ADN, en particulier dans le cas de lésions oxydatives volumineuses telles que les cyclo-purines (Lee et Kang 2019).

Lorsque les dommages sont importants, ces processus de réparation s'accompagnent d'une activation de points de contrôle du cycle cellulaire, qui donne aux cellules suffisamment de temps pour terminer la réparation ou déclencher l'apoptose (Lee et Kang 2019).

Les lésions de l'ADN résultant de l'attaque des ROS peuvent générer à la fois des lésions non volumineuses (sans déformation de l'hélice) et volumineuses (déformant l'hélice).

Dans les cellules humaines, BER et NER sont les deux voies de réparation par excision de l'ADN responsables respectivement de l'élimination des lésions de l'ADN non volumineuses et volumineuses.

Les deux voies de réparation partagent trois étapes communes, notamment (**Figure 73**) (Lee et Kang 2019) :

- La reconnaissance des lésions,
- L'excision du nucléotide endommagé,
- La resynthèse à l'aide d'ADN polymérase sans erreur.

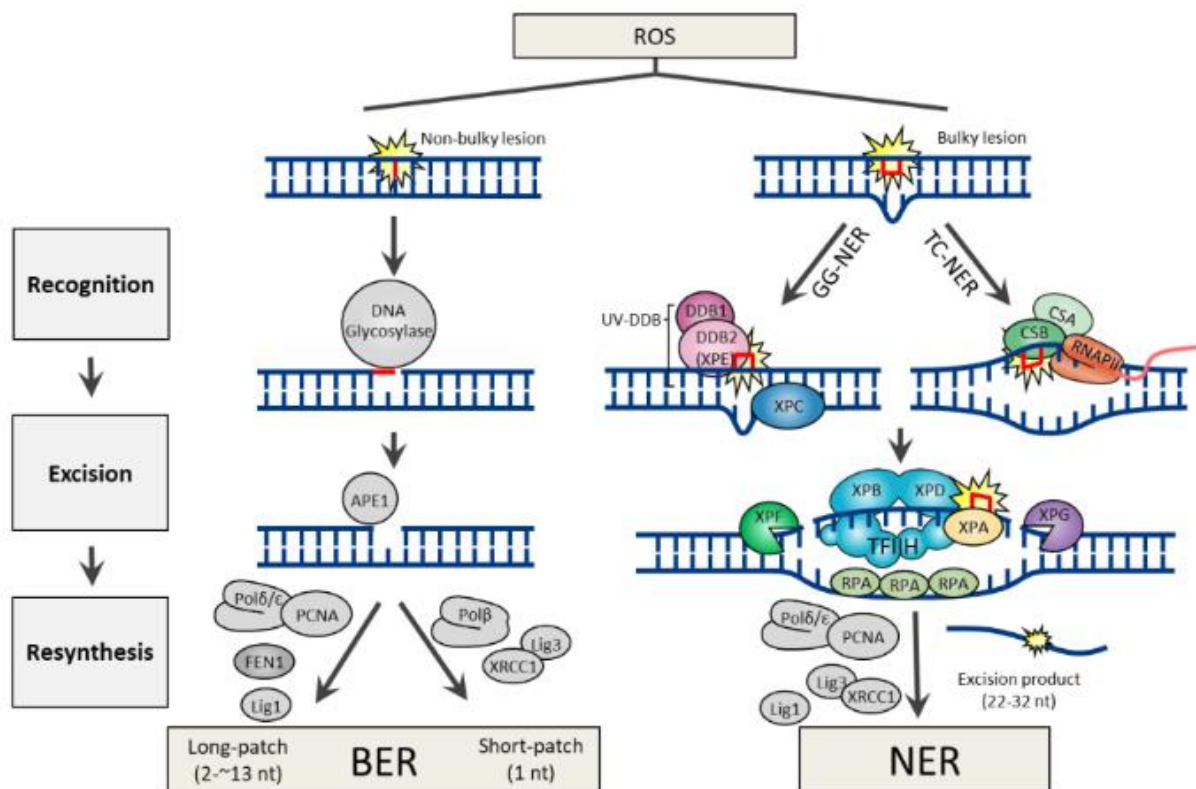


Figure 73 Mécanismes de réparation par excision de l'ADN pour des lésions causées par les ROS (Lee et Kang 2019)

De nombreux gènes impliqués dans le BER sont hautement conservés des bactéries aux humains, ce qui indique que le BER est une voie de réparation fondamentale dans la plupart des organismes vivants.

La voie BER est spécialisée dans la réparation de lésions non volumineuses à base unique sous la forme de petites modifications chimiques, notamment des dommages par oxydation, alkylation et désamination.

Les modifications de bases sont pro-mutagènes et/ou cytotoxiques, selon la manière dont elles interfèrent avec la fonction matrice de l'ADN lors de la réplication et de la transcription.

Pour lancer la procédure, BER utilise une ADN glycosylase spécifique pour la reconnaissance des lésions et l'élimination de la base endommagée.

Bien que chaque ADN glycosylase ait une structure distincte et une spécificité de substrat, toutes les glycosylases partagent un mode d'action commun pour la reconnaissance des dommages :

- Retourner la base affectée hors de l'hélice d'ADN, ce qui facilite une détection sensible des modifications de base, même mineures,
- Catalyser le clivage d'une liaison N-glycosidique, libérant une base libre et créant un site abasique (site apurinique/aprimidinique ou site AP).

De nombreuses études épidémiologiques ont étudié l'association entre les variantes courantes des gènes BER et le cancer humain (Karahalil, Bohr, et Wilson 2012).

De plus, les gènes de réparation de l'ADN, y compris les gènes BER, ont été examinés de manière approfondie dans différentes études afin de déterminer leur association avec la toxicité radio-induite chez les patients cancéreux subissant une radiothérapie (Bartsch et al. 2007).

En outre, des différences interindividuelles dans la réponse à l'exposition aux rayonnements thérapeutiques ont été observées, et cette variabilité peut être influencée par des facteurs génétiques impactant l'efficacité de la réparation de l'ADN (Andreassen et al. 2003), les effets secondaires induits par la radiothérapie dans les

tissus normaux dépendant en grande partie de la capacité des cellules à réparer les dommages causés à l'ADN par l'irradiation.

Du fait de l'hétérogénéité de ces tumeurs et de leur mauvais pronostic, il est important de bénéficier d'outils performants permettant de prédire la réponse au traitement afin de réajuster ou réorienter la prise en charge de ces patients polypathologiques.

Le suivi des marqueurs biologiques ou d'imagerie classiques ne suffisent pas à cette exigence et l'on se tourne aujourd'hui vers l'étude de marqueurs moléculaires tels que les transcrits de gènes.

La mise au point de stratégies à partir desquelles les praticiens pourraient prédire ou évaluer la réponse au traitement et ainsi avoir un temps d'avance face à la maladie serait un atout majeur dans la prise en charge de ces patients pour qui l'espérance de vie est faible.

Ainsi l'équipe de Bodei *et al.* (Lisa Bodei et al. 2018) a élaboré un « *PRRT predictive quotient* » (PPQ), basé sur l'expression de transcrits de gènes spécifiques des NNE au cours de la PRRT, et dont la variation permet d'établir si le patient sera répondeur (*PRRT responder*) ou non (*PRRT non responder*) mais sans tenir compte de la toxicité de la PRRT notamment hématologique principalement liée aux dommages à l'ADN.

OBJECTIF SCIENTIFIQUE

La thérapie par les récepteurs peptidiques ^{177}Lu -oxodotrétotide (LuPRRT) est un traitement efficace pour les NNE de l'intestin moyen à réponse radiologique variable.

Plusieurs paramètres cliniques, biologiques et d'imagerie peuvent être utilisés pour établir un pronostic relatif de la maladie, mais aucun n'est en mesure de prédire l'efficacité ou les toxicités précoces du traitement .

Dans ce travail nous cherchons à identifier des marqueurs de sensibilité à la LuPRRT, incluant des marqueurs de toxicité précoce notamment hématologique de cette thérapie, afin de pouvoir proposer rapidement une adaptation thérapeutique aux patients.

L'analyse bibliographique nous a permis d'identifier des gènes de radiosensibilité et des gènes du métabolisme et de sa régulation épigénétique (histones mais aussi miRNA) comme potentiels meilleurs marqueurs de suivi thérapeutique des NNE traitées par LuPRRT.

Le protocole GENEbioLuNET est une étude pilote, prospective, monocentrique, interventionnelle avec risques et contraintes minimales initiée par le service de Médecine Nucléaire (I.U.C.T, Toulouse, France) pour des patients traités par ^{177}Lu -DOTATATE et atteints de NNE intestinales bien différenciées (G1 ou G2), progressives ou métastatiques.

L'objectif principal était d'explorer l'expression des ARNm et des miARN que nous avons sélectionné sur les critères des mécanismes de radiosensibilité et de progression tumorale de ces tumeurs afin d'identifier la meilleure combinaison de marqueurs miRNA ou /ou ARNm permettant le suivi de la toxicité et de la réponse au traitement LuPRRT.

Population d'étude

Trente-cinq patients dont vingt-et-un hommes et quatorze femmes, ont été traités par LuPRRT pour NNE G1 ou G2 entre mai 2019 et septembre 2021.

Tous les participants avaient fourni un consentement éclairé pour le protocole LuPRRT et l'analyse génomique moléculaire (essai clinique GENEBIOLuNET, NCT03667092).

Le traitement consistait en 4 administrations IV de 7 400MBq Lu-¹⁷⁷DOTATATE® à 2 mois d'intervalle.

Le taux de réponse objective a été évalué à l'aide des critères RECIST 1.1 et défini comme étant soit un répondeur en termes de contrôle de la maladie (réponse partielle ou complète ou stabilisation), soit un non-répondeur (maladie évolutive) (Azria et al. 2015).

Les patients qui ont progressé ou sont décédés pendant le traitement ou le suivi par LuPRRT ont été inclus.

Le suivi et la survie globale (OS) ont été évalués par rapport au premier jour d'administration de LuPRRT.

Les critères d'inclusion étaient les suivants :

- Patients âgés de ≥18 ans diagnostiqués pour une NNE intestinale métastatique, de G1 ou G2 avec preuve de progression des lésions sur l'imagerie dans les 12 mois précédant la thérapie par ¹⁷⁷Lu-DOTATATE (TDM thoraco-abdomino-pelvien, IRM hépatique, scintigraphie de type Octreoscan® ou TEP-TDM au Ga⁶⁸-DOTANOC).
- Patients éligibles pour la thérapie radio nucléidique avec ¹⁷⁷Lu-DOTATATE (4 injections de 7,4GBq à 8 semaines d'intervalle) après validation en RCP du réseau national des NNE (RENATEN).
- Maladie évaluable selon les critères RECIST (Eisenhauer et al. 2009) en TDM thoraco-abdomino-pelvien et/ou IRM hépatique.
- Patients sous analogues de somatostatine, si l'injection d'analogues de somatostatine est réalisée 24 à 48 heures après chaque traitement par ¹⁷⁷Lu-DOTATATE, et 28 jours à distance de la prochaine thérapie par PRRT.
- Patients ayant accepté de participer à l'étude et ayant signé un consentement écrit.

Les critères de non inclusion étaient les suivants :

- Patients sous thérapie systémique ou chimio-embolisation au cours des 4 mois précédant l'inclusion (ce type de thérapies influence le nombre de cellules tumorales circulantes).
- Patientes en âge de procréer sans contraception efficace ; patientes enceintes ou en période d'allaitement (ou refusant d'arrêter l'allaitement).
- Les patients avec antécédents de chimiothérapie ou radiothérapie externe ou de radiothérapie nucléidique (à l'I-131, Lu-177, Y-90 ou autre radionucléide).
- Patients atteints de troubles psychiatriques non-contrôlés.
- Insuffisance rénale (clairance à la créatinine <50 mL/min).
- Insuffisance hépatique sévère (bilirubine >3 fois la valeur de la normale, albumine <30g/L et taux de prothrombine <70%).
- Insuffisance médullaire : Leucocytes <2000/ μ L, Plaquettes <75000/ μ L, Hémoglobine <8g/dL).
- Patients bénéficiant d'un système de protection juridique.

Traitement par ¹⁷⁷Lu-DOTATATE

Le traitement par ¹⁷⁷Lu-DOTATATE a été administré selon les recommandations du produit (« LUTATHERA (177Lutécium oxodotrétotide), radiopharmaceutique », s. d.) soit 4 perfusions de 7,4GBq chacune.

L'intervalle de temps recommandé entre chaque administration était de 8 semaines.

Afin de protéger la fonction rénale, une solution d'acides aminés a été administrée par voie intraveineuse pendant 4,5 heures avant de commencer la perfusion de Lutathera® (Figure 74) :

COMPOSITION	QUANTITE
Lysine	25g
Arginine	25g
Chlorure de sodium 9 mg/mL (0,9 %) solution pour injection	1L

Figure 74 Composition de la solution d'acides-aminés administrée

Concernant les prélèvements permettant l'analyse moléculaire, en complément des prélèvements pour les dosages de CgA, de 5HIAA et les numérations / formules en hématologie, la chronologie a été la suivante (**Figure 75**) :

➤ **Les prélèvements 1 et 2 (P1 et P2)**

Ils ont été réalisés respectivement à au moins 20-24 heures d'intervalle, dans les 7 jours précédant le traitement par ^{177}Lu -DOTATATE, avec évaluation concomitante de la CgA et du 5-HIAA en P1.

Ces prélèvements ont été réalisés lors de la quatrième semaine après la dernière administration d'analogues de la SST (administrés à 28 jours d'intervalle) afin d'évaluer la reproductibilité des mesures et de pouvoir servir de référence interne à chaque patient pour les prélèvements suivants.

➤ **Les prélèvements 3 et 4 (P3 et P4)**

Ils ont été réalisés lors de la visite de seconde injection de ^{177}Lu -DOTATATE.

P3 a été réalisé dans les 24 heures avant la deuxième injection (soit à la moitié du traitement) et P4, 48 heures après l'injection, avec évaluation concomitante de la CgA et du 5-HIAA en P3.

➤ **Les prélèvements 5 et 6 (P5 et P6)**

Ils ont été réalisés lors de la visite de quatrième injection de ^{177}Lu -DOTATATE.

P5 a été réalisé dans les 24 heures avant de débiter la quatrième et dernière injection (soit à la fin du traitement) et P6, 48 heures après l'injection, avec évaluation concomitante de la CgA et du 5-HIAA en P5.

➤ **Le prélèvement 7 (P7)**

Ce dernier a enfin été réalisé 6 mois après la dernière injection de ^{177}Lu -DOTATATE dans un délai de 15 jours à partir du sixième mois, avec évaluation concomitante de la CgA.

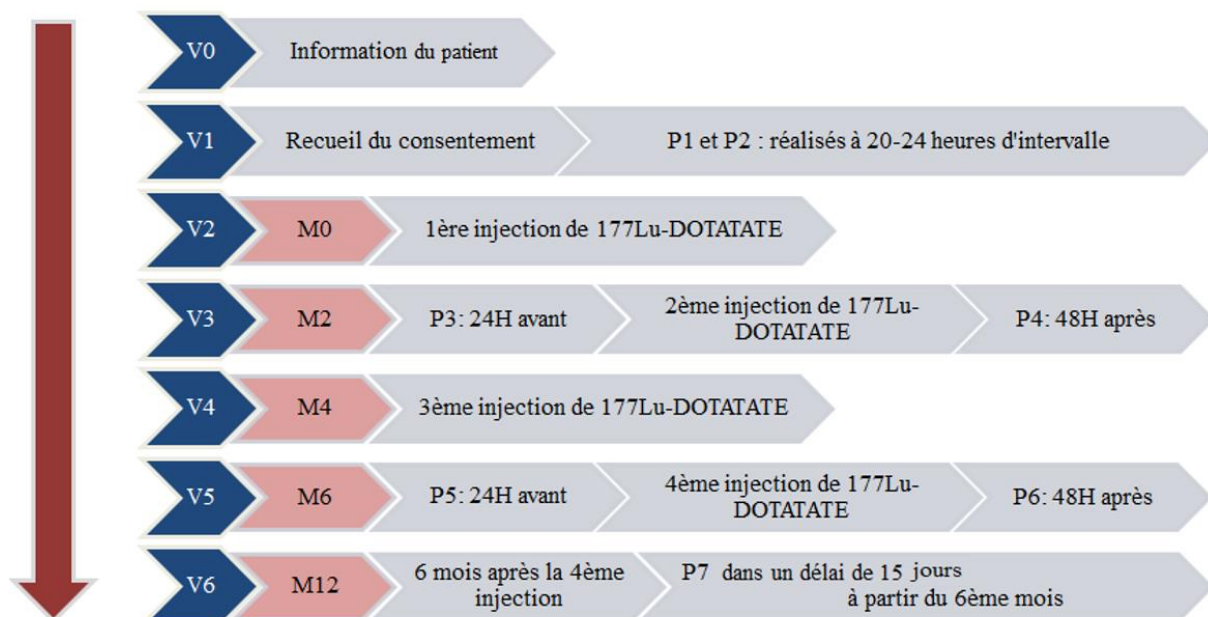


Figure 75 Chronologie du protocole GENEbioLuNET

Les paramètres moléculaires testés sur les prélèvements sanguins P1 à P7 correspondaient à l'expression de treize gènes, explorés après normalisation par le gène de la *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) et spécifiques :

- De l'**agressivité tumorale** : *Sstr3* et 5,
- De la **prolifération** : *B-Raf proto-oncogene (Braf)*,
- Du **métabolisme et sa régulation épigénétique** :
 - *V-type proton ATPase subunit H (Atp6v1h)*,
 - *Pantothenate kinase-associated neurodegeneration 2 (Pank2)*,
 - *Hdac9*,
- De la **modulation de la signalisation** : *C-X-C motif chemokine ligand 14 (Cxcl14)*,
- De la **réparation** des dommages à l'ADN :
 - *Xeroderma pigmentosum C (Xpc)*,
 - *Damage-specific DNA binding protein 2 (Ddb2)*,
 - *Bcl-2-associated X (Bax)*.
- Du **cycle cellulaire** :
 - *Cdkn2a*,
 - *Cdkn1b*.

Un panel de sept miARN a également été exploré et normalisé par le *RNA, U6 small nuclear 1* (RNU6-1) :

- miR-31,
- miR-129-5p,
- miR-133a,
- miR-215,
- miR-196a,
- miR-183.

La moitié de nos ARNm sélectionnés (BAX, XPC, DBB2, CXCL14, CDKN2A, CDKN2B) étaient indépendants de la signature NETest mais ont été décrits dans la littérature comme liés à la radiosensibilité ou aux dommages à l'ADN (Lisa Bodei, Schöder, et al. 2020; Irvin M. Modlin et al. 2018).

Les miARN que nous avons analysés étaient des biomarqueurs de radiosensibilité liés à une expression accrue des gènes endommagés par l'ADN, comme décrit (Tang et al. 2022; Halimi et al. 2013) ; ces miARN avaient également montré une expression particulière dans les NNE métastatiques et une stabilité sous traitement par analogue de la somatostatine.

Par ailleurs, chaque biomarqueur de notre panel a été décrit comme dérégulé dans les compartiments tumoraux et sanguins périphériques des patients atteints de NNE intestinale, ce qui suggère qu'ils sont spécifiques de la NNE intestinale (Panarelli et al. 2019).

RÉSULTATS

EVALUATION OF A BLOOD MIRNA/MRNA
SIGNATURE TO FOLLOW-UP LU-PRRT THERAPY
FOR G1/G2 INTESTINAL NEUROENDOCRINE
TUMORS

Evaluation of a blood miRNA/mRNA signature to follow-up Lu-PRRT therapy for G1/G2 intestinal neuroendocrine tumors

Virginie Jacques^{1,2,3}, Lawrence Dierickx⁴, Jean Sebastien Texier⁴, Severine Brillouet⁴, Frederic Courbon^{3,4}, Rosine Guimbaud^{3,5}, *Lavinia Vija Racaru^{3,4}, *Frederique Savagner^{1,2,3}

*: equally contributors

1: Biochemistry Laboratory, Federative Institute of Biology, 330 avenue de Grande Bretagne, CHU, 31059 Toulouse, France

2: Inserm UMR1297, I2MC, 1 avenue J Poulhes, 31000 Toulouse, France

3 : Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, 31000 Toulouse, France

4: Nuclear Medicine Department, CRLCC, 31059 Toulouse, France

5: Digestive Oncology Department, CHU, 31059 Toulouse, France

Corresponding Author : Frédérique Savagner ; ORCID number : 0000-0002-1965-8836

Address : CHU Toulouse, Federative Institute of Biology, 31059 France

Fax : +33 (0)5 67 69 03 77

Telephone : +33 (05) 67 69 03 75

E-mail : frederique.savagner@inserm.fr

Keywords : Intestinal neuroendocrine tumors, miRNA/mRNA signature, PRRT therapy, outcome, hematotoxicity

Funding : This work has been supported by the GENEBIOLuNET project, ARI grants from the Academic hospital of Toulouse, NCT03667092.

Disclosure : The authors have nothing to disclose.

Abstract :

Background ¹⁷⁷Lu-oxodotreotide peptide receptor therapy (LuPRRT) is an efficient treatment for midgut neuroendocrine tumors (NET) of variable radiological response. Several clinical, biological and imaging parameters may be used to establish a relative disease prognosis but none is able to predict early efficacy or toxicities. We investigated expression levels for mRNA and miRNA involved in radiosensitivity and tumor progression searching for correlations related to patient outcome during LuPRRT therapy.

Methods: Thirty-five patients received LuPRRT for G1/G2 midgut NET between May 2019 and September 2021. Peripheral blood samples were collected prior to irradiation, before and 48 hours after the second and the fourth LuPRRT and at 6-month follow-up. Multiple regression analyses and Pearson correlations were performed to identify the miRNA/mRNA signature that will best predict response to LuPRRT.

Results: Focusing on 4 mRNA and 3 miRNA we identified a miRNA/mRNA signature enabling the early identification of responders to LuPRRT with significant reduced miRNA/mRNA expression after the first LuPRRT administration for patients with progressive disease at 1 year ($p < 0.001$). The relevance of this signature was reinforced by studying its evolution up to 6 months post-LuPRRT. Moreover, nadir absolute lymphocyte count within the first two months after the first LuPRRT administration was significantly related to low miRNA/mRNA expression level ($p < 0.05$) for patients with progressive disease.

Conclusion: We present a pilot study exploring an miRNA/mRNA signature that correlates with early hematologic toxicity and therapeutic response 12 months following LuPRRT. This signature will be tested prospectively in larger series of patients.

Introduction

The incidence rates of neuroendocrine tumors (NET) of the gastrointestinal tract vary between 0.9-3.85/100,000 around the world with an annual incidence of digestive NET in France of at least 2.06/100,000 (Côme Lepage 2004). Most gastrointestinal neuroendocrine tumors (GI-NET) are well-differentiated and represent the second most prevalent digestive tumor after colorectal cancer. While the incidence of midgut neuroendocrine tumors is increasing, the therapeutic options are limited when they become progressive, metastatic or non-operable (Hallet et al. 2015; Das et Dasari 2021). ¹⁷⁷Lu-oxodotreotide or ¹⁷⁷Lu-DOTATATE® peptide receptor therapy (LuPRRT) targeting somatostatin receptors (SSTR) is a molecular radiotherapy approach based on ¹⁷⁷Lu irradiation. In the NETTER-1 phase III randomized clinical trial, ¹⁷⁷Lu-DOTATATE proved its superiority compared to high-dose somatostatin analogs, as it dramatically increased progression-free survival (PFS) with a ~80% reduction in the estimated risk of tumor progression or death (Bergsma et al. 2018; Jonathan Strosberg et al. 2017). Although ¹⁷⁷Lu-DOTATATE has been approved by the EMA as a first- or second-line treatment for G1/G2 non-operable metastatic GI-NET, radiological responses were variable and 5-year overall survival (OS) was not significantly increased (J. R. Strosberg et al. 2021).

The risk of severe short-term hematologic toxicities (mainly thrombocytopenia, lymphopenia, and anemia) is low (25%), even though persistent lymphopenia has been described as potentially compromising other systemic therapeutic modalities. LuPRRT may also expose patients to irreversible late toxicities such as lymphoproliferative disorders, especially in those likely to have improved overall survival (Bergsma et al. 2018). Unlike for external beam radiotherapy (EBR), dosimetry for LuPRRT lacks accuracy, thereby hampering dose-effect correlation studies and the prediction of late toxicity (Lisa Bodei, Kidd, et al. 2020). Similarly to how genetic environment predicts the late toxicity after EBR, lymphocytes expressing SSTR may also reflect the radiosensitivity to LuPRRT irradiation (Azria et al. 2015; Denoyer et al. 2015). ¹⁷⁷Lu-DOTATATE administration follows a fixed therapeutic scheme using the same activity of ¹⁷⁷Lu-DOTATATE per cycle and patient, even though different patients have different response and tolerance profiles. Therefore, there is a pressing need to be able to forecast and identify the most suitable patients and the right timing for LuPRRT therapy to obtain long-term disease control avoiding hematotoxicity or irreversible side-effects such as myelodysplastic syndromes.

Various clinical parameters such as tumor grading and associated comorbidities, biomarkers (such as CgA, 5HIAA), and imaging criteria (RECIST1.1 criterion for CT and MRI) have already been investigated and may be used to establish a relative disease prognosis, but none is able to predict late toxicity or the outcome of LuPRRT. Recently, a test based on peripheral blood transcript analysis (NETest, PPQ) showed promising results for predicting LuPRRT efficacy (Lisa Bodei, Kidd, et al. 2020; L. Bodei et al. 2016; Lisa Bodei et al. 2021). However, it is not yet available in routine practice, and it does not provide correlations with radiosensitivity or toxicities limiting treatment continuation (Lisa Bodei, Schöder, et al. 2020). As miRNAs are master modulators of gene expression, miRNA/mRNA combinatory profiles could provide new information on the mechanisms underlying therapeutic efficacy. Previous studies of the sole quantification of miRNAs in the blood have shown that few of them could be proposed as prognostic or predictive biomarkers in GI-NET (Malczewska et al. 2018; L. Geisler et al. 2021). A major step forward would be to hone these profiles to investigate specific molecular pathways, especially those in heterogeneous metastatic tumors such as GI-NETs (Havasi et al. 2022).

We hypothesize that an integrative approach combining the expression of mRNA and miRNA in genes highly responsive to irradiation and involved in tumor progression could lead to a specific gene expression signature from peripheral blood to predict patient outcome and the risk of hematologic toxicity during LuPRRT treatment.

Material and methods

Patients

Thirty-five patients were treated with LuPRRT for G1 or G2 -NET between May 2019 and September 2021. All participants provided written informed consent for LuPRRT and molecular genomic analysis (clinical trial GENEBIOLuNET, NCT03667092). Treatment consisted in four IV administrations of 7400 MBq Lu-177 DOTATATE® at 2-month interval. Objective response rate was assessed using RECIST 1.1 criteria and defined as either responder in terms of disease control (partial or complete response or stabilization) or non-responder (progressive disease) (8). Patients who progressed

or died during LuPRRT treatment or follow-up were included. Follow-up and OS were assessed starting from the first day of LuPRRT administration.

For expression analysis, seven peripheral blood samples on PAXgene® tubes were collected: prior to irradiation (P1 and P2), before and 48 hours after the second (P3 and P4) and the fourth (P5 and P6) LuPRRT administrations and at 6-month follow-up (P7). The first two samples (P1 and P2) were performed at 48h interval prior the first LuPRRT administration, with the second sample obtained 2 h before starting amino acid perfusion, to test time-related variation in gene expression independently from LuPRRT treatment. Samples were stored in the CRB-TBR of the University Hospital of Toulouse (Collection number: DC-2015-2450).

For plasma chromograninA (CgA) and urinary 5-hydroxy indol acetic acid (HIAA) assays, three blood or urinary samples were collected from each patient as such: prior to irradiation (P1) before the second (P3) and the fourth (P5) LuPRRT administration. CgA was measured using BRAMHS CgA II on Kryptor apparatus. A positive CgA is > 102 ng/ml. The 24h urinary 5HIAA was measured using LCMS-MS apparatus (Shimadzu, LCMS-8060) and considered negative when < 40 µmol/24h. Grade 1 NET was defined as Ki-67 index < 3 % and mitotic rate <2, whereas grade 2 was defined as Ki-67 index 3-20 % and mitotic index 2- 20 (Nagtegaal et al. 2020). Performance status was assessed by ECOG classification. The absolute lymphocyte count (ALC) NADIR was determined on blood collected just before treatment and then 15 (NADIR1) and 45 (NADIRC2) days after first LuPRRT administration. Lymphopenia was classified using CTCAE criteria (Common Terminology Criteria for Adverse Events, version 5.0.).

MiRNA and mRNA extraction, quantification and profiling

Blood samples on PAXgene® were kept at +4°C for up to 5 days and then frozen at -20°C. mRNA and miRNA were extracted using the PAXgene® blood miRNA kit (Qiagen) and quantified using Nanodrop apparatus (ThermoScientific). After retro-transcription, expression was quantified using the SYBRgreen reagent on Light cycler 480 apparatus. We used the All-in-One miRNA qRT-PCR detection kit (Qiagen) for miRNA and Superscript Vilo and Mastermix Sybregreen® (Thermofisher) for mRNA with appropriate primers according to the manufacturer's recommendations (Supplemental Table 1).

The expression of 13 genes was explored and was correlated with tumor aggressiveness (somatostatin receptors SSTR3 and 5), proliferation (BRAF- proto-oncogene), metabolism (ATP6V1H, PANK2, HDAC9), signaling modulation (CXCL14), post-radiation DNA repair (XPC, DDB2), cell cycle (CDKN2A, CDKN1B) and apoptosis signaling (BAX) with the normalization gene GAPDH. A panel of seven miRNAs (miR-31, miR-129-5p, miR-133a, miR-215, miR-196b, miR-183) was also explored and normalized to RNU6-1. Clinical studies have shown that these miRNAs were dysregulated in both tumor and peripheral blood compartments of patients with GI-NET (13,14).

The fold change in gene expression was calculated for each sample using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. We first used quantile normalization for mRNA and miRNA profiles and Z-score normalization to combine miRNA and mRNA expression and identify signatures for all (12 mRNA and 6 miRNA) and most relevant (4 mRNA and 3 miRNA) genes. Multiple regression analyses were performed to identify a combined miRNA/mRNA signature that would best predict the response to LuPRRT and hematologic toxicity.

Statistical analysis

We performed a Mann-Whitney test for quantitative variables for comparison between groups and one-way ANOVA to compare different time points for the same patient. Multivariable analyses were performed using the Cox proportional hazard model to study the influence of biomarkers on time to event outcomes after adjusting on prognostic factors. We estimated OS using the Kaplan-Meier method. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$.

Results

Patients

Thirty-five patients (21 males, 14 females) were treated with Lu-177 DOTATATE between May 2019 and September 2021 and had peripheral blood sampled for mRNA and miRNA during the study. Twenty-eight patients presented midgut neuroendocrine tumors of the small intestine, three patients had a NET within the right colon, three in the ileo-cecal valve and one in the appendix (Table 1). Thirty-one patients received 4 Lu-177 DOTATATE injections, one patient died after the first LuPRRT, one after the second, one patient refused the fourth injection and one developed irreversible grade 2 thrombocytopenia and stopped treatment after the third injection. One-year follow-up radiological assessment using the RECIST 1.1 criteria, was possible in 32 patients (3 deceased before): 3 patients had partial response at 1-year follow-up, 24 patients were stable, so 27/35 patients (78%) were considered as responders as disease was controlled. Five patients had progressed. Radiological follow-up at 2 years was possible for 29 patients as 6 deceased before 24 months: 7 patients progressed and 22 patients (63 %) were stable and considered as responders (Table 2). Of the 35 patients explored in this study, 18 (51%) had grade 1-2 lymphopenia and 7 (20%) had grade 3 lymphopenia on 15 days after the first injection of LuPRRT. In the global follow-up, 11 (31%) patients presented grade 1-2 lymphopenia, 21 (60%) grade 3 and 3 (9%) grade 4 lymphopenia.

Gene expression stability and kinetics during PRRT treatment

In 35 patients with serial blood samples collected during LuPRRT treatment (from P1 to P7 according to Figure 1A), twice were collected before the first LuPRRT injection with an interval of 48 h (P1 and P2) to explore the stability of a signature including 12 mRNAs and 6 miRNAs. The variation in miRNA/mRNA signature during this 48h-period was non-significant, thus confirming the stable expression of these genes prior to LuPRRT treatment (Figure 1B; ns; $p = 0.68$).

The evolution of the mean expression profile of various genes for all patients treated with LuPRRT (P3 to P7) was measured before and 48h after the second (P3 and P4) and the fourth (P5 and P6) LuPRRT as well as 6 months later (P7) in order to identify the best combination of mRNA and miRNA related to patient outcome. miRNA expression levels were more differentially expressed during LuPRRT treatment compared to those of mRNA with inverse expression pattern in relation with the intricate and dynamic nature of gene regulation (Figures 2A and 2B). The expression of SSTR3 and SSTR5 was used to confirm SSTR targeting throughout LuPRRT treatment with high expression levels at P1-P2 compared to other genes. Searching

for a predictive signature, all candidate mRNA and miRNA were subjected to a step-wise multivariate Cox's model, resulting in a total of 4 mRNA and 3 miRNA selection that we used as the final signature exploring damaged DNA repair (XPC and DDB2), regulation of cell proliferation and autophagy (BAX and BRAF), lymphocyte B/T activation (miR-31 and miR-133) and regulation of angiogenesis and tumor suppression (miR-196b) (Supplemental Table 2). We have identified early biomarkers of LuPRRT response as BAX, DDB2, miR-133 and miR-31 suggesting ongoing radiobiological effects while XPC, BRAF and miR-196b biomarkers presented continuous variation during LuPRRT treatment suggesting sustained activation of antitumor cellular pathways as a result of ¹⁷⁷Lu irradiation.

Biomarkers and outcome

We compared the miRNA/mRNA signature from blood samples obtained before the second (P3) and the fourth (P5) administration of LuPRRT relative to blood samples obtained before starting LuPRRT (P1-P2). We considered patients as responders (SD for stability or partial response) and non-responders (PD as progressive disease) according to RECIST criteria on CT/MRI imaging performed at 12 months of follow-up (Figure 3A). We observed that patients with progressive disease 12 months after the last cycle of PRRT (n= 5 patients) presented significantly low levels of miRNA/mRNA expression just after the first LuPRRT administration (PD-P3) compared to patients with stable disease or partial response (SD-P3) (Figure 3A, $p < 0.001$). These differences were even more significant for samples collected two months after the third LuPRRT injection (PD-P5 vs SD-P5), emphasizing the relevance of the signature ($p < 0.001$).

The differential expression levels of biomarkers currently used for GI-NET such as plasma CgA and urinary 5HIAA were dynamically assessed before each LuPRRT. We compared the variation at two months after the first injection of LuPRRT (P3) as well as after the third LuPRRT administration (P5) versus baseline in responders versus non-responders at 12-month follow-up (Figures 3B and 3C). There was no significant difference in CgA and 5HIAA during LuPRRT between responders (SD) or non-responders (PD) according to RECIST criteria ($p = 0.51$ and 0.24 , respectively).

Multivariate analysis showed patient outcome could be predicted by miRNA/mRNA expression profiles after the first ($p = 0.0064$) and the third LuPRRT ($p = 0.0105$), whereas Ki-67 index was at the limit of significance ($p = 0.0521$) (Table 3). We finally explored the OS (interquartile range) of the 35 patients according to the Ki-67 index. At the time of analysis, median OS was not reached and patients with a Ki-67 index greater than or equal to 10 (n=9, 25%) showed a non-significant trend towards poor outcome (Supplemental Figure 2).

Expression profile and hematologic toxicities

To test the potential correlations between our miRNA/mRNA signature and early hematological toxicity, we monitored the lymphocyte count at 15 and 45 days after LuPRRT administration. We considered as NADIR the lowest point of absolute lymphocyte count (ALC) after LuPRRT cycle 1 (NADIRC1) and 2 (NADIRC2) as indicators of the immune response. ALC nadir 15 days after the first LuPRRT administration (NADIRC1) was significantly related to low miRNA/mRNA signature at the time of second (PD-P3; $p = 0.036$; $r = -0.43$) and fourth injection (PD-P5; $p = 0.004$; $r = -0.63$) for patients with progressive disease (PD). The same trend was also noticed for ALC nadir 45 days after first LuPRRT (NADIRC2), suggesting that lymphopenia

might be associated with radiosensitivity in responders to LuPRRT (Supplemental Figure 2).

For two patients with stable disease at 1 year follow up (SD), we identified a significant decrease in the miRNA/mRNA signature compared to other patients of the group (n=24) after the second (P4; p<0.05) and the fourth injection (P6; p<0.05) (Figure 4A). That difference was emphasized when comparing miRNA/mRNA signature directly before and after the second (P4 vs P3) and the fourth (P6 vs P5) LuPRRT injection (Figure 4B). One patient developed grade 3 thrombocytopenia associated with grade 3 lymphopenia and grade 1 anemia. Several myelograms have been performed and a diagnostic of therapy-related myelodysplastic syndrome (MDS) was confirmed 2 years after LuPRRT. This patient remained stable on RECIST criteria at 3 year follow up. Another patient developed MDS with pancytopenia diagnosed one month after the fourth LuPRRT administration. The latter patient had stable disease until he died from therapy-related MDS one year after LuPRRT.

Discussion

The clinical utility of circulating biomarkers to propose miRNA or mRNA profiles related to diagnosis, prognosis and therapeutic targets has been often discussed independently (Malczewska et al. 2018; L. Geisler et al. 2021; Bevere et al. 2023). The NETest, exploring the expression of 51 genes (mRNA) with the aid of four prediction algorithms led to define a score proportional to disease activity (Irvin M. Modlin, Drozdov, et Kidd 2013; I. M. Modlin et al. 2021). However, depending on the cut off values, the specificity of this test varies among independent studies showing the difficulties to standardize mRNA expression profiles (Öberg et al. 2020; van Treijen et al. 2018; Al-Toubah et al. 2021). The NETest, in combination with Ki-67, has been proposed to identify responsive tumors by defining a PRRT predictive quotient (PPQ) (Lisa Bodei, Kidd, et al. 2020). Due to their stability and their regulatory role, changes in miRNA expression could also be associated to prognosis and therapeutic efficacy (Havasi et al. 2022; Lloyd et al. 2016). In our study we have combined mRNA expression to miRNA profiles to focus on an accurate response signature to LuPRRT. Each patient has been used as its own control using stable expression signature before LuPRRT treatment for standardization. Half of our selected mRNAs (BAX, XPC, DDB2, CXCL14, CDKN2A, CDKN2B) are independent of the NETest signature but were described in literature as related to radiosensitivity or DNA damage (Lisa Bodei, Kidd, et al. 2020; L. Bodei et al. 2016; Lisa Bodei et al. 2021; Lisa Bodei, Schöder, et al. 2020; Irvin M. Modlin et al. 2018). The miRNAs we analyzed are also biomarkers of radiosensitivity as previously described (Tang et al. 2022; Kumar, Ghosh, et Chandna 2015; Halimi et al. 2013). These miRNAs had shown a particular expression in metastatic NETs and stability under somatostatin analog therapy. Moreover, each biomarker of our panel was described as dysregulated in both the tumor and peripheral blood compartments for patients with GI-NET suggesting their specificity (Panarelli et al. 2019). We reveal on this preliminary study that combining mRNA and miRNA expression profiling could be an interesting option to use in order to assess patient sensitivity and outcome to LuPRRT as previously revealed for the diagnosis and prognosis of several cancers (T. Yang et al. 2021; Jie Zhang et al. 2020; Jacques et al. 2013). Our miRNA/mRNA signature focusing on a combination of 4 mRNAs and 3 miRNAs should be able to detect earlier than NETest the LuPRRT responders (as early

as after the first LuPRRT administration compared to final LuPRRT administration using the PPQ score).

In the context of LuPRRT, studies have shown that patients with GI-NETs and a high Ki-67 expression are less likely to respond to treatment and may have a shorter PFS and OS (van der Zwan et al. 2019). In our study, patients with a Ki-67 index of less than 10% had a higher rate of response to LuPRRT on the miRNA/mRNA signature but no significant difference in OS to those with a Ki-67 index of 10% or higher. According to previous recommendations (Lisa Bodei et al. 2018), we confirm that merging Ki-67 index and expression signature is a useful prognostic factor for predicting stable disease and OS in response to PRRT efficacy with a higher predictive value of targeted miRNA/mRNA signature compared to Ki-67.

Twenty-five (71%) patients treated with LuPRRT presented lymphopenia with an early nadir 15 days after therapy and a subsequent slow partial recovery. Lymphopenia observed during LuPRRT mainly affects the B-cell subpopulation and could be due to the therapeutic sensitivity of cells expressing SSTR (22). The ALC nadir can provide information about a patient's radiosensitivity. Several studies have shown that ALC nadir is associated with a better response to LuPRRT treatment and improved OS in patients with GI-NETs (Sierra et al. 2009; Price et al. 2022). Patients with GI-NET who had an ALC nadir of less than $0.5 \times 10^9/L$ had a significantly higher OS rate than those with an ALC nadir of $0.5 \times 10^9/L$ or higher. We thus identified a significant inverse relationship between miRNA/mRNA signature after the first PRRT cycle and the ALC nadir. Moreover, two patients who developed a LuPRRT-related myelodysplastic syndrome (MDS) had a remarkable decrease in their miRNA/mRNA signature. This signature might therefore reveal the risk of increased clonal hematopoiesis or the risk of developing an MDS as soon as after the first LuPRRT perfusion, thus limiting the pursuit of the treatment. miRNA/mRNA profiling could indicate not only NET lesions radiosensitivity but also lymphocytes radiosensitivity and could be compared to quantification of γ -H2AX foci in lymphocytes and absorbed dose to tumor and bone marrow (Denoyer et al. 2015).

LuPRRT is a promising treatment for patients with GI-NET, although 15-20% of patients show disease progression as early as 6 months post-PRRT (Jonathan Strosberg et al. 2017; Sharma et al. 2017). We have explored in a pilot study a miRNA/mRNA signature that could predict patient outcome with a significant down-expression profile after the first cycle of LuPRRT in patients presenting progressive disease 12 months after therapy. This miRNA/mRNA signature is superior to CgA and 5HIAA assays as they reflect variations related to early response to LuPRRT therapy and also to hematologic toxicity. Further research is required to validate these findings in a larger series of patients in a multicenter setting in order to determine the clinical utility of this miRNA/mRNA profiling in guiding LuPRRT treatment decisions.

References :

1. Lepage C, Lepage C, Bouvier AM, Phelip JM, Hatem C, Vernet C, Faivre J. Incidence and management of malignant digestive endocrine tumours in a well-defined French population. *Gut* 53: 549-553. *Gut* (2004) 53:549–553.
2. Hallet J, Law CHL, Cukier M, Saskin R, Liu N, Singh S. Exploring the rising incidence of neuroendocrine tumors: a population-based analysis of epidemiology, metastatic presentation, and outcomes. *Cancer* (2015) 121:589–597.
3. Das S, Dasari A. Epidemiology, Incidence, and Prevalence of Neuroendocrine Neoplasms: Are There Global Differences? *Curr Oncol Rep* (2021) 23:43.
4. Bergsma H, van Lom K, Raaijmakers MHGP, Konijnenberg M, Kam BLBLR, Teunissen JJM, de Herder WW, Krenning EP, Kwekkeboom DJ. Persistent Hematologic Dysfunction after Peptide Receptor Radionuclide Therapy with ¹⁷⁷Lu-DOTATATE: Incidence, Course, and Predicting Factors in Patients with Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *J Nucl Med* (2018) 59:452–458.
5. Strosberg J, El-Haddad G, Wolin E, Hendifar A, Yao J, Chasen B, Mittra E, Kunz PL, Kulke MH, Jacene H, et al. Phase 3 Trial of ¹⁷⁷Lu-Dotatate for Midgut Neuroendocrine Tumors. *New England Journal of Medicine* (2017) 376:125–135.
6. Strosberg JR, Caplin ME, Kunz PL, Ruzsniwski PB, Bodei L, Hendifar A, Mittra E, Wolin EM, Yao JC, Pavel ME, et al. ¹⁷⁷Lu-Dotatate plus long-acting octreotide versus high-dose long-acting octreotide in patients with midgut neuroendocrine tumours (NETTER-1): final overall survival and long-term safety results from an open-label, randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* (2021) 22:1752–1763.
7. Bodei L, Kidd MS, Singh A, van der Zwan WA, Severi S, Drozdov IA, Malczewska A, Baum RP, Kwekkeboom DJ, Paganelli G, et al. PRRT neuroendocrine tumor response monitored using circulating transcript analysis: the NETest. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (2020) 47:895–906.
8. Azria D, Riou O, Castan F, Nguyen TD, Peignaux K, Lemanski C, Lagrange J-L, Kirova Y, Lartigau E, Belkacemi Y, et al. Radiation-induced CD8 T-lymphocyte Apoptosis as a Predictor of Breast Fibrosis After Radiotherapy: Results of the Prospective Multicenter French Trial. *EBioMedicine* (2015) 2:1965–1973.
9. Denoyer D, Lobachevsky P, Jackson P, Thompson M, Martin OA, Hicks RJ. Analysis of ¹⁷⁷Lu-DOTA-octreotate therapy-induced DNA damage in peripheral blood lymphocytes of patients with neuroendocrine tumors. *J Nucl Med* (2015) 56:505–511.
10. Bodei L, Kidd M, Modlin IM, Severi S, Drozdov I, Nicolini S, Kwekkeboom DJ, Krenning EP, Baum RP, Paganelli G. Measurement of circulating transcripts and gene cluster analysis predicts and defines therapeutic efficacy of peptide receptor radionuclide therapy (PRRT) in neuroendocrine tumors. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (2016) 43:839–851.
11. Bodei L, Raj N, Do RKG, Krebs S, Reidy D, Kidd M, Drozdov I, Modlin I, Schoder H. Blood based genomic assessment of the clinical efficacy and toxicity of peptide receptor radionuclide therapy (PRRT). *Journal of Nuclear Medicine* (2021) 62:78–78.
12. Bodei L, Schöder H, Baum RP, Herrmann K, Strosberg J, Caplin M, Öberg K, Modlin IM. Molecular profiling of neuroendocrine tumours to predict response and toxicity to peptide receptor radionuclide therapy. *Lancet Oncol* (2020) 21:e431–e443.
13. Malczewska A, Kidd M, Matar S, Kos-Kudla B, Modlin IM. A Comprehensive

- Assessment of the Role of miRNAs as Biomarkers in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *Neuroendocrinology* (2018) 107:73–90.
14. Geisler L, Mohr R, Lambrecht J, Knorr J, Jann H, Loosen SH, Özdirik B, Luedde T, Hammerich L, Tacke F, et al. The Role of miRNA in the Pathophysiology of Neuroendocrine Tumors. *Int J Mol Sci* (2021) 22:8569.
 15. Havasi A, Sur D, Cainap SS, Lungulescu C-V, Gavrilas L-I, Cainap C, Vlad C, Balacescu O. Current and New Challenges in the Management of Pancreatic Neuroendocrine Tumors: The Role of miRNA-Based Approaches as New Reliable Biomarkers. *International Journal of Molecular Sciences* (2022) 23:1109.
 16. Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, Paradis V, Rugge M, Schirmacher P, Washington KM, Carneiro F, Cree IA. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology* (2020) 76:182–188.
 17. Li S-C, Khan M, Caplin M, Meyer T, Öberg K, Giandomenico V. Somatostatin Analogs Treated Small Intestinal Neuroendocrine Tumor Patients Circulating MicroRNAs. *PLOS ONE* (2015) 10:e0125553.
 18. Panarelli N, Tyryshkin K, Wong JJM, Majewski A, Yang X, Scognamiglio T, Kim MK, Bogardus K, Tuschl T, Chen Y-T, et al. Evaluating gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors through microRNA sequencing. *Endocr Relat Cancer* (2019) 26:47–57.
 19. Bevere M, Masetto F, Carazzolo ME, Bettega A, Gkountakos A, Scarpa A, Simbolo M. An Overview of Circulating Biomarkers in Neuroendocrine Neoplasms: A Clinical Guide. *Diagnostics (Basel)* (2023) 13:2820.
 20. Modlin IM, Drozdov I, Kidd M. The Identification of Gut Neuroendocrine Tumor Disease by Multiple Synchronous Transcript Analysis in Blood. *PLOS ONE* (2013) 8:e63364.
 21. Modlin IM, Kidd M, Falconi M, Filosso PL, Frilling A, Malczewska A, Toumpanakis C, Valk G, Pacak K, Bodei L, et al. A multigenomic liquid biopsy biomarker for neuroendocrine tumor disease outperforms CgA and has surgical and clinical utility. *Ann Oncol* (2021) 32:1425–1433.
 22. Öberg K, Califano A, Strosberg JR, Ma S, Pape U, Bodei L, Kaltsas G, Toumpanakis C, Goldenring JR, Frilling A, et al. A meta-analysis of the accuracy of a neuroendocrine tumor mRNA genomic biomarker (NETest) in blood. *Annals of Oncology* (2020) 31:202–212.
 23. van Treijen MJC, Korse CM, van Leeuwen RS, Saveur LJ, Vriens MR, Verbeek WHM, Tesselaar MET, Valk GD. Blood Transcript Profiling for the Detection of Neuroendocrine Tumors: Results of a Large Independent Validation Study. *Front Endocrinol (Lausanne)* (2018) 9:740.
 24. Al-Toubah T, Cives M, Valone T, Blue K, Strosberg J. Sensitivity and Specificity of the NETest: A Validation Study. *Neuroendocrinology* (2021) 111:580–585.
 25. Lloyd KA, Moore AR, Parsons BN, O'Hara A, Boyce M, Dockray GJ, Varro A, Pritchard DM. Gastrin-induced miR-222 promotes gastric tumor development by suppressing p27kip1. *Oncotarget* (2016) 7:45462–45478.
 26. Modlin IM, Kidd M, Malczewska A, Drozdov I, Bodei L, Matar S, Chung K-M. The NETest: The Clinical Utility of Multigene Blood Analysis in the Diagnosis and Management of Neuroendocrine Tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am* (2018) 47:485–504.
 27. Tang C, Qi J, Wu Y, Luo L, Wang Y, Wu Y, Shi X. Improving the prediction for the response to radiotherapy of clinical tumor samples by using combinatorial model of MicroRNA expression. *Frontiers in Genetics* (2022) 13:
 28. Kumar A, Ghosh S, Chandna S. Evidence for microRNA-31 dependent Bim-Bax

- interaction preceding mitochondrial Bax translocation during radiation-induced apoptosis. *Sci Rep* (2015) 5:15923.
29. Halimi M, Parsian H, Mohsen Asghari S, Sariri R, Moslemi D, Yeganeh F. MicroRNAs: Are they indicators for prediction of response to radiotherapy in breast cancer? *Journal of Medical Hypotheses and Ideas* (2013) 7:59–64.
 30. Yang T, Miao X, Bai Z, Tu J, Shen S, Niu H, Xia W, Wang J, Zhang Y. A Novel mRNA-miRNA Regulatory Sub-Network Associated With Prognosis of Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Frontiers in Oncology* (2021) 10:
 31. Zhang J, Li D, Zhang Y, Ding Z, Zheng Y, Chen S, Wan Y. Integrative analysis of mRNA and miRNA expression profiles reveals seven potential diagnostic biomarkers for non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* (2020) 43:99–112.
 32. Jacques C, Guillotin D, Fontaine J-F, Franc B, Mirebeau-Prunier D, Fleury A, Malthiery Y, Savagner F. DNA microarray and miRNA analyses reinforce the classification of follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* (2013) 98:E981–989.
 33. van der Zwan WA, Brabander T, Kam BLR, Teunissen JJM, Feelders RA, Hofland J, Krenning EP, de Herder WW. Salvage peptide receptor radionuclide therapy with [177Lu-DOTA,Tyr3]octreotate in patients with bronchial and gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (2019) 46:704–717.
 34. Bodei L, Kidd MS, Singh A, van der Zwan WA, Severi S, Drozdov IA, Cwikla J, Baum RP, Kwekkeboom DJ, Paganelli G, et al. PRRT genomic signature in blood for prediction of 177Lu-octreotate efficacy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (2018) 45:1155–1169.
 35. Medaer E, Verslype C, Van Cutsem E, Dekervel J, Clement PM, Nackaerts K, Laenen A, Gheysens O, Goffin K, Jentjens S, et al. Influence of pretreatment with everolimus or sunitinib on the subacute hematotoxicity of 177Lu-DOTATATE PRRT. *Acta Oncol* (2020) 59:644–651.
 36. Sierra ML, Agazzi A, Bodei L, Pacifici M, Aricò D, De Cicco C, Quarna J, Sansovini M, De Simone M, Paganelli G. Lymphocytic toxicity in patients after peptide-receptor radionuclide therapy (PRRT) with 177Lu-DOTATATE and 90Y-DOTATOC. *Cancer Biother Radiopharm* (2009) 24:659–665.
 37. Price JM, Mistry HB, Betts G, Cheadle EJ, Dixon L, Garcez K, Illidge T, Iyizoba-Ebozue Z, Lee LW, McPartlin A, et al. Pretreatment Lymphocyte Count Predicts Benefit From Concurrent Chemotherapy With Radiotherapy in Oropharyngeal Cancer. *J Clin Oncol* (2022) 40:2203–2212.
 38. Sharma N, Naraev BG, Engelman EG, Zimmerman MB, Bushnell DL, O'Dorisio TM, O'Dorisio MS, Menda Y, Müller-Brand J, Howe JR, et al. Peptide Receptor Radionuclide Therapy Outcomes in a North American Cohort With Metastatic Well-Differentiated Neuroendocrine Tumors. *Pancreas* (2017) 46:151–156.

Legends and Figures :

Table 1. Baseline clinical characteristics of patients

Table 2. Objective Tumor Response

Table 3. Multivariate analysis of clinical and biologic parameters and miRNA/mRNA signature

Figure 1 Overview of the study

1A: Presentation of the blood samples timing within the LuPRRT treatment frame.

1B: Gene expression stability before LuPRRT therapy: difference between two different blood samples (P1 and P2) obtained at 48h interval before starting LuPRRT ($p=0.68$). Non-significant (ns)

Figure 2. mRNA and miRNA expression kinetics during LuPRRT: before (P1-P2) treatment, before and after 2nd LuPRRT (P3 and P4), before and after the fourth LuPRRT (P5 and P6) and at 6-month follow-up (P7).

2A: Variation in the expression of 12 genes (mRNA) relative to those of GAPDH

2B: Variation in the expression of 6 miRNA relative to those of RNU6-1

Figure 3. Differential profiles before and 48h after the second and the fourth LuPRRT injection for miRNA/mRNA signature, Chromogranin A and 5HIAA for patients with stable (SD) or progressive disease (PD) at 12-month follow-up.

3A: miRNA/mRNA signature before second (P3) and fourth (P5) LuPRRT administration for four mRNAs and three miRNAs in patients considered as responders (SD-P3 and SD-P5) versus progressive patients (PD-P3 and PD-P5)

3B: Chromogranin A levels before second (P3) and fourth (P5) LuPRRT administration in responders (SD) or RECIST progressive (PD) patients at 12-month follow-up ($p=0.65$)

3C: 5HIAA levels before second (P3) and fourth (P5) LuPRRT administration in responders (SD) or RECIST progressive (PD) patients at 12-month follow-up ($p=0.24$)

*** $p<0.001$ **** $p<0.0001$; ns : non-significant

Figure 4. miRNA/mRNA signature for two patients with myelodysplasia (MDS) compared to all patients with stable disease at 1 year follow up (SD, n=24)

4A: Kinetics of miRNA/mRNA signature during LuPRRT treatment for each of patient presenting MDS.

4B: Variations of miRNA/mRNA signature at second and fourth LuPRRT injection using ratio of after/before LuPRRT signature

Table 1

Characteristics	Data	
Sex- no. (%)	Male 21 (60)	
	Female 14 (40)	
Age- yr	All patients 67 [52;83]	
	Male 71[56;83]	
	Female 65 [52;72]	
	24.04 [16.8; 37.18]	
Body mass index	52	
Median time (months) since diagnosis		
Primary tumor site- no (%)	Ileum 19 (54)	
	Jejunum 1 (3)	
	Midgut 6 (17)	
	Small intestine 2 (6)	
	Right colon 3 (9)	
	Ileo-cecal valve 3 (9)	
	Appendix 1 (3)	
	Site of metastasis- no. (%)	Liver 32 (91)
		Lymph Nodes 29 (83)
Mesentery 23 (65)		
Bone 17 (49)		
Lungs 1 (3)		
Ovaries 1 (3)		
Mammary gland 1 (3)		
Other 5 (14)		
Ki-67 Index		0-2% 12 (34)
	3-20% 23 (66)	
	Previous Treatments	Somatostatin analog 31 (89)
Surgery 22 (63)		
Everolimus 3 (9)		
Chemotherapy 6 (18)		
Locoregional therapy 3 (9)		
Performance status (ECOG)		0 18 (51)
	1 14 (40)	
	2 3 (9)	
	3-4 0	
	Somatostatin analogs during PRRT	No 7 (20)
Yes 28 (80)		

Qualitative data are expressed as numbers (no) followed by percentages in brackets; continuous data are expressed as mean ± SD.

Table 2

	12 month	24 months
Complete response- no (%)	0	0
Partial response- no (%)	3 (9)	0
Stability- no (%)	24 (69)	22 (63)
Progression- no (%)	5 (14)	7 (20)
Not known as patient deceased before imaging	3 (9)	6 (17)
Non-responders	8 (23)	13 (37)

Objective response at 12 and 24 months defined as a response according to Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST1.1)

Table 3

Variable	p value	
miRNA/mRNA signature at P3	0.0064	*
miRNA/mRNA signature at P5	0.0105	*
NADIR C1	0.2501	ns
NADIR C2	0.4285	ns
5HIAA at P3	0.2773	ns
5HIAA at P5	0.4446	ns
CgA at P3	0.1933	ns
CgA at P5	0.1346	ns
KI-67 index	0.0521	ns
RECIST12m	0.0237	*

Multivariate analysis. * p<0.05

Figure 1

Figure 1

1A

1B

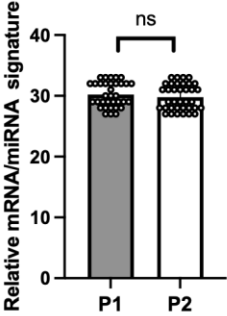
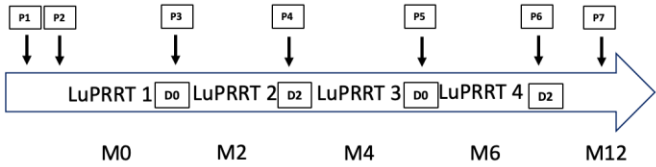


Figure 2

Figure 2

A

B

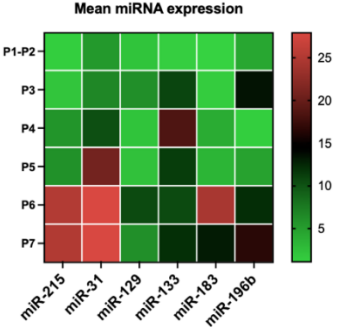
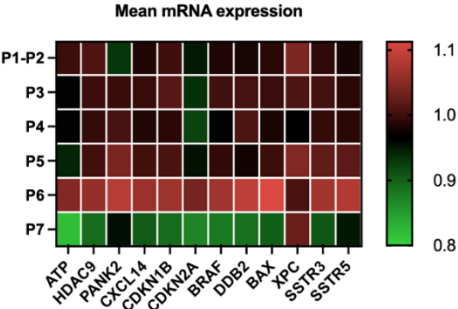


Figure 3

Figure 3

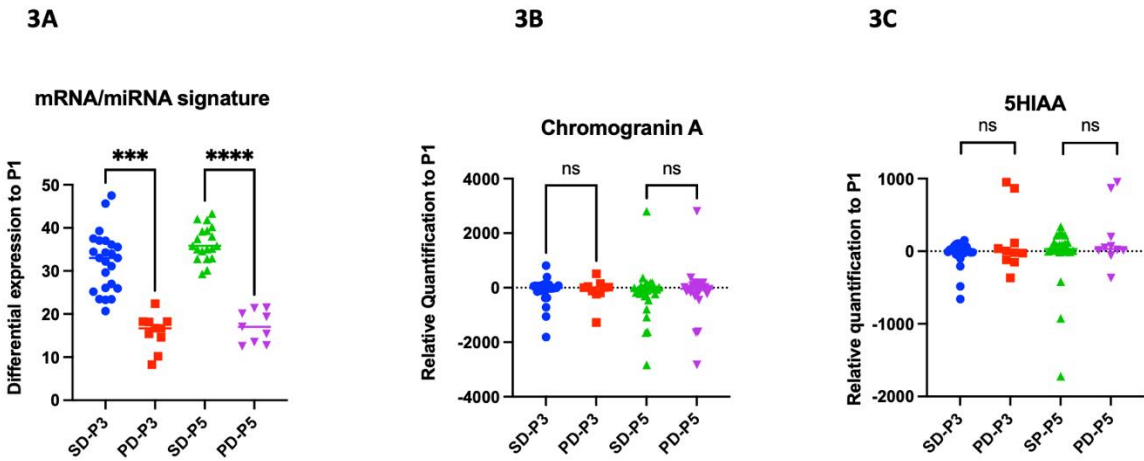
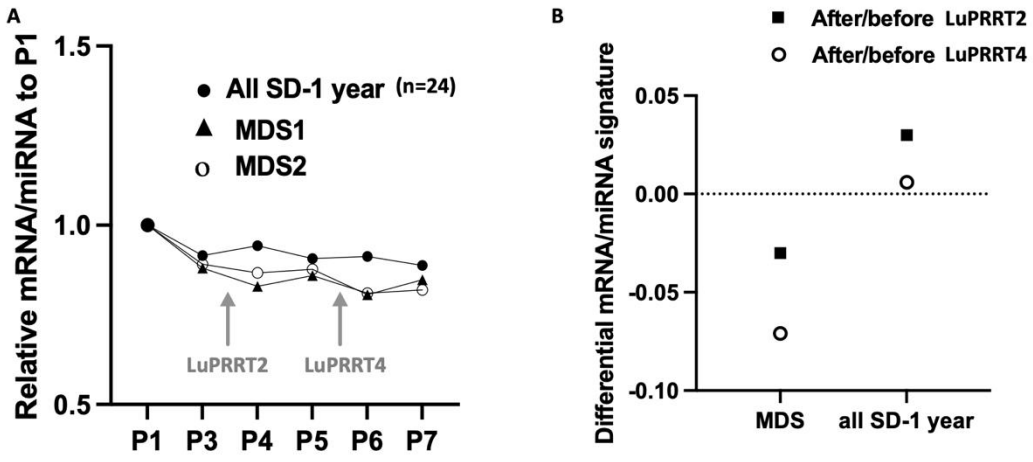


Figure 4

Figure 4



Supplemental Data :

Figure S1: Overall survival relative to KI-67 index

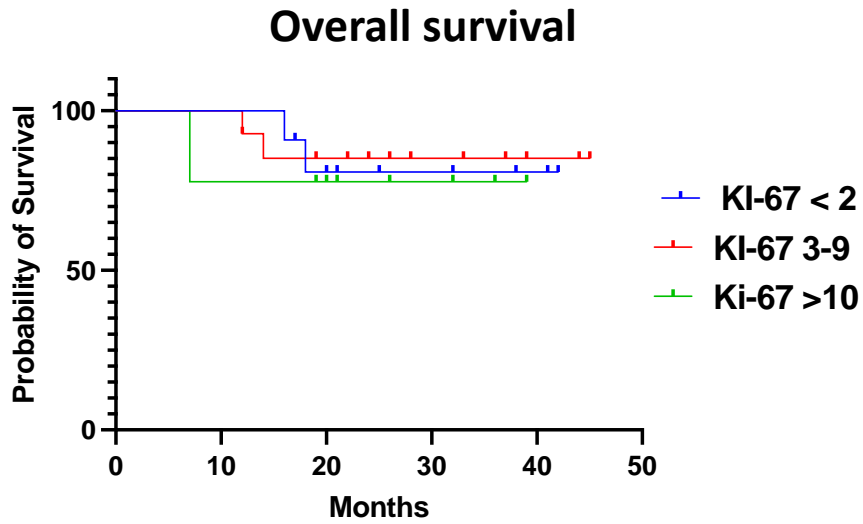


Figure S2: Pearson correlation 2x2 contingency table for lymphopenia at 15 days post first LuPRRT administration (NADIRC1) versus nadir at 45 days post first Lu PRRT administration (NADIRC2), Ki-67, and miRNA/mRNA signature after first LuPRRT in responder (SD-P3 and SD-P5) versus progressive patients (PD-P3 and PD-P5).

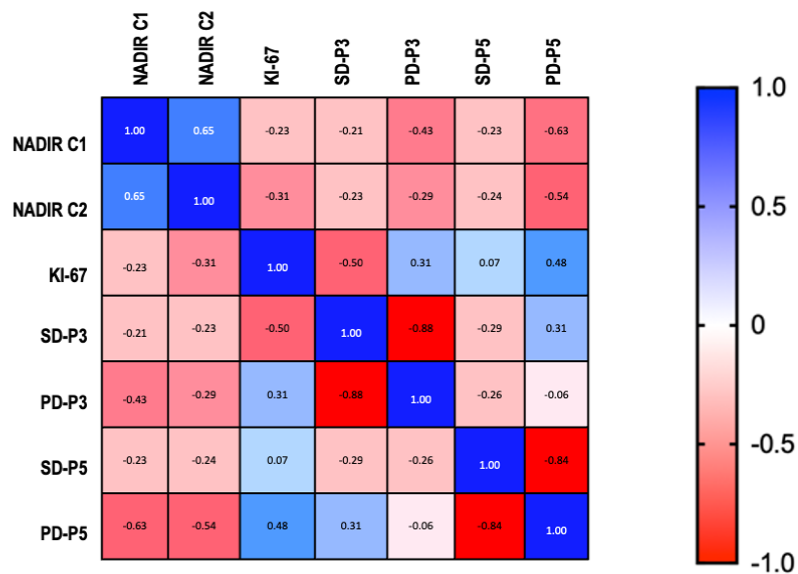


Table S1 : Primers used for mRNA and miRNA quantification

Primers	Forward	Reverse
miR-31	5'-AGGCAAGATGCTGGCATAGCT-3'	
miR-129-5p	5'-CTTTTTGCGGTCTGGGCTTGC-3'	
miR-133a	5'-AGCTGGTAAAATGGAACCAAAT-3'	
miR-215	5'-ATGACCTATGAATTGACAGAC-3'	
miR-183	5'-TATGGCACTGGTAGAATTCAC-3'	
miR-196b	5'-TAGGTAGTTTCATGTTGTTGGG-3'	
RNU6-1	5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'	
GAPDH	5'-ACAGTCAGCCGCATCTTCTT-3'	5'-TTGATTTTGGAGGGATCTCG-3'
ATP	5'-GGCGCCTCTGTCATTCTACT-3'	5'-CAACAAATCTCGCGAATCCTC-3'
BRAF	5'-CTTTCCCAAATTCTCGCCTC-3'	5'-GGACAGGAAACGCACCATA-3'
HDAC9	5'-GACGTGTGGTGTGGCTCTA-3'	5'-GTGGCTCCAGCTCATTTCTC-3'
PANK2	5'-CGGCCGCTTTTTCCATGGTT-3'	5'-AAGCCACATTGGAGGTCAGG-3'
SSTR3	5'-AAGCGGTCTAGAAGTGGGTG-3'	5'-CAGCTATTTGCCTGCCCAT-3'
SSTR5	5'-TTCTTCTCTTGCAGAGCCTGAC-3'	5'-ATGTTGGTGACGGTCTTCATCT-3'
CXCL14	5'-GGACCCAAGATCCGCTACAG-3'	5'-CTTCGTAGACCCTGCGCTTC-3'
CDKN1B	5'-GGCAAGTACGAGTGGCAAGA-3'	5'-AGAAGAATCGTCGGTTGCAGG-3'
CDKN2A	5'-AGTCTGCAGTTAAGGGGGCA-3'	5'-ATCATCATGACCTGGTCTTCTAGG-3'
DDB2	5'-GGAGGGAACAACACTAGGCTGC-3'	5'-TTCCAAAGCTCTTTGCCGTC-3'
XPC	5'-GAGCAAGGCCCGGCG-3'	5'-GAAAGTCCCTGAGGTCATCCC-3'
BAX	5'-GGAGCTGCAGAGGATGATTG-3'	5'-GGAGACAGGGACATCAGTCG-3'

Table S2 : Univariate and multivariate Cox regression analysis of the 12 mRNA and the 6 miRNA associated with Recist

Gene	Univariate HR	Univariate pvalue	Multivariate HR	Multivariate pvalue
<i>miR-31</i>	2.32	<0.001	1.03	0.01
<i>miR-129-5p</i>	0.87	<0.001	0.88	0.08
<i>miR-133a</i>	1.32	<0.001	1.02	0.06
<i>miR-215</i>	1.12	<0.001	0.85	0.06
<i>miR-183</i>	1.14	<0.001	1.06	0.02
<i>miR-196b</i>	1.27	<0.001	1.06	0.01
<i>ATP</i>	1.11	<0.001	0.84	0.06
<i>BRAF</i>	1.51	<0.001	0.88	0.08
<i>HDAC9</i>	1.23	<0.001	1.02	0.06
<i>PANK2</i>	1.11	<0.001	0.83	0.09
<i>SSTR3</i>	1.65	<0.001	1.06	0.02
<i>SSTR5</i>	1.65	<0.001	1.07	0.02
<i>CXCL14</i>	1.18	<0.001	0.88	0.07
<i>CDKN1B</i>	1.11	<0.001	1.01	0.09
<i>CDKN2A</i>	1.11	<0.001	1.11	0.09
<i>DDB2</i>	1.58	<0.001	1.19	0.01
<i>XPC</i>	1.65	<0.001	1.12	0.001
<i>BAX</i>	1.59	<0.001	1.07	0.001

DISCUSSION

Les profils d'expression de chacun des treize ARNm et des six miRNA sélectionnés ont été explorés pendant et après LuPRRT afin d'identifier la meilleure combinaison d'ARNm et de miARN permettant de prédire l'évolution de la maladie du patient.

Parmi ces gènes, nous nous sommes concentrés sur quatre ARNm et de trois miRNA qui étaient ceux dont l'expression variait de la façon la plus significative pour l'ensemble des patients ; ils correspondaient à :

- La réparation de l'ADN endommagé (*Xpc* et *Ddb2*),
- La régulation de la prolifération cellulaire et de l'autophagie (*Bax* et *Braf*),
- L'activation des lymphocytes B/T (miR-31 et miR-133),
- La régulation de l'angiogenèse et de la suppression tumorale (miR-196b).

Nous avons réalisé l'étude de la stabilité de tous ces marqueurs en dehors de toute LuPRRT (P1 et P2) ceci afin de de s'affranchir d'une variation non spécifique de l'expression des gènes sélectionnés (Chomczynski et al. 2016).

Les gènes *Bax* et *Ddb2* présentaient une expression significativement augmentée précocement, dès 2 mois après la première administration de LuPRRT (P3) ; leur expression en constante augmentation 4 mois après le début de LuPRRT (P5), suggérait des effets radio-biologiques persistants.

L'expression de miR-31 était significativement diminuée dès 2 mois après la première injection de LuPRRT (P3) par rapport à la ligne de base (P1-P2) et celle de miR-133 et miR-196 étaient significativement diminuées pendant la LuPRRT mais également 6 mois après la quatrième injection LuPRRT (P7), suggérant une activation soutenue des voies cellulaires antitumorales en raison de l'irradiation au ¹⁷⁷Lu.

Ces profils d'expression relatifs des ARNm et miARN ont été combinés afin d'en évaluer l'évolution au cours du traitement, et leur corrélation à la toxicité hématopoïétique ; l'analyse par corrélation de Pearson a montré :

- Une corrélation inverse modérée entre un Ki-67 élevé et un profil d'expression d'ARNm/miRNA bas chez les répondeurs.
- Une corrélation inverse modérée entre la lymphopénie précoce (15 jours après la première LuPRRT) et la signature ARNm/miARN pour les non-répondeurs à la LuPRRT ; ceci suggérant une association entre la lymphopénie et une radiosensibilité chez les répondeurs à la LuPRRT.

Notre objectif n'était pas de concurrencer le NETest mais d'utiliser des biomarqueurs plus spécifiques ; ainsi plus de la moitié des ARNm de notre sélection ne sont pas commun avec ceux du NETest et aucun miRNA n'était inclus dans le test mis en place par Modlin (Irvin M. Modlin et al. 2018).

En raison de leur stabilité et de leur rôle régulateur notamment de la prolifération et du métabolisme des NNE, nous avons choisi d'explorer l'expression de miARN comme régulateurs négatifs des fonctions ciblées par les ARNm différentiels, cette approche ayant déjà démontré son intérêt dans l'identification de biomarqueurs parmi les plus pertinents (Jacques et al. 2013).

Le NETest, à l'aide de quatre algorithmes de prédiction, est bien sûr pertinent pour définir un score d'évolution de la maladie (I. M. Modlin et al. 2021; Irvin M. Modlin, Drozdov, et Kidd 2013), cependant, en fonction des valeurs seuils, la spécificité de ce test semble varier si l'on en croit de récentes études indépendantes (Al-Toubah et al. 2021; Öberg et al. 2020) montrant les difficultés à standardiser les profils d'expression des ARNm.

Plusieurs pistes demeurent malgré tout à développer :

- **Signature génique et autres biomarqueurs :**
 - Validation à grande échelle :
Confirmer les résultats des études actuelles en effectuant des essais à plus grande échelle (nationale) pour valider les signatures géniques prédictives de la réponse à la LuPRRT.

- Élargir les profils biomoléculaires :
Investiguer d'autres biomarqueurs potentiels, tels que des protéines spécifiques ou des métabolites, qui pourraient améliorer la prédiction de la réponse.
Réanalyser des données de transcriptomique des NNE digestives disponibles dans les bases de données permettrait d'améliorer la sélection de miRNA que nous avons identifiés comme marqueurs robustes pour le suivi du traitement par LuPRRT et qui auraient l'avantage de réguler des fonctions essentielles à l'évolution tumorale ou à la sensibilité au traitement.
- **Analyser, sur nos prélèvements P1 à P7, les profils des gènes identifiés comme cible de modification épigénétique** (méthylation / acétylation des histones ou méthylation de promoteurs) comme les gènes de la *beta-catenin 1* (*Ctnnb1*) ou du *runt related transcription factor* (*Runx3*) (Karpathakis et al. 2016).
- **Analyser, sur les prélèvements P1 à P7, les profils mutationnels de l'ADNmt comme cible précoce de la LuPRRT**
En effet, la mitochondrie possède un système de réparation des dommages à l'ADN propre mais dont les capacités sont modifiées par l'âge et le développement tumoral (Wagner et al. 2022; Gredilla 2010).

Nous espérons que la poursuite du protocole GENEbioLuNET avec l'ajout de nouveaux gènes d'intérêt au panel testé et l'étude de nouveaux miRNA permettra d'identifier des biomarqueurs moléculaires solides et ouvrira de nouvelles perspectives dans la prise en charge des patients atteints de NNE intestinales.

PARTIE III : DISCUSSION
GENERALE ET
PERSPECTIVES

DISCUSSION GENERALE

Le métabolisme énergétique et l'épigénétique sont hautement interconnectés, le métabolisme fournissant les composés nécessaires pour les réactions épigénétiques, et ces modifications épigénétiques régulant à leur tour l'expression des gènes en fonction des besoins énergétiques de la cellule.

Cette interaction est cruciale pour le fonctionnement normal des cellules et peut également jouer un rôle dans le développement de maladies lorsque ces mécanismes sont perturbés.

Nous avons exploré deux modèles de pathologies pour préciser ces interconnexions, le modèle des thérapies cellulaires dans l'insuffisance cardiaque et le modèle des thérapies métaboliques dans le cadre des tumeurs neuroendocrines digestives.

Dans le tissu cardiaque, les MSC jouent un rôle clé dans l'homéostasie et la réparation du tissu cardiaque.

Les fonctions cellulaires et le potentiel de différenciation de ces cellules sont fortement dépendants du métabolisme énergétique.

Au cours du vieillissement, le nombre et la potentialité de ces MSC varient en lien avec l'apparition de désordres métaboliques jouant un rôle clé dans la lignée et l'issue fonctionnelle de ces cellules.

Toutes modifications du métabolisme énergétique et de la dynamique mitochondriale sont ainsi associées au risque de vieillissement cardiaque accéléré et à l'infarctus.

Parmi les moyens thérapeutiques de l'insuffisance cardiaque, les bmMSC présentent un faible risque de rejet, un fort pouvoir d'expansion *in vitro* et des capacités à migrer vers les sites lésés de l'organisme pour participer à l'homéostasie et à la régénération tissulaire ; en revanche, elles présentent une faible différenciation *in vivo* et une survie limitée dans l'environnement hypoxique cardiaque après transplantation.

Notre objectif a été d'améliorer la survie des bmMSC au sein du tissu cardiaque en les orientant vers un métabolisme glycolytique à l'aide d'un conditionnement épigénétique ou en réalisant un tri métabolique.

L'analyse comparative de ces deux approches nous a permis de confirmer l'intérêt métabolique des bmMSC glycolytique *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de souris présentant une insuffisance cardiaque aigüe.

Par ailleurs, la thérapie cellulaire est apparue comme une stratégie prometteuse pour le traitement de l'infarctus du myocarde ischémique via deux stratégies différentes :

- La reconstruction du tissu natif perdu,
- L'inhibition du remodelage du myocarde restant et sa cicatrisation.

Néanmoins, les difficultés liées à l'obtention de différents types de cellules et à la construction d'une structure tissulaire physiologique excluent les applications cliniques. Même pour les constructions les mieux rapportées, l'intégration fonctionnelle avec le tissu hôte est absente (Hashemzadeh et al. 2021).

Divers « pansements » cardiaques à base de polymères sont testés pour soutenir le myocarde endommagé. De tels pansements ont été préparés à partir de biopolymères, de polymères synthétiques et de protéines présentes dans les tissus hôtes.

Les patches constitués de protéines tissulaires sont biocompatibles et bioactifs mais ont une faible résistance mécanique. En revanche, les biopolymères présentent une bonne biocompatibilité et bio activité, mais ont des possibilités d'ingénierie limitées.

Le potentiel thérapeutique de la thérapie cellulaire combinée et des patches cardiaques a suscité de nombreuses recherches.

Récemment, les hydrogels dynamiques préparés à partir de biopolymères tels que l'alginate, le chitosan et le collagène *via* la réaction de base de Schiff ont attiré beaucoup d'attention, cette réaction permettant la liaison covalente de biopolymères dans des conditions de gélification douces (R. Yu et al. 2020).

Ainsi, les équipes du Centre interuniversitaire de recherche et d'ingénierie des matériaux (CIRIMAT) et de l'I2MC explorent une stratégie thérapeutique innovante associant la thérapie cellulaire à une construction biomimétique 3D visant à concentrer les MSC sur le site lésé et à améliorer leur viabilité et leurs effets paracrines.

Le CIRIMAT a développé un procédé vert pour produire des matrices poreuses 3D originales à base d'alginate et de chitosan (Bushkalova et al. 2019). Ces matrices présentent des propriétés mécaniques adaptées à l'implantation cardiaque et à l'ensemencement de MSC.

Les tests *in vitro* réalisés par I2MC ont montré que la matrice permettait le maintien de la viabilité des MSC et une sécrétion accrue de facteurs de croissance d'intérêt. L'implantation d'un échafaudageensemencé de MSC dans un modèle préclinique d'infarctus du myocarde a amélioré la fonction cardiaque et réduit le remodelage inadapté par rapport aux animaux non traités (Ceccaldi et al. 2014).

Dans le modèle des tumeurs neuroendocrines digestives nous avons exploré les marqueurs de toxicité de la radiothérapie interne vectorisée ou PRRT, traitement utilisant des isotopes radioactifs qui se lient spécifiquement aux récepteurs de surface des cellules tumorales neuroendocrines afin de les détruire.

Les modifications épigénétiques et métaboliques jouent un rôle important dans la sensibilité des cellules tumorales à la PRRT, or, comprendre ces interactions métaboliques est une piste pour optimiser les protocoles de PRRT pour un traitement efficace tout en limitant leur toxicité hématologique.

Nous avons développé des marqueurs ARNm et miRNA ciblant notamment le métabolisme énergétique et son interaction avec les modificateurs d'histones afin de proposer une signature de réponse et de suivi de la PRRT pour des patients atteints de tumeurs neuroendocrines digestives progressives.

La combinaison de marqueurs miRNA et ARNm s'est avérée particulièrement pertinente dans les boucles de contrôles métaboliques et ces derniers présentent une bonne sensibilité de réponse, ceci, dès la seconde ligne de traitement.

Notre travail d'exploration des liens entre le métabolisme cellulaire et les modifications épigénétiques nous a permis de proposer un modèle thérapeutique pour l'insuffisance cardiaque et des biomarqueurs de sensibilité à une thérapie métabolique ciblée.

Le corolaire entre ces deux travaux réside dans l'importance accordée à la compréhension des mécanismes métaboliques et épigénétiques dans un but d'améliorer l'efficacité des thérapies.

Dans le premier cas, la régulation du métabolisme des bmMSC est considérée comme cruciale pour leur fonction régénératrice alors que dans le deuxième cas, l'analyse des profils d'expression génique est utilisée pour prédire la réponse des patients à la LuPRRT.

Dans les deux cas, la nécessité de cibler spécifiquement les processus métaboliques et épigénétiques pour optimiser les résultats thérapeutiques est soulignée.

Les approches expérimentales, telles que la modulation métabolique et l'inhibition épigénétique, sont envisagées comme des stratégies potentielles pour améliorer l'efficacité des traitements.

Ces deux travaux de recherche soulignent l'importance de personnaliser les approches thérapeutiques en tenant compte des aspects métaboliques et épigénétiques.

Les stratégies visant à moduler le métabolisme des cellules souches ou à identifier des signatures géniques pour prédire la réponse au traitement sont des avenues prometteuses pour améliorer l'efficacité des thérapies cellulaires et des traitements ciblés.

La recherche continue dans ces domaines et pourrait ouvrir la voie à des thérapies plus efficaces et mieux adaptées aux besoins individuels des patients.

PERSPECTIVES

Les perspectives issues de ces discussions ouvrent la voie à plusieurs développements possibles dans les domaines de la thérapie cellulaire et du traitement des GI-NET:

➤ **Optimisation des thérapies par utilisant les bmMSC :**

○ Ingénierie métabolique

Les approches visant à moduler le métabolisme des bmMSC, telles que l'hypoxie conditionnelle et l'inhibition du LSD1, pourraient être davantage explorées et optimisées.

Des études plus approfondies sur les mécanismes moléculaires sous-jacents pourraient conduire à des méthodes plus précises et efficaces.

○ Protocoles cliniques

Les résultats des études précliniques sur les modificateurs métaboliques pourraient être traduits dans des protocoles cliniques pour évaluer l'efficacité des bmMSC dans le traitement de l'insuffisance cardiaque.

➤ **Thérapie par radiopeptides (LuPRRT) dans les GI-NET :**

○ Validation des signatures géniques

Les signatures géniques basées sur l'expression d'ARNm et de miARN pour prédire la réponse à la LuPRRT doivent être validées à grande échelle.

Des études multicentriques avec des cohortes de patients plus importantes permettront de confirmer la robustesse de ces signatures et de les intégrer dans la pratique clinique.

○ Thérapies personnalisées

La recherche sur la LuPRRT suggère la possibilité de personnaliser davantage les traitements en fonction des profils génétiques des patients.

Des stratégies de traitement plus précises pourraient être développées en tenant compte de la variabilité génétique qui influence la réponse aux radiopeptides.

➤ Approche holistique :

○ Intégration des données

Une approche holistique intégrant des données métaboliques, génomiques et épigénétiques pourrait offrir une compréhension plus complète des mécanismes de réponse aux thérapies et pourrait conduire à des interventions combinées plus efficaces.

○ Recherche translationnelle

La recherche devrait se concentrer sur la translation des découvertes en applications cliniques concrètes comme la bio-impression 3D d'un patch cardiaque de nouvelle génération pour lutter contre l'insuffisance cardiaque. Des collaborations entre chercheurs, cliniciens et l'industrie pharmaceutique pourraient accélérer la mise en œuvre de ces découvertes pour le bénéfice des patients en utilisant notamment les biomatériaux.

En conclusion, les perspectives futures incluent l'optimisation des approches thérapeutiques existantes, la validation de biomarqueurs prédictifs, la personnalisation des traitements et une approche intégrée pour une meilleure compréhension des maladies et des réponses aux thérapies.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- A, Rahmim, et Zaidi H. 2008. « PET versus SPECT: Strengths, Limitations and Challenges ». *Nuclear Medicine Communications* 29 (3). <https://doi.org/10.1097/MNM.0b013e3282f3a515>.
- Abdel-Magid, Ahmed F. 2017. « Lysine-Specific Demethylase 1 (LSD1) Inhibitors as Potential Treatment for Different Types of Cancers ». *ACS Medicinal Chemistry Letters* 8 (11): 1134-35. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.7b00426>.
- Adamo, Antonio, Borja Sesé, Stephanie Boue, Julio Castaño, Ida Paramonov, Maria J. Barrero, et Juan Carlos Izpisua Belmonte. 2011. « LSD1 Regulates the Balance between Self-Renewal and Differentiation in Human Embryonic Stem Cells ». *Nature Cell Biology* 13 (6): 652-59. <https://doi.org/10.1038/ncb2246>.
- Ahmad, Tanveer, Shravani Mukherjee, Bijay Pattnaik, Manish Kumar, Suchita Singh, Manish Kumar, Rakhshinda Rehman, et al. 2014. « Miro1 Regulates Intercellular Mitochondrial Transport & Enhances Mesenchymal Stem Cell Rescue Efficacy ». *The EMBO Journal* 33 (9): 994-1010. <https://doi.org/10.1002/embj.201386030>.
- Al-Mehdi, Abu-Bakr, Viktor M. Pastukh, Brad M. Swiger, Darla J. Reed, Mita R. Patel, Gina C. Bardwell, Viktoriya V. Pastukh, Mikhail F. Alexeyev, et Mark N. Gillespie. 2012. « Perinuclear Mitochondrial Clustering Creates an Oxidant-Rich Nuclear Domain Required for Hypoxia-Induced Transcription ». *Science Signaling* 5 (231): ra47. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002712>.
- Al-Toubah, Taymeyah, Mauro Cives, Tiffany Valone, Kirsten Blue, et Jonathan Strosberg. 2021. « Sensitivity and Specificity of the NETest: A Validation Study ». *Neuroendocrinology* 111 (6): 580-85. <https://doi.org/10.1159/000509866>.
- Alvites, Rui, Mariana Branquinho, Ana C. Sousa, Bruna Lopes, Patrícia Sousa, et Ana Colette Maurício. 2022. « Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Paracrine Activity—Immunomodulation Mechanisms and How to Influence the Therapeutic Potential ». *Pharmaceutics* 14 (2): 381. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020381>.
- Aly, Riham Mohamed. 2020. « Current state of stem cell-based therapies: an overview ». *Stem Cell Investigation* 7 (mai): 8. <https://doi.org/10.21037/sci-2020-001>.
- Ambrosini, Valentina, Davide Campana, Paola Tomassetti, et Stefano Fanti. 2012. « 68Ga-Labelled Peptides for Diagnosis of Gastroenteropancreatic NET ». *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 39 (1): 52-60. <https://doi.org/10.1007/s00259-011-1989-4>.
- Andersson, Ulf, et Richard C. Scarpulla. 2001. « PGC-1-Related Coactivator, a Novel, Serum-Inducible Coactivator of Nuclear Respiratory Factor 1-Dependent Transcription in Mammalian Cells ». *Molecular and Cellular Biology* 21 (11): 3738-49. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.11.3738-3749.2001>.
- André, Jp Saint, I Valo, et S Guyétant. 2003. « Anatomie pathologique des tumeurs neuro-endocrines ».
- Andreassen, Christian Nicolaj, Jan Alsner, Marie Overgaard, et Jens Overgaard. 2003. « Prediction of Normal Tissue Radiosensitivity from Polymorphisms in Candidate Genes ». *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 69 (2): 127-35. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2003.09.010>.
- Archer, Krystal, Zuzana Broskova, Ahmed S. Bayoumi, Jian-peng Teoh, Alec Davila, Yaoliang Tang, Huabo Su, et Il-man Kim. 2015. « Long Non-Coding RNAs as Master Regulators in Cardiovascular Diseases ». *International Journal of Molecular Sciences* 16 (10): 23651-67. <https://doi.org/10.3390/ijms161023651>.
- Arvidsson, Yvonne, Anna Rehammar, Anders Bergström, Ellinor Andersson, Gülay Altıparmak, Christina Swärd, Bo Wängberg, Erik Kristiansson, et Ola Nilsson. 2018. « miRNA Profiling of Small Intestinal Neuroendocrine Tumors Defines Novel Molecular Subtypes and Identifies miR-

- 375 as a Biomarker of Patient Survival ». *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 31 (8): 1302-17. <https://doi.org/10.1038/s41379-018-0010-1>.
- Atashzar, Mohammad Reza, Rasoul Baharlou, Jafar Karami, Hamid Abdollahi, Ramazan Rezaei, Fatemeh Pourramezan, et Seyed Hamid Zoljalali Moghaddam. 2020. « Cancer Stem Cells: A Review from Origin to Therapeutic Implications ». *Journal of Cellular Physiology* 235 (2): 790-803. <https://doi.org/10.1002/jcp.29044>.
- Azevedo, Paula S., Bertha F. Polegato, Marcos F. Minicucci, Sergio A. R. Paiva, et Leonardo A. M. Zornoff. 2016. « Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment ». *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 106 (1): 62-69. <https://doi.org/10.5935/abc.20160005>.
- Azria, David, Olivier Riou, Florence Castan, Tan Dat Nguyen, Karine Peignaux, Claire Lemanski, Jean-Léon Lagrange, et al. 2015. « Radiation-induced CD8 T-lymphocyte Apoptosis as a Predictor of Breast Fibrosis After Radiotherapy: Results of the Prospective Multicenter French Trial ». *EBioMedicine* 2 (12): 1965-73. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.10.024>.
- Bach, Daniel, Sara Pich, Francesc X. Soriano, Nathalie Vega, Bernhard Baumgartner, Josep Oriola, Jens R. Daugaard, et al. 2003. « Mitofusin-2 Determines Mitochondrial Network Architecture and Mitochondrial Metabolism. A Novel Regulatory Mechanism Altered in Obesity ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (19): 17190-97. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212754200>.
- Bahir, Bushra, Mahmood S. Choudhery, Ijaz Hussain, Bushra Bahir, Mahmood S. Choudhery, et Ijaz Hussain. 2020. « Hypoxic Preconditioning as a Strategy to Maintain the Regenerative Potential of Mesenchymal Stem Cells ». In *Regenerative Medicine*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.93217>.
- Bai, M., C.-L. Pan, G.-X. Jiang, Y.-M. Zhang, et Z. Zhang. 2019. « CircHIPK3 Aggravates Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury by Binding to miRNA-124-3p ». *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 23 (22): 10107-14. https://doi.org/10.26355/eurrev_201911_19580.
- Bao, Xingting, Jinhua Zhang, Guomin Huang, Junfang Yan, Caipeng Xu, Zhihui Dou, Chao Sun, et Hong Zhang. 2021. « The crosstalk between HIFs and mitochondrial dysfunctions in cancer development ». *Cell Death & Disease* 12 (2): 215. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03505-1>.
- Baranowska, Alicja, Kamila Matyka, Aleksandra Matyszewska, Anna Słowiacek, Jakub Sutkowski, Ewelina Wilczewska, et Marcin Wojnar. 2023. « Melatonin – the New Multipotential Drug of the Future? ». *Journal of Education, Health and Sport* 13 (4): 330-38. <https://doi.org/10.12775/JEHS.2023.13.04.040>.
- Barrero, Maria J. 2020. « Epigenetic Regulation of the Non-Coding Genome: Opportunities for Immunology ». *Epigenomes* 4 (3): 22. <https://doi.org/10.3390/epigenomes4030022>.
- Bartholomew, Amelia, Cord Sturgeon, Mandy Siatskas, Karen Ferrer, Kevin McIntosh, Sheila Patil, Wayne Hardy, et al. 2002. « Mesenchymal Stem Cells Suppress Lymphocyte Proliferation in Vitro and Prolong Skin Graft Survival in Vivo ». *Experimental Hematology* 30 (1): 42-48. [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(01\)00769-X](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(01)00769-X).
- Bartsch, Helmut, Heike Dally, Odilia Popanda, Angela Risch, et Peter Schmezer. 2007. « Genetic Risk Profiles for Cancer Susceptibility and Therapy Response ». *Recent Results in Cancer Research. Fortschritte Der Krebsforschung. Progres Dans Les Recherches Sur Le Cancer* 174: 19-36. https://doi.org/10.1007/978-3-540-37696-5_2.
- Bassett, Shalome A., et Matthew P. G. Barnett. 2014. « The Role of Dietary Histone Deacetylases (HDACs) Inhibitors in Health and Disease ». *Nutrients* 6 (10): 4273-4301. <https://doi.org/10.3390/nu6104273>.
- Baum, Richard P., et Harshad R. Kulkarni. 2012. « THERANOSTICS: From Molecular Imaging Using Ga-68 Labeled Tracers and PET/CT to Personalized Radionuclide Therapy - The Bad Berka Experience ». *Theranostics* 2 (5): 437-47. <https://doi.org/10.7150/thno.3645>.
- Baysal, Bora E. 2013. « Mitochondrial Complex II and Genomic Imprinting in Inheritance of Paraganglioma Tumors ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, Respiratory complex II: Role in cellular physiology and disease*, 1827 (5): 573-77. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.12.005>.
- Beegle, Julie, Kinga Lakatos, Stefanos Kalomoiris, Heather Stewart, R. Rivkah Isseroff, Jan A. Nolte, et Fernando A. Fierro. 2015. « Hypoxic Preconditioning of Mesenchymal Stromal Cells Induces Metabolic Changes, Enhances Survival, and Promotes Cell Retention In Vivo ». *Stem Cells* 33 (6): 1818-28. <https://doi.org/10.1002/stem.1976>.
- Beharry, Zanna, Sandeep Mahajan, Marina Zemskova, Ying-Wei Lin, Baby G. Tholanikunnel, Zuping Xia, Charles D. Smith, et Andrew S. Kraft. 2011. « The Pim protein kinases regulate energy

- metabolism and cell growth ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (2): 528-33. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013214108>.
- Belaidi, Elise, Jessica Morand, Emmanuelle Gras, Jean-Louis Pépin, et Diane Godin-Ribuot. 2016. « Targeting the ROS-HIF-1-endothelin axis as a therapeutic approach for the treatment of obstructive sleep apnea-related cardiovascular complications ». *Pharmacology & Therapeutics* 168 (décembre): 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.07.010>.
- Bellio, Michael A., Claudia O. Rodrigues, Ana Marie Landin, Konstantinos E. Hatzistergos, Jeffim Kuznetsov, Victoria Florea, Krystalenia Valasaki, Aisha Khan, Joshua M. Hare, et Ivonne Hernandez Schulman. 2016. « Physiological and hypoxic oxygen concentration differentially regulates human c-Kit⁺ cardiac stem cell proliferation and migration ». *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 311 (6): H1509-19. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00449.2016>.
- Beltrami, Antonio P., Laura Barlucchi, Daniele Torella, Mathue Baker, Federica Limana, Stefano Chimenti, Hideko Kasahara, et al. 2003. « Adult Cardiac Stem Cells Are Multipotent and Support Myocardial Regeneration ». *Cell* 114 (6): 763-76. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00687-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00687-1).
- Beltrami, Cristina, Marie Besnier, Saran Shantikumar, Andrew I.U. Shearn, Cha Rajakaruna, Abas Laftah, Fausto Sessa, et al. 2017. « Human Pericardial Fluid Contains Exosomes Enriched with Cardiovascular-Expressed MicroRNAs and Promotes Therapeutic Angiogenesis ». *Molecular Therapy* 25 (3): 679-93. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2016.12.022>.
- Benjamin, Emelia J., Paul Muntner, Alvaro Alonso, Marcio S. Bittencourt, Clifton W. Callaway, April P. Carson, Alanna M. Chamberlain, et al. 2019. « Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association ». *Circulation* 139 (10): e56-528. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000659>.
- Bereiter-Hahn, J., et M. Vöth. 1994. « Dynamics of Mitochondria in Living Cells: Shape Changes, Dislocations, Fusion, and Fission of Mitochondria ». *Microscopy Research and Technique* 27 (3): 198-219. <https://doi.org/10.1002/jemt.1070270303>.
- Bergmann, Olaf, Ratan D. Bhardwaj, Samuel Bernard, Sofia Zdunek, Fanie Barnabé-Heider, Stuart Walsh, Joel Zupicich, et al. 2009. « Evidence for cardiomyocyte renewal in humans ». *Science (New York, N. Y.)* 324 (5923): 98-102. <https://doi.org/10.1126/science.1164680>.
- Bergsma, Hendrik, Kirsten van Lom, Marc H. G. P. Raaijmakers, M. Konijnenberg, B. L. Boen L. R. Kam, Jaap J. M. Teunissen, Wouter W. de Herder, Eric P. Krenning, et Dik J. Kwekkeboom. 2018. « Persistent Hematologic Dysfunction after Peptide Receptor Radionuclide Therapy with ¹⁷⁷Lu-DOTATATE: Incidence, Course, and Predicting Factors in Patients with Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors ». *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 59 (3): 452-58. <https://doi.org/10.2967/jnumed.117.189712>.
- Bernstein, Bradley E., Tarjei S. Mikkelsen, Xiaohui Xie, Michael Kamal, Dana J. Huebert, James Cuff, Ben Fry, et al. 2006. « A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells ». *Cell* 125 (2): 315-26. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.041>.
- Bevere, Michele, Francesca Masetto, Maria Elena Carazzolo, Alice Bettega, Anastasios Gkoutakos, Aldo Scarpa, et Michele Simbolo. 2023. « An Overview of Circulating Biomarkers in Neuroendocrine Neoplasms: A Clinical Guide ». *Diagnostics* 13 (17): 2820. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13172820>.
- Bhaskar, Birru, Naveen Kumar Mekala, Rama Raju Baadhe, et Parcha Sreenivasa Rao. 2014. « Role of Signaling Pathways in Mesenchymal Stem Cell Differentiation ». *Current Stem Cell Research & Therapy* 9 (6): 508-12. <https://doi.org/10.2174/1574888x09666140812112002>.
- Bick, Alexander G., James P. Pirruccello, Gabriel K. Griffin, Namrata Gupta, Stacey Gabriel, Danish Saleheen, Peter Libby, Sekar Kathiresan, et Pradeep Natarajan. 2020. « Genetic Interleukin 6 Signaling Deficiency Attenuates Cardiovascular Risk in Clonal Hematopoiesis ». *Circulation* 141 (2): 124-31. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.044362>.
- Blanco, Enrique, Mar González-Ramírez, Anna Alcaine-Colet, Sergi Aranda, et Luciano Di Croce. 2020. « The Bivalent Genome: Characterization, Structure, and Regulation ». *Trends in Genetics* 36 (2): 118-31. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2019.11.004>.
- Bobis-Wozowicz, Sylwia, Katarzyna Kmietek, Malgorzata Sekula, Sylwia Kedracka-Krok, Elzbieta Kamycka, Marta Adamiak, Urszula Jankowska, et al. 2015. « Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Microvesicles Transmit RNAs and Proteins to Recipient Mature Heart Cells Modulating Cell Fate and Behavior ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 33 (9): 2748-61. <https://doi.org/10.1002/stem.2078>.

- Bodei, L., M. Kidd, I. M. Modlin, S. Severi, I. Drozdov, S. Nicolini, D. J. Kwekkeboom, E. P. Krenning, R. P. Baum, et G. Paganelli. 2016. « Measurement of Circulating Transcripts and Gene Cluster Analysis Predicts and Defines Therapeutic Efficacy of Peptide Receptor Radionuclide Therapy (PRRT) in Neuroendocrine Tumors ». *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 43 (5): 839-51. <https://doi.org/10.1007/s00259-015-3250-z>.
- Bodei, Lisa, Mark S. Kidd, Aviral Singh, Wouter A. van der Zwan, Stefano Severi, Ignat A. Drozdov, Jaroslaw Cwikla, et al. 2018. « PRRT Genomic Signature in Blood for Prediction of 177Lu-Octreotate Efficacy ». *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 45 (7): 1155-69. <https://doi.org/10.1007/s00259-018-3967-6>.
- Bodei, Lisa, Mark S. Kidd, Aviral Singh, Wouter A. van der Zwan, Stefano Severi, Ignat A. Drozdov, Anna Malczewska, et al. 2020. « PRRT Neuroendocrine Tumor Response Monitored Using Circulating Transcript Analysis: The NETest ». *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 47 (4): 895-906. <https://doi.org/10.1007/s00259-019-04601-3>.
- Bodei, Lisa, Nitya Raj, Richard Kinh Gian Do, Simone Krebs, Diane Reidy, Mark Kidd, Ignat Drozdov, Irvin Modlin, et Heiko Schoder. 2021. « Blood Based Genomic Assessment of the Clinical Efficacy and Toxicity of Peptide Receptor Radionuclide Therapy (PRRT) ». *Journal of Nuclear Medicine* 62 (supplement 1): 78-78. https://jnm.snmjournals.org/content/62/supplement_1/78.
- Bodei, Lisa, Heiko Schöder, Richard P. Baum, Ken Herrmann, Jonathan Strosberg, Martyn Caplin, Kjell Öberg, et Irvin M. Modlin. 2020. « Molecular Profiling of Neuroendocrine Tumours to Predict Response and Toxicity to Peptide Receptor Radionuclide Therapy ». *The Lancet. Oncology* 21 (9): e431-43. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30323-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30323-5).
- Boettger, Thomas, Nadine Beetz, Sawa Kostin, Johanna Schneider, Marcus Krüger, Lutz Hein, et Thomas Braun. 2009. « Acquisition of the Contractile Phenotype by Murine Arterial Smooth Muscle Cells Depends on the Mir143/145 Gene Cluster ». *The Journal of Clinical Investigation* 119 (9): 2634-47. <https://doi.org/10.1172/JCI38864>.
- Bolcaen, Julie, Nastassja Combrink, Kaat Spoormans, Stuart More, Charlot Vandevoorde, Randall Fisher, et Janke Kleynhans. 2023. « Biodosimetry, can it find its way to the nuclear medicine clinic? ». *Frontiers in Nuclear Medicine* 3. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnume.2023.1209823>.
- Bourin, Philippe, Bruce A. Bunnell, Louis Casteilla, Massimo Dominici, Adam J. Katz, Keith L. March, Heinz Redl, J. Peter Rubin, Kotaro Yoshimura, et Jeffrey M. Gimble. 2013. « Stromal Cells from the Adipose Tissue-Derived Stromal Vascular Fraction and Culture Expanded Adipose Tissue-Derived Stromal/Stem Cells: A Joint Statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT) ». *Cytotherapy* 15 (6): 641-48. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.02.006>.
- Bournaud-Salinas, Claire. s. d. « Physiopathologie des tumeurs neuro-endocrines gastro-entéro-pancréatiques et approche théranostique ».
- Brito, Olga Martins de, et Luca Scorrano. 2008. « Mitofusin 2 Tethers Endoplasmic Reticulum to Mitochondria ». *Nature* 456 (7222): 605-10. <https://doi.org/10.1038/nature07534>.
- Bruno, Stefania, Cristina Grange, Maria Chiara Deregibus, Raffaele A. Calogero, Silvia Saviozzi, Federica Collino, Laura Morando, et al. 2009. « Mesenchymal Stem Cell-Derived Microvesicles Protect Against Acute Tubular Injury ». *Journal of the American Society of Nephrology* 20 (5): 1053. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008070798>.
- Bushkalova, Raya, Maylis Farno, Christophe Tenailleau, Benjamin Duployer, Daniel Cussac, Angelo Parini, Brigitte Sallerin, et Sophie Girod Fullana. 2019. « Alginate-chitosan PEC scaffolds: A useful tool for soft tissues cell therapy ». *International Journal of Pharmaceutics* 571 (novembre): 118692. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118692>.
- Cao, Genmao, Xuezhen Xuan, Ruijing Zhang, Jie Hu, et Honglin Dong. 2021. « Gene Therapy for Cardiovascular Disease: Basic Research and Clinical Prospects ». *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcvm.2021.760140>.
- Cao, Yang, Wen-Ting Guo, Shengya Tian, Xiaoping He, Xi-Wen Wang, Xiaomeng Liu, Kai-Li Gu, et al. 2015. « miR-290/371-Mbd2-Myc circuit regulates glycolytic metabolism to promote pluripotency ». *The EMBO Journal* 34 (5): 609-23. <https://doi.org/10.15252/embj.201490441>.
- Capello, Astrid, Eric P. Krenning, Wout A. P. Breeman, Bert F. Bernard, et Marion de Jong. 2003. « Peptide Receptor Radionuclide Therapy in Vitro Using [111In-DTPA0]Octreotide ». *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 44 (1): 98-104.
- Ceccaldi, Caroline, Raya Bushkalova, Chiara Alfarano, Olivier Lairez, Denis Calise, Philippe Bourin, Celine Frugier, et al. 2014. « Evaluation of Polyelectrolyte Complex-Based Scaffolds for Mesenchymal Stem Cell Therapy in Cardiac Ischemia Treatment ». *Acta Biomaterialia* 10 (2): 901-11. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.10.027>.

- Cenik, Bercin K., et Ali Shilatifard. 2021. « COMPASS and SWI/SNF Complexes in Development and Disease ». *Nature Reviews Genetics* 22 (1): 38-58. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0278-0>.
- Chagastelles, Pedro C., et Nance B. Nardi. 2011. « Biology of Stem Cells: An Overview ». *Kidney International Supplements* 1 (3): 63-67. <https://doi.org/10.1038/kisup.2011.15>.
- Chauhan, Aman, Elise Kohn, et Jaydira Del Rivero. 2020. « Neuroendocrine Tumors: Less known, often misunderstood and rapidly growing ». *JAMA oncology* 6 (1): 21-22. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2019.4568>.
- Chen, Hsiuchen, et David C. Chan. 2004. « Mitochondrial Dynamics in Mammals ». *Current Topics in Developmental Biology* 59: 119-44. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(04\)59005-1](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(04)59005-1).
- . 2009. « Mitochondrial Dynamics--Fusion, Fission, Movement, and Mitophagy--in Neurodegenerative Diseases ». *Human Molecular Genetics* 18 (R2): R169-176. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp326>.
- Chen, Hsiuchen, Anne Chomyn, et David C. Chan. 2005. « Disruption of Fusion Results in Mitochondrial Heterogeneity and Dysfunction ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (28): 26185-92. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503062200>.
- Chen, Huizhu, Rui Xia, Zhenlin Li, Lizhi Zhang, Chunchao Xia, Hua Ai, Zhigang Yang, et Yingkun Guo. 2016. « Mesenchymal Stem Cells Combined with Hepatocyte Growth Factor Therapy for Attenuating Ischaemic Myocardial Fibrosis: Assessment Using Multimodal Molecular Imaging ». *Scientific Reports* 6 (1): 33700. <https://doi.org/10.1038/srep33700>.
- Chen, Wancheng, Yukai Huang, Jiaochan Han, Lili Yu, Yanli Li, Ziyuan Lu, Hongbo Li, et al. 2016. « Immunomodulatory Effects of Mesenchymal Stromal Cells-Derived Exosome ». *Immunologic Research* 64 (4): 831-40. <https://doi.org/10.1007/s12026-016-8798-6>.
- Chianese, Ugo, Chiara Papulino, Eugenia Passaro, Tom Mj Evers, Mehrad Babaei, Antonella Toraldo, Tommaso De Marchi, et al. 2022. « Histone Lysine Demethylase Inhibition Reprograms Prostate Cancer Metabolism and Mechanics ». *Molecular Metabolism* 64 (octobre): 101561. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101561>.
- Chien, Kenneth R., Jonas Frisén, Regina Fritsche-Danielson, Douglas A. Melton, Charles E. Murry, et Irving L. Weissman. 2019. « Regenerating the Field of Cardiovascular Cell Therapy ». *Nature Biotechnology* 37 (3): 232-37. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0042-1>.
- Chomczynski, Piotr, William W. Wilfinger, Hamid R. Eghbalnia, Amy Kennedy, Michal Rymaszewski, et Karol Mackey. 2016. « Inter-Individual Differences in RNA Levels in Human Peripheral Blood ». *PLoS ONE* 11 (2): e0148260. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148260>.
- Chomyn, Anne, et Giuseppe Attardi. 2003. « MtDNA Mutations in Aging and Apoptosis ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 304 (3): 519-29. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)00625-9](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)00625-9).
- Chu, Dinh-Toi, Tiep Tien Nguyen, Nguyen Le Bao Tien, Dang-Khoa Tran, Jee-Heon Jeong, Pham Gia Anh, Vo Van Thanh, Dang Tien Truong, et Thien Chu Dinh. 2020. « Recent Progress of Stem Cell Therapy in Cancer Treatment: Molecular Mechanisms and Potential Applications ». *Cells* 9 (3): 563. <https://doi.org/10.3390/cells9030563>.
- Chung, Hae Young, Matteo Cesari, Stephen Anton, Emanuele Marzetti, Silvia Giovannini, Arnold Young Seo, Christy Carter, Byung Pal Yu, et Christiaan Leeuwenburgh. 2009. « Molecular Inflammation: Underpinnings of Aging and Age-Related Diseases ». *Ageing Research Reviews* 8 (1): 18-30. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2008.07.002>.
- Chung, Jae Heun, Arnold Y. Seo, Sang Woon Chung, Mi Kyung Kim, Christiaan Leeuwenburgh, Byung Pal Yu, et Hae Young Chung. 2008. « Molecular Mechanism of PPAR in the Regulation of Age-Related Inflammation ». *Ageing Research Reviews* 7 (2): 126-36. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2008.01.001>.
- Cives, Mauro, et Jonathan Strosberg. 2017. « Radionuclide Therapy for Neuroendocrine Tumors ». *Current Oncology Reports* 19 (2): 9. <https://doi.org/10.1007/s11912-017-0567-8>.
- Codd, Amy S., Takayuki Kanaseki, Toshihiko Torigo, et Zsuzsanna Tabi. 2018. « Cancer stem cells as targets for immunotherapy ». *Immunology* 153 (3): 304-14. <https://doi.org/10.1111/imm.12866>.
- Comella, K., J. Parceró, H. Bansal, J. Perez, J. Lopez, A. Agrawal, et T. Ichim. 2016. « Effects of the intramyocardial implantation of stromal vascular fraction in patients with chronic ischemic cardiomyopathy ». *Journal of Translational Medicine* 14 (1): 158. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0918-5>.
- Correia, Camila Caldas Martins, Luis Felipe Rodrigues, Bruno Rocha de Avila Pelozin, Edilamar Menezes Oliveira, et Tiago Fernandes. 2021. « Long Non-Coding RNAs in Cardiovascular Diseases: Potential Function as Biomarkers and Therapeutic Targets of Exercise Training ». *Non-Coding RNA* 7 (4): 65. <https://doi.org/10.3390/ncrna7040065>.

- Correia, Magda, Francisco Santos, Rita da Silva Ferreira, Rita Ferreira, Bruno Bernardes de Jesus, et Sandrina Nóbrega-Pereira. 2022. « Metabolic Determinants in Cardiomyocyte Function and Heart Regenerative Strategies ». *Metabolites* 12 (6): 500. <https://doi.org/10.3390/metabo12060500>.
- Crouch, Jack, Maria Shvedova, Rex Jeya Rajkumar Samdavid Thanapaul, Vladimir Botchkarev, et Daniel Roh. 2022. « Epigenetic Regulation of Cellular Senescence ». *Cells* 11 (4): 672. <https://doi.org/10.3390/cells11040672>.
- Cunningham, John T., Joseph T. Rodgers, Daniel H. Arlow, Francisca Vazquez, Vamsi K. Mootha, et Pere Puigserver. 2007. « mTOR Controls Mitochondrial Oxidative Function through a YY1-PGC-1alpha Transcriptional Complex ». *Nature* 450 (7170): 736-40. <https://doi.org/10.1038/nature06322>.
- D, O'Toole, Grossman A, Gross D, Delle Fave G, Barkmanova J, O'Connor J, Pape Uf, et Plöckinger U. 2009. « ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: Biochemical Markers ». *Neuroendocrinology* 90 (2). <https://doi.org/10.1159/000225948>.
- Das, Satya, et Arvind Dasari. 2021. « Epidemiology, Incidence, and Prevalence of Neuroendocrine Neoplasms: Are There Global Differences? » *Current oncology reports* 23 (4): 43. <https://doi.org/10.1007/s11912-021-01029-7>.
- Dasgupta, Biplab, et Jeffrey Milbrandt. 2007. « Resveratrol Stimulates AMP Kinase Activity in Neurons ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (17): 7217-22. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610068104>.
- De Becker, Ann, et Ivan Van Riet. 2016. « Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy? » *World Journal of Stem Cells* 8 (3): 73-87. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v8.i3.73>.
- De Mestier, Louis, Frédérique Savagner, Hedia Brix, Christine Do Cao, Sophie Dominguez-Tinajero, Guillaume Roquin, Bernard Goichot, et al. 2021. « Plasmatic and Urinary 5-Hydroxyindolacetic Acid Measurements in Patients With Midgut Neuroendocrine Tumors: A GTE Study ». *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 106 (4): 1673-82. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa924>.
- Denoyer, Delphine, Pavel Lobachevsky, Price Jackson, Mick Thompson, Olga A. Martin, et Rodney J. Hicks. 2015. « Analysis of 177Lu-DOTA-Octreotate Therapy-Induced DNA Damage in Peripheral Blood Lymphocytes of Patients with Neuroendocrine Tumors ». *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 56 (4): 505-11. <https://doi.org/10.2967/jnumed.114.145581>.
- Denu, Ryan A., et Peiman Hematti. 2016. « Effects of Oxidative Stress on Mesenchymal Stem Cell Biology ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016: 2989076. <https://doi.org/10.1155/2016/2989076>.
- Derrien, Thomas, Rory Johnson, Giovanni Bussotti, Andrea Tanzer, Sarah Djebali, Hagen Tilgner, Gregory Guernec, et al. 2012. « The GENCODE v7 Catalog of Human Long Noncoding RNAs: Analysis of Their Gene Structure, Evolution, and Expression ». *Genome Research* 22 (9): 1775-89. <https://doi.org/10.1101/gr.132159.111>.
- Di, Guo-Hu, Shu Jiang, Fu-Quan Li, Jun-Zhong Sun, Chu-Tse Wu, Xiang Hu, et Hai-Feng Duan. 2012. « Human Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells Mitigate Chemotherapy-Associated Tissue Injury in a Pre-Clinical Mouse Model ». *Cytotherapy* 14 (4): 412-22. <https://doi.org/10.3109/14653249.2011.646044>.
- Di Nicola, Massimo, Carmelo Carlo-Stella, Michele Magni, Marco Milanese, Paolo D. Longoni, Paola Matteucci, Salvatore Grisanti, et Alessandro M. Gianni. 2002. « Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli ». *Blood* 99 (10): 3838-43. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.10.3838>.
- Diederichs, Sven. 2014. « The Four Dimensions of Noncoding RNA Conservation ». *Trends in Genetics: TIG* 30 (4): 121-23. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.01.004>.
- Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, Fc Marini, Ds Krause, Rj Deans, A. Keating, Dj Prockop, et Em Horwitz. 2006. « Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement ». *Cytotherapy* 8 (4): 315-17. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>.
- Dong, Zhao-Ru, Ai-Wu Ke, Tao Li, Jia-Bing Cai, Ya-fei Yang, Wei Zhou, Guo-Ming Shi, et Jia Fan. 2021. « CircMEMO1 modulates the promoter methylation and expression of TCF21 to regulate hepatocellular carcinoma progression and sorafenib treatment sensitivity ». *Molecular Cancer* 20 (1): 75. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01361-3>.
- Dorn, Lisa E., Lior Lasman, Jing Chen, Xianyao Xu, Thomas J. Hund, Mario Medvedovic, Jacob H. Hanna, Jop H. van Berlo, et Federica Accornero. 2019. « The N6-Methyladenosine mRNA

- Methylase METTL3 Controls Cardiac Homeostasis and Hypertrophy ». *Circulation* 139 (4): 533-45. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.036146>.
- Dudkina, Natalya V., Roman Kouřil, Katrin Peters, Hans-Peter Braun, et Egbert J. Boekema. 2010. « Structure and Function of Mitochondrial Supercomplexes ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 16th European Bioenergetics Conference 2010, 1797 (6): 664-70. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.12.013>.
- Eden, Eran, Roy Navon, Israel Steinfeld, Doron Lipson, et Zohar Yakhini. 2009. « GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists ». *BMC Bioinformatics* 10 (1): 48. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-48>.
- Eisenhauer, E. A., P. Therasse, J. Bogaerts, L. H. Schwartz, D. Sargent, R. Ford, J. Dancey, et al. 2009. « New Response Evaluation Criteria in Solid Tumours: Revised RECIST Guideline (Version 1.1) ». *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 45 (2): 228-47. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.10.026>.
- Elia, Leonardo, Paolo Kunderfranco, Pierluigi Carullo, Marco Vacchiano, Floriana Maria Farina, Ignacio Fernando Hall, Stefano Mantero, et al. 2018. « UHRF1 Epigenetically Orchestrates Smooth Muscle Cell Plasticity in Arterial Disease ». *The Journal of Clinical Investigation* 128 (6): 2473-86. <https://doi.org/10.1172/JCI96121>.
- El-Kadiry, Abed El-Hakim, Moutih Rafei, et Riam Shammaa. 2021. « Cell Therapy: Types, Regulation, and Clinical Benefits ». *Frontiers in Medicine* 8 (novembre): 756029. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.756029>.
- Elmore, S. P., T. Qian, S. F. Grissom, et J. J. Lemasters. 2001. « The Mitochondrial Permeability Transition Initiates Autophagy in Rat Hepatocytes ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15 (12): 2286-87. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0206fje>.
- Emde, B., A. Heinen, A. Gödecke, et K. Bottermann. 2014. « Wheat Germ Agglutinin Staining as a Suitable Method for Detection and Quantification of Fibrosis in Cardiac Tissue after Myocardial Infarction ». *European Journal of Histochemistry: EJH* 58 (4): 2448. <https://doi.org/10.4081/ejh.2014.2448>.
- « ENDOCAN - RENATEN ». s. d. *GTE - Groupes d'étude des tumeurs endocrines* (blog). Consulté le 20 novembre 2023. <https://www.reseau-gte.org/renaten/>.
- Ep, Krenning, Kwekkeboom Dj, Bakker Wh, Breeman Wa, Kooij Pp, Oei Hy, van Hagen M, Postema Pt, de Jong M, et Reubi Jc. 1993. « Somatostatin Receptor Scintigraphy with [111In-DTPA-D-Phe1]- and [123I-Tyr3]-Octreotide: The Rotterdam Experience with More than 1000 Patients ». *European Journal of Nuclear Medicine* 20 (8). <https://doi.org/10.1007/BF00181765>.
- Ep, Krenning, Bakker Wh, Breeman Wa, Koper Jw, Kooij Pp, Ausema L, Lameris Js, Reubi Jc, et Lamberts Sw. 1989. « Localisation of Endocrine-Related Tumours with Radioiodinated Analogue of Somatostatin ». *Lancet (London, England)* 1 (8632). [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(89\)91258-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(89)91258-0).
- Eriksson, B., K. Oberg, et M. Stridsberg. 2000. « Tumor Markers in Neuroendocrine Tumors ». *Digestion* 62 Suppl 1: 33-38. <https://doi.org/10.1159/000051853>.
- Eschenhagen, Thomas, Roberto Bolli, Thomas Braun, Loren J. Field, Bernd K. Fleischmann, Jonas Frisén, Mauro Giacca, et al. 2017. « Cardiomyocyte Regeneration ». *Circulation* 136 (7): 680-86. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.029343>.
- Essen, Martijn van, Anders Sundin, Eric P. Krenning, et Dik J. Kwekkeboom. 2014. « Neuroendocrine Tumours: The Role of Imaging for Diagnosis and Therapy ». *Nature Reviews. Endocrinology* 10 (2): 102-14. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.246>.
- Etchegaray, Jean-Pierre, et Raul Mostoslavsky. 2016. « Interplay between Metabolism and Epigenetics: A Nuclear Adaptation to Environmental Changes ». *Molecular Cell* 62 (5): 695-711. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.029>.
- Evans, Ronald M., Grant D. Barish, et Yong-Xu Wang. 2004. « PPARs and the Complex Journey to Obesity ». *Nature Medicine* 10 (4): 355-61. <https://doi.org/10.1038/nm1025>.
- Fadaei, Sara, Fatemeh Zarepour, Mehrnoosh Parvaresh, Alireza Motamedzadeh, Seyed Saeed Tamehri Zadeh, Amirhossein Sheida, Mohammad Shabani, et al. 2022. « Epigenetic regulation in myocardial infarction: Non-coding RNAs and exosomal non-coding RNAs ». *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcvm.2022.1014961>.
- Fang, Rui, Andrew Barbera, Yufei Xu, Michael Rutenberg, Thiago Leonor, Qing Bi, Fei Lan, et al. 2010. « Human LSD2/KDM1b/AOF1 Regulates Gene Transcription by Modulating Intragenic H3K4me2 Methylation ». *Molecular cell* 39 (2): 222-33. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.07.008>.

- Fang, Yuan, Guochao Liao, et Bin Yu. 2019. « LSD1/KDM1A Inhibitors in Clinical Trials: Advances and Prospects ». *Journal of Hematology & Oncology* 12 (1): 129. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0811-9>.
- Feng, Zheng, Yalan Yang, Zhiguo Liu, Weimin Zhao, Lei Huang, Tianwen Wu, et Yulian Mu. 2021. « Integrated analysis of DNA methylome and transcriptome reveals the differences in biological characteristics of porcine mesenchymal stem cells ». *BMC Genomic Data* 22 (1): 56. <https://doi.org/10.1186/s12863-021-01016-8>.
- Fernández, Agustín F., Gustavo F. Bayón, Rocío G. Urduñigo, Estela G. Toraño, María G. García, Antonella Carella, Sandra Petrus-Reurer, et al. 2015. « H3K4me1 Marks DNA Regions Hypomethylated during Aging in Human Stem and Differentiated Cells ». *Genome Research* 25 (1): 27-40. <https://doi.org/10.1101/gr.169011.113>.
- Fernández-Vizarrá, Erika, Valeria Tiranti, et Massimo Zeviani. 2009. « Assembly of the Oxidative Phosphorylation System in Humans: What We Have Learned by Studying Its Defects ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Assembly of the Mitochondrial Respiratory Chain*, 1793 (1): 200-211. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.05.028>.
- Ferreira, Joana R., Graciosa Q. Teixeira, Susana G. Santos, Mário A. Barbosa, Graça Almeida-Porada, et Raquel M. Gonçalves. 2018. « Mesenchymal Stromal Cell Secretome: Influencing Therapeutic Potential by Cellular Pre-Conditioning ». *Frontiers in Immunology* 9: 2837. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02837>.
- Flores, Aimee, John Schell, Abigail S. Krall, David Jelinek, Matilde Miranda, Melina Grigorian, Daniel Braas, et al. 2017. « Lactate Dehydrogenase Activity Drives Hair Follicle Stem Cell Activation ». *Nature Cell Biology* 19 (9): 1017-26. <https://doi.org/10.1038/ncb3575>.
- Foretz, Marc, Nellie Taleux, Bruno Guigas, Sandrine Horman, Christophe Beauloye, Fabrizio Andreelli, Luc Bertrand, et Benoît Viollet. 2006. « Régulation du métabolisme énergétique par l'AMPK - Une nouvelle voie thérapeutique pour le traitement des maladies métaboliques et cardiaques ». *médecine/sciences* 22 (4): 381-88. <https://doi.org/10.1051/medsci/2006224381>.
- Freyssenet, Damien, Isabella Irrcher, Michael K. Connor, Martino Di Carlo, et David A. Hood. 2004. « Calcium-regulated changes in mitochondrial phenotype in skeletal muscle cells ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 286 (5): C1053-61. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00418.2003>.
- Gambini, Elisa, Ilenia Martinelli, Ilaria Stadiotti, Maria Cristina Vinci, Alessandro Scopece, Luana Eramo, Elena Sommariva, et al. 2020. « Differences in Mitochondrial Membrane Potential Identify Distinct Populations of Human Cardiac Mesenchymal Progenitor Cells ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (20): 7467. <https://doi.org/10.3390/ijms21207467>.
- Gambini, Elisa, Giulio Pompilio, Andrea Biondi, Francesco Alamanni, Maurizio C. Capogrossi, Marco Agrifoglio, et Maurizio Pesce. 2011. « C-Kit+ Cardiac Progenitors Exhibit Mesenchymal Markers and Preferential Cardiovascular Commitment ». *Cardiovascular Research* 89 (2): 362-73. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq292>.
- Geisler, Lukas, Raphael Mohr, Joeri Lambrecht, Jana Knorr, Henning Jann, Sven H. Loosen, Burcin Özdirik, et al. 2021. « The Role of miRNA in the Pathophysiology of Neuroendocrine Tumors ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (16): 8569. <https://doi.org/10.3390/ijms22168569>.
- Geisler, Sarah, et Jeff Coller. 2013. « RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts ». *Nature reviews. Molecular cell biology* 14 (11): 699-712. <https://doi.org/10.1038/nrm3679>.
- Gerhart-Hines, Zachary, Joseph T. Rodgers, Olivia Bare, Carles Lerin, Seung-Hee Kim, Raul Mostoslavsky, Frederick W. Alt, Zhidan Wu, et Pere Puigserver. 2007. « Metabolic Control of Muscle Mitochondrial Function and Fatty Acid Oxidation through SIRT1/PGC-1alpha ». *The EMBO Journal* 26 (7): 1913-23. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601633>.
- Gharibi, Borzo, et Francis J. Hughes. 2012. « Effects of Medium Supplements on Proliferation, Differentiation Potential, and in Vitro Expansion of Mesenchymal Stem Cells ». *Stem Cells Translational Medicine* 1 (11): 771-82. <https://doi.org/10.5966/sctm.2010-0031>.
- Giguère, Vincent. 2008. « Transcriptional Control of Energy Homeostasis by the Estrogen-Related Receptors ». *Endocrine Reviews* 29 (6): 677-96. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0017>.
- Gleyzer, Natalie, et Richard C. Scarpulla. 2013. « Activation of a PGC-1-Related Coactivator (PRC)-Dependent Inflammatory Stress Program Linked to Apoptosis and Premature Senescence ». *The Journal of Biological Chemistry* 288 (12): 8004-15. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.426841>.
- Gleyzer, Natalie, Kristel Vercauteren, et Richard C. Scarpulla. 2005. « Control of Mitochondrial Transcription Specificity Factors (TFB1M and TFB2M) by Nuclear Respiratory Factors (NRF-1

- and NRF-2) and PGC-1 Family Coactivators ». *Molecular and Cellular Biology* 25 (4): 1354-66. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.4.1354-1366.2005>.
- Golchin, Ali, et Tahereh Zarnoosheh Farahany. 2019. « Biological Products: Cellular Therapy and FDA Approved Products ». *Stem Cell Reviews and Reports* 15 (2): 166-75. <https://doi.org/10.1007/s12015-018-9866-1>.
- Gong, Fade, et Kyle M. Miller. 2019. « Histone methylation and the DNA damage response ». *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, Epigenetic mechanisms in DNA repair and cancer, 780 (avril): 37-47. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.09.003>.
- Gredilla, Ricardo. 2010. « DNA Damage and Base Excision Repair in Mitochondria and Their Role in Aging ». *Journal of Aging Research* 2011 (décembre): 257093. <https://doi.org/10.4061/2011/257093>.
- Guénantin, Anne-Claire, Imen Jebeniani, Julia Leschik, Erwan Watrin, Gisèle Bonne, Nicolas Vignier, et Michel Pucéat. 2021. « Targeting the Histone Demethylase LSD1 Prevents Cardiomyopathy in a Mouse Model of Laminopathy ». *The Journal of Clinical Investigation* 131 (1): e136488, 136488. <https://doi.org/10.1172/JCI136488>.
- Guha, Manti, et Narayan G. Avadhani. 2013. « Mitochondrial Retrograde Signaling at the crossroads of tumor bioenergetics, genetics and epigenetics ». *Mitochondrion* 13 (6): 10.1016/j.mito.2013.08.007. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2013.08.007>.
- Guijarro, D., M. Lebrin, O. Lairez, P. Bourin, N. Piriou, J. Pozzo, G. Lande, et al. 2016. « Intramyocardial Transplantation of Mesenchymal Stromal Cells for Chronic Myocardial Ischemia and Impaired Left Ventricular Function: Results of the MESAMI 1 Pilot Trial ». *International Journal of Cardiology* 209 (avril): 258-65. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.02.016>.
- Guillemin, R, et J E Gerich. 1976. « Somatostatin: Physiological and Clinical Significance ». *Annual Review of Medicine* 27 (1): 379-88. <https://doi.org/10.1146/annurev.me.27.020176.002115>.
- Guo, Yajun, Yunsheng Yu, Shijun Hu, Yueqiu Chen, et Zhenya Shen. 2020. « The Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells for Cardiovascular Diseases ». *Cell Death & Disease* 11 (5): 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2542-9>.
- Gurusamy, Narasimman, Abdulrhman Alsayari, Sheeja Rajasingh, et Johnson Rajasingh. 2018. « Adult Stem Cells for Regenerative Therapy ». *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 160: 1-22. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2018.07.009>.
- Haigis, Marcia C., et David A. Sinclair. 2010. « Mammalian Sirtuins: Biological Insights and Disease Relevance ». *Annual review of pathology* 5: 253-95. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092250>.
- Halberg, Nils, Tayeba Khan, Maria E. Trujillo, Ingrid Wernstedt-Asterholm, Alan D. Attie, Shariq Sherwani, Zhao V. Wang, et al. 2009. « Hypoxia-Inducible Factor 1 α Induces Fibrosis and Insulin Resistance in White Adipose Tissue ». *Molecular and Cellular Biology* 29 (16): 4467-83. <https://doi.org/10.1128/MCB.00192-09>.
- Halimi, Mohammad, Hadi Parsian, S. Mohsen Asghari, Reyhaneh Sariri, Dariush Moslemi, et Farshid Yeganeh. 2013. « MicroRNAs: Are they indicators for prediction of response to radiotherapy in breast cancer? ». *Journal of Medical Hypotheses and Ideas* 7 (2): 59-64. <https://doi.org/10.1016/j.jmhi.2013.03.003>.
- Hallet, Julie, Calvin How Lim Law, Moises Cukier, Refik Saskin, Ning Liu, et Simron Singh. 2015. « Exploring the Rising Incidence of Neuroendocrine Tumors: A Population-Based Analysis of Epidemiology, Metastatic Presentation, and Outcomes ». *Cancer* 121 (4): 589-97. <https://doi.org/10.1002/cncr.29099>.
- Han, Ji Woong, et Young-sup Yoon. 2012. « Epigenetic Landscape of Pluripotent Stem Cells ». *Antioxidants & Redox Signaling* 17 (2): 205-23. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4375>.
- Hansson, Jenny, Mahmoud Reza Rafiee, Sonja Reiland, Jose M. Polo, Julian Gehring, Satoshi Okawa, Wolfgang Huber, Konrad Hochedlinger, et Jeroen Krijgsveld. 2012. « Highly Coordinated Proteome Dynamics during Reprogramming of Somatic Cells to Pluripotency ». *Cell Reports* 2 (6): 1579-92. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.10.014>.
- Hao, Huai-Xiang, Oleh Khalimonchuk, Margit Schraders, Noah Dephore, Jean-Pierre Bayley, Henricus Kunst, Peter Devilee, et al. 2009. « SDH5, a Gene Required for Flavination of Succinate Dehydrogenase, Is Mutated in Paraganglioma ». *Science (New York, N.Y.)* 325 (5944): 1139-42. <https://doi.org/10.1126/science.1175689>.
- Hare, Joshua M., Joel E. Fishman, Gary Gerstenblith, Darcy L. DiFede Velazquez, Juan P. Zambrano, Viky Y. Suncion, Melissa Tracy, et al. 2012. « Comparison of Allogeneic vs Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Delivered by Transendocardial Injection in Patients with Ischemic Cardiomyopathy: The POSEIDON Randomized Trial ». *JAMA* 308 (22): 2369-79. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.25321>.

- Harman, D. 1972. « The Biologic Clock: The Mitochondria? » *Journal of the American Geriatrics Society* 20 (4): 145-47. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.1972.tb00787.x>.
- Harris, A. G. 1994. « Somatostatin and Somatostatin Analogues: Pharmacokinetics and Pharmacodynamic Effects. » *Gut* 35 (3 Suppl): S1-4. https://doi.org/10.1136/gut.35.3_Suppl.S1.
- Hashemzadeh, Mohammad Reza, Mohammad Ehsan Taghavizadeh Yazdi, Mohammad Sadegh Amiri, et Seyed Hadi Mousavi. 2021. « Stem Cell Therapy in the Heart: Biomaterials as a Key Route ». *Tissue & Cell* 71 (août): 101504. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2021.101504>.
- Hausenloy, Derek J., et Derek M. Yellon. 2013. « Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target ». *The Journal of Clinical Investigation* 123 (1): 92-100. <https://doi.org/10.1172/JCI62874>.
- Havasi, Andrei, Daniel Sur, Simona Sorana Cainap, Cristian-Virgil Lungulescu, Laura-Ioana Gavrilas, Calin Cainap, Catalin Vlad, et Ovidiu Balacescu. 2022. « Current and New Challenges in the Management of Pancreatic Neuroendocrine Tumors: The Role of miRNA-Based Approaches as New Reliable Biomarkers ». *International Journal of Molecular Sciences* 23 (3): 1109. <https://doi.org/10.3390/ijms23031109>.
- Hawkins, Kate E., Shona Joy, Juliette M. K. M. Delhove, Vassilios N. Kotiadis, Emilio Fernandez, Lorna M. Fitzpatrick, James R. Whiteford, et al. 2016. « NRF2 Orchestrates the Metabolic Shift during Induced Pluripotent Stem Cell Reprogramming ». *Cell Reports* 14 (8): 1883-91. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.02.003>.
- He, Jianfeng, Danyong Liu, Lixia Zhao, Dongcheng Zhou, Jianhui Rong, Liangqing Zhang, et Zhengyuan Xia. 2022. « Myocardial ischemia/reperfusion injury: Mechanisms of injury and implications for management (Review) ». *Experimental and Therapeutic Medicine* 23 (6): 430. <https://doi.org/10.3892/etm.2022.11357>.
- Heldman, Alan W., Darcy L. DiFede, Joel E. Fishman, Juan P. Zambrano, Barry H. Trachtenberg, Vasileios Karantalis, Muzammil Mushtaq, et al. 2014. « Transendocardial Mesenchymal Stem Cells and Mononuclear Bone Marrow Cells for Ischemic Cardiomyopathy: The TAC-HFT Randomized Trial ». *JAMA* 311 (1): 62-73. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.282909>.
- Henri, Orianne, Chris Pouehe, Mahmoud Houssari, Ludovic Galas, Lionel Nicol, Florence Edwards-Lévy, Jean-Paul Henry, et al. 2016. « Selective Stimulation of Cardiac Lymphangiogenesis Reduces Myocardial Edema and Fibrosis Leading to Improved Cardiac Function Following Myocardial Infarction ». *Circulation* 133 (15): 1484-97; discussion 1497. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020143>.
- Herzig, S., F. Long, U. S. Jhala, S. Hedrick, R. Quinn, A. Bauer, D. Rudolph, et al. 2001. « CREB Regulates Hepatic Gluconeogenesis through the Coactivator PGC-1 ». *Nature* 413 (6852): 179-83. <https://doi.org/10.1038/35093131>.
- Hiona, Asimina, et Christiaan Leeuwenburgh. 2008. « The Role of Mitochondrial DNA Mutations in Aging and Sarcopenia: Implications for the Mitochondrial Vicious Cycle Theory of Aging ». *Experimental Gerontology* 43 (1): 24-33. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2007.10.001>.
- Ho, Ping-Chih, Pawan Gupta, Yao-Chen Tsui, Sung Gil Ha, MD Mostaqul Huq, et Li-Na Wei. 2008. « Modulation of lysine acetylation-stimulated repressive activity by Erk2-mediated phosphorylation of RIP140 in adipocyte differentiation ». *Cellular signalling* 20 (10): 1911-19. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.07.001>.
- Hobuß, Lisa, Christian Bär, et Thomas Thum. 2019. « Long Non-coding RNAs: At the Heart of Cardiac Dysfunction? » *Frontiers in Physiology* 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2019.00030>.
- Hock, M. Benjamin, et Anastasia Kralli. 2009. « Transcriptional Control of Mitochondrial Biogenesis and Function ». *Annual Review of Physiology* 71 (1): 177-203. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.010908.163119>.
- Hofland, Leo J., et Steven W. J. Lamberts. 2003. « The Pathophysiological Consequences of Somatostatin Receptor Internalization and Resistance ». *Endocrine Reviews* 24 (1): 28-47. <https://doi.org/10.1210/er.2000-0001>.
- Hood, David A. 2001. « Invited Review: Contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle ». *Journal of Applied Physiology* 90 (3): 1137-57. <https://doi.org/10.1152/jappl.2001.90.3.1137>.
- Hoyer, D., G. I. Bell, M. Berelowitz, J. Epelbaum, W. Feniuk, P. P. A. Humphrey, A-M. O'Carroll, et al. 1995. « Classification and nomenclature of somatostatin receptors ». *Trends in Pharmacological Sciences* 16 (3): 86-88. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)88988-9](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)88988-9).

- Hu, Chenxia, et Lanjuan Li. 2018. « Preconditioning Influences Mesenchymal Stem Cell Properties in Vitro and in Vivo ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 22 (3): 1428-42. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13492>.
- . 2019a. « The application of resveratrol to mesenchymal stromal cell-based regenerative medicine ». *Stem Cell Research & Therapy* 10 (1): 307. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1412-9>.
- . 2019b. « Melatonin Plays Critical Role in Mesenchymal Stem Cell-Based Regenerative Medicine in Vitro and in Vivo ». *Stem Cell Research & Therapy* 10 (1): 13. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-1114-8>.
- Huang, Biao, Gang Li, et Xiao Hua Jiang. 2015. « Fate determination in mesenchymal stem cells: a perspective from histone-modifying enzymes ». *Stem Cell Research & Therapy* 6 (1): 35. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0018-0>.
- Huang, Liu, Bingyan Guo, Jie Yan, Huiqing Wei, Suyun Liu, et Yongjun Li. 2023. « CircHSPG2 knockdown attenuates hypoxia-induced apoptosis, inflammation, and oxidative stress in human AC16 cardiomyocytes by regulating the miR-1184/MAP3K2 axis ». *Cell Stress & Chaperones* 28 (2): 177-90. <https://doi.org/10.1007/s12192-023-01328-x>.
- Huang, Wanxu, Hua Li, Qingsong Yu, Wei Xiao, et Dan Ohtan Wang. 2022. « LncRNA-mediated DNA methylation: an emerging mechanism in cancer and beyond ». *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 41 (1): 100. <https://doi.org/10.1186/s13046-022-02319-z>.
- Huo, Jin-Ling, Lemin Jiao, Qi An, Xiuying Chen, Yuruo Qi, Bingfei Wei, Yichao Zheng, et al. 2021. « Myofibroblast Deficiency of LSD1 Alleviates TAC-Induced Heart Failure ». *Circulation Research* 129 (3): 400-413. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.318149>.
- Huss, Janice M., Inés Pineda Torra, Bart Staels, Vincent Giguère, et Daniel P. Kelly. 2004. « Estrogen-Related Receptor α Directs Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Signaling in the Transcriptional Control of Energy Metabolism in Cardiac and Skeletal Muscle ». *Molecular and Cellular Biology* 24 (20): 9079-91. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.20.9079-9091.2004>.
- I, Virgolini, Ambrosini V, Bomanji Jb, Baum Rp, Fanti S, Gabriel M, Papathanasiou Nd, et al. 2010. « Procedure Guidelines for PET/CT Tumour Imaging with 68Ga-DOTA-Conjugated Peptides: 68Ga-DOTA-TOC, 68Ga-DOTA-NOC, 68Ga-DOTA-TATE ». *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 37 (10). <https://doi.org/10.1007/s00259-010-1512-3>.
- Im, Gun-Il, et Kyung-Ju Shin. 2015. « Epigenetic approaches to regeneration of bone and cartilage from stem cells ». *Expert Opinion on Biological Therapy* 15 (2): 181-93. <https://doi.org/10.1517/14712598.2015.960838>.
- « Imagerie TEP aux analogues de la somatostatine marqués au 68 Ga dans les Tumeurs endocrines digestives bien différenciées - PDF Free Download ». s. d. Consulté le 21 novembre 2023. <https://docplayer.fr/amp/23337128-Imagerie-tep-aux-analogues-de-la-somatostatine-marques-au-68-ga-dans-les-tumeurs-endocrines-digestives-bien-differentiees.html>.
- Imai, Shin-ichiro, et Leonard Guarente. 2014. « NAD⁺ and Sirtuins in Aging and Disease ». *Trends in Cell Biology* 24 (8): 464-71. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.04.002>.
- Ishikawa, Kiyotake, Kenneth M. Fish, Lisa Tilemann, Kleopatra Rapti, Jaume Aguero, Carlos G. Santos-Gallego, Ahyoung Lee, et al. 2014. « Cardiac I-1c Overexpression with Reengineered AAV Improves Cardiac Function in Swine Ischemic Heart Failure ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 22 (12): 2038-45. <https://doi.org/10.1038/mt.2014.127>.
- Ito, Keisuke, et Toshio Suda. 2014. « Metabolic Requirements for the Maintenance of Self-Renewing Stem Cells ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15 (4): 243-56. <https://doi.org/10.1038/nrm3772>.
- Ito, Kyoko, et Keisuke Ito. 2016. « Metabolism and the Control of Cell Fate Decisions and Stem Cell Renewal ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 32 (octobre): 399-409. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-111315-125134>.
- J, Capdevila, Meeker A, García-Carbonero R, Pietras K, Astudillo A, Casanovas O, et Scarpa A. 2014. « Molecular Biology of Neuroendocrine Tumors: From Pathways to Biomarkers and Targets ». *Cancer Metastasis Reviews* 33 (1). <https://doi.org/10.1007/s10555-013-9468-y>.
- J, Shou, Dotson C, Qian Hr, Tao W, Lin C, Lawrence F, N'Cho M, et al. 2005. « Optimized Blood Cell Profiling Method for Genomic Biomarker Discovery Using High-Density Microarray ». *Biomarkers: Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals* 10 (4). <https://doi.org/10.1080/13547500500218583>.
- Jackman, Christopher P., Ilya Y. Shadrin, Aaron L. Carlson, et Nenad Bursac. 2015. « Human Cardiac Tissue Engineering: From Pluripotent Stem Cells to Heart Repair ». *Current opinion in chemical engineering* 7 (février): 57-64. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2014.11.004>.

- Jacques, Caroline, Delphine Guillotin, Jean-Fred Fontaine, Brigitte Franc, Delphine Mirebeau-Prunier, Audrey Fleury, Yves Malthiery, et Frédérique Savagner. 2013. « DNA Microarray and miRNA Analyses Reinforce the Classification of Follicular Thyroid Tumors ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 98 (5): E981-989. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-4006>.
- Jäger, Sibylle, Christoph Handschin, Julie St-Pierre, et Bruce M. Spiegelman. 2007. « AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Action in Skeletal Muscle via Direct Phosphorylation of PGC-1alpha ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (29): 12017-22. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705070104>.
- Je, Ardill, et Eriksson B. 2003. « The Importance of the Measurement of Circulating Markers in Patients with Neuroendocrine Tumours of the Pancreas and Gut ». *Endocrine-Related Cancer* 10 (4). <https://doi.org/10.1677/erc.0.0100459>.
- Jiang, Haibo, Ruixiang Ge, Siwen Chen, Laiquan Huang, Jie Mao, et Lili Sheng. s. d. « miRNA-204-5p acts as tumor suppressor to influence the invasion and migration of astrocytoma by targeting ezrin and is downregulated by DNA methylation ». *Bioengineered* 12 (2): 9301-12. Consulté le 9 novembre 2023. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.2000244>.
- Jiang, Shujia, Husnain Kh Haider, Rafeeq P. H. Ahmed, Niagara M. Idris, Asmat Salim, et Muhammad Ashraf. 2008. « Transcriptional Profiling of Young and Old Mesenchymal Stem Cells in Response to Oxygen Deprivation and Reparability of the Infarcted Myocardium ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 44 (3): 582-96. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2007.11.014>.
- Jimenez-Puerta, Gonzalo José, Juan Antonio Marchal, Elena López-Ruiz, et Patricia Gálvez-Martín. 2020. « Role of Mesenchymal Stromal Cells as Therapeutic Agents: Potential Mechanisms of Action and Implications in Their Clinical Use ». *Journal of Clinical Medicine* 9 (2): 445. <https://doi.org/10.3390/jcm9020445>.
- Jin, Yue, Bo Huo, Xueqi Fu, Zhongyi Cheng, Jun Zhu, Yu Zhang, Tian Hao, et Xin Hu. 2017. « LSD1 Knockdown Reveals Novel Histone Lysine Methylation in Human Breast Cancer MCF-7 Cells ». *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 92 (août): 896-904. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.106>.
- Jing, Huan, Xiaoxia Su, Bo Gao, Yi Shuai, Ji Chen, Zhihong Deng, Li Liao, et Yan Jin. 2018. « Epigenetic Inhibition of Wnt Pathway Suppresses Osteogenic Differentiation of BMSCs during Osteoporosis ». *Cell Death & Disease* 9 (2): 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0231-0>.
- Jm, Feldman, et O'Dorisio Tm. 1986. « Role of Neuropeptides and Serotonin in the Diagnosis of Carcinoid Tumors ». *The American Journal of Medicine* 81 (6B). [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(86\)90583-8](https://doi.org/10.1016/0002-9343(86)90583-8).
- Johansson, Catrine, Srikanthasan Velupillai, Anthony Tumber, Aleksandra Szykowska, Edward S. Hookway, Radoslaw P. Nowak, Claire Strain-Damerell, et al. 2016. « Structural Analysis of Human KDM5B Guides Histone Demethylase Inhibitor Development ». *Nature Chemical Biology* 12 (7): 539-45. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2087>.
- Jones, Nicholas R., Andrea K. Roalfe, Ibiye Adoki, F. D. Richard Hobbs, et Clare J. Taylor. 2019. « Survival of Patients with Chronic Heart Failure in the Community: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *European Journal of Heart Failure* 21 (11): 1306-25. <https://doi.org/10.1002/ejhf.1594>.
- Jornayvaz, François R., et Gerald I. Shulman. 2010. « Regulation of mitochondrial biogenesis ». *Essays in biochemistry* 47: 10.1042/bse0470069. <https://doi.org/10.1042/bse0470069>.
- Junqueira, L. C., G. Bignolas, et R. R. Brentani. 1979. « Picrosirius Staining plus Polarization Microscopy, a Specific Method for Collagen Detection in Tissue Sections ». *The Histochemical Journal* 11 (4): 447-55. <https://doi.org/10.1007/BF01002772>.
- K, Oberg, Modlin Im, De Herder W, Pavel M, Klimstra D, Frilling A, Metz Dc, et al. 2015. « Consensus on Biomarkers for Neuroendocrine Tumour Disease ». *The Lancet. Oncology* 16 (9). [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00186-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00186-2).
- Kaelin, William G., et Steven L. McKnight. 2013. « Influence of Metabolism on Epigenetics and Disease ». *Cell* 153 (1): 56-69. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.004>.
- Kahrizi, Mohammad Saeed, Elnaz Mousavi, Armin Khosravi, Sara Rahnema, Ali Salehi, Navid Nasrabadi, Farnoosh Ebrahimzadeh, et Samira Jamali. 2023. « Recent advances in pre-conditioned mesenchymal stem/stromal cell (MSCs) therapy in organ failure; a comprehensive review of preclinical studies ». *Stem Cell Research & Therapy* 14 (1): 155. <https://doi.org/10.1186/s13287-023-03374-9>.
- Kallen, Joerg, Jean-Marc Schlaeppi, Francis Bitsch, Ireos Filipuzzi, Alain Schilb, Virginie Riou, Alexander Graham, Andre Strauss, Martin Geiser, et Brigitte Fournier. 2004. « Evidence for Ligand-Independent Transcriptional Activation of the Human Estrogen-Related Receptor α (ERR α): CRYSTAL STRUCTURE OF ERR α LIGAND BINDING DOMAIN IN COMPLEX WITH

- PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR COACTIVATOR-1 α * ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (47): 49330-37. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407999200>.
- Kalou, Yazan, Abdullah Murhaf Al-Khani, et Khawaja Husnain Haider. 2023. « Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells for Heart Failure Treatment: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Heart, Lung & Circulation* 32 (7): 870-80. <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2023.01.012>.
- Kao, Chen-Yuan, et Eleftherios T. Papoutsakis. 2019. « Extracellular Vesicles: Exosomes, Microparticles, Their Parts, and Their Targets to Enable Their Biomanufacturing and Clinical Applications ». *Current Opinion in Biotechnology* 60 (décembre): 89-98. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.01.005>.
- Karahalil, B., V. A. Bohr, et D. M. Wilson. 2012. « Impact of DNA Polymorphisms in Key DNA Base Excision Repair Proteins on Cancer Risk ». *Human & Experimental Toxicology* 31 (10): 981-1005. <https://doi.org/10.1177/0960327112444476>.
- Karantalís, Vasileios, et Joshua M. Hare. 2015. « Use of Mesenchymal Stem Cells for Therapy of Cardiac Disease ». *Circulation research* 116 (8): 1413-30. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303614>.
- Karbowskí, Mariusz, Seon-Yong Jeong, et Richard J. Youle. 2004. « Endophilin B1 Is Required for the Maintenance of Mitochondrial Morphology ». *The Journal of Cell Biology* 166 (7): 1027-39. <https://doi.org/10.1083/jcb.200407046>.
- Karpathakis, Anna, Harpreet Dibra, Chistodoulos Pipinikas, Andrew Feber, Tiffany Morris, Joshua Francis, Dahmane Oukrif, et al. 2016. « Prognostic Impact of Novel Molecular Subtypes of Small Intestinal Neuroendocrine Tumor ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 22 (1): 250-58. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0373>.
- Keller, Kaitlyn M., et Susan E. Howlett. 2016. « Sex Differences in the Biology and Pathology of the Aging Heart ». *Canadian Journal of Cardiology* 32 (9): 1065-73. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2016.03.017>.
- Kelsey, Gavin, Oliver Stegle, et Wolf Reik. 2017. « Single-Cell Epigenomics: Recording the Past and Predicting the Future ». *Science (New York, N.Y.)* 358 (6359): 69-75. <https://doi.org/10.1126/science.aan6826>.
- Khacho, Mireille, Alysén Clark, Devon S. Svoboda, Joelle Azzi, Jason G. MacLaurin, Cynthia Meghaizel, Hiromi Sesaki, et al. 2016. « Mitochondrial Dynamics Impacts Stem Cell Identity and Fate Decisions by Regulating a Nuclear Transcriptional Program ». *Cell Stem Cell* 19 (2): 232-47. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.04.015>.
- Khacho, Mireille, et Ruth S Slack. 2017. « Mitochondrial Activity in the Regulation of Stem Cell Self-Renewal and Differentiation ». *Current Opinion in Cell Biology, Cell Differentiation and Development*, 49 (décembre): 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.11.003>.
- Khubutiya, Mogeli S., Aleksandr V. Vagabov, Andrey A. Temnov, et Alla N. Sklifas. 2014. « Paracrine Mechanisms of Proliferative, Anti-Apoptotic and Anti-Inflammatory Effects of Mesenchymal Stromal Cells in Models of Acute Organ Injury ». *Cytotherapy* 16 (5): 579-85. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.07.017>.
- Kim, Daehwan, Geo Perlea, Cole Trapnell, Harold Pimentel, Ryan Kelley, et Steven L. Salzberg. 2013. « TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions ». *Genome Biology* 14 (4): R36. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-4-r36>.
- Kim, Insil, Sara Rodríguez-Enriquez, et John J. Lemasters. 2007. « Minireview: Selective Degradation of Mitochondria by Mitophagy ». *Archives of biochemistry and biophysics* 462 (2): 245-53. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.03.034>.
- Kim, Jung-whan, Irina Tchernyshyov, Gregg L. Semenza, et Chi V. Dang. 2006. « HIF-1-Mediated Expression of Pyruvate Dehydrogenase Kinase: A Metabolic Switch Required for Cellular Adaptation to Hypoxia ». *Cell Metabolism* 3 (3): 177-85. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.02.002>.
- Kinnaird, T., E. Stabile, M.s. Burnett, M. Shou, C.w. Lee, S. Barr, S. Fuchs, et S.e. Epstein. 2004. « Local Delivery of Marrow-Derived Stromal Cells Augments Collateral Perfusion Through Paracrine Mechanisms ». *Circulation* 109 (12): 1543-49. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000124062.31102.57>.
- Klöppel, Günter. 2017. « Neuroendocrine Neoplasms: Dichotomy, Origin and Classifications ». *Visceral Medicine* 33 (5): 324-30. <https://doi.org/10.1159/000481390>.
- Klöppel, Günter, Aurel Perren, et Philipp U. Heitz. 2004. « The Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Cell System and Its Tumors: The WHO Classification ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1014 (avril): 13-27. <https://doi.org/10.1196/annals.1294.002>.

- Kocabas, Fatih, Ahmed I. Mahmoud, Drazen Sobic, Enzo R. Porrello, Rui Chen, Joseph A. Garcia, Ralph J. DeBerardinis, et Hesham A. Sadek. 2012. « The Hypoxic Epicardial and Subepicardial Microenvironment ». *Journal of Cardiovascular Translational Research* 5 (5): 654-65. <https://doi.org/10.1007/s12265-012-9366-7>.
- Kolasińska-Ćwikła, Agnieszka, Anna Łowczak, Katarzyna Maciejkiwicz Maciejkiwicz, et Jarosław Bogdan Ćwikła. 2018. « Peptide Receptor Radionuclide Therapy for Advanced Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors - from Oncology Perspective ». *Nuclear Medicine Review. Central & Eastern Europe* 21 (2). <https://doi.org/10.5603/NMR.2018.0019>.
- Korski, Kelli I., Dieter A. Kubli, Bingyan J. Wang, Farid G. Khalafalla, Megan M. Monsanto, Fareheh Firouzi, Oscar H. Echeagaray, et al. 2019. « Hypoxia Prevents Mitochondrial Dysfunction and Senescence in Human c-Kit+ Cardiac Progenitor Cells ». *Stem cells (Dayton, Ohio)* 37 (4): 555-67. <https://doi.org/10.1002/stem.2970>.
- Koutsopoulos, Olga S., David Laine, Laura Osellame, Dmitriy M. Chudakov, Robert G. Parton, Ann E. Frazier, et Michael T. Ryan. 2010. « Human Mitochondria Associate with Microtubules and Induce Microtubule-Dependent Remodeling of Mitochondrial Networks ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1803 (5): 564-74. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.03.006>.
- Kraft, C. S., C. M. R. LeMoine, C. N. Lyons, D. Michaud, C. R. Mueller, et C. D. Moyes. 2006. « Control of mitochondrial biogenesis during myogenesis ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 290 (4): C1119-27. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00463.2005>.
- Kressler, Dieter, Sylvia N. Schreiber, Darko Knutti, et Anastasia Kralli. 2002. « The PGC-1-Related Protein PERC Is a Selective Coactivator of Estrogen Receptor A* ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (16): 13918-25. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201134200>.
- Kristensen, Lasse S., Maria S. Andersen, Lotte V. W. Stagsted, Karoline K. Ebbesen, Thomas B. Hansen, et Jørgen Kjems. 2019. « The Biogenesis, Biology and Characterization of Circular RNAs ». *Nature Reviews Genetics* 20 (11): 675-91. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0158-7>.
- Ku, Manching, Richard P. Koche, Esther Rheinbay, Eric M. Mendenhall, Mitsuhiro Endoh, Tarjei S. Mikkelsen, Aviva Presser, et al. 2008. « Genomewide Analysis of PRC1 and PRC2 Occupancy Identifies Two Classes of Bivalent Domains ». *PLoS Genetics* 4 (10): e1000242. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000242>.
- Kubli, Dieter A., et Mark A. Sussman. 2017. « Eat, Breathe, ROS: Controlling Stem Cell Fate through Metabolism ». *Expert Review of Cardiovascular Therapy* 15 (5): 345-56. <https://doi.org/10.1080/14779072.2017.1319278>.
- Kujoth, Gregory C., Christiaan Leeuwenburgh, et Tomas A. Prolla. 2006. « Mitochondrial DNA Mutations and Apoptosis in Mammalian Aging ». *Cancer Research* 66 (15): 7386-89. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4670>.
- Kulandavelu, Shathiyah, Vasileios Karantalis, Julia Fritsch, Konstantinos E. Hatzistergos, Viky Y. Loescher, Frederic McCall, Bo Wang, et al. 2016. « Pim1 Kinase Overexpression Enhances Ckit+ Cardiac Stem Cell Cardiac Repair Following Myocardial Infarction in Swine ». *Journal of the American College of Cardiology* 68 (22): 2454-64. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.09.925>.
- Kumar, Ashish, Soma Ghosh, et Sudhir Chandna. 2015. « Evidence for microRNA-31 Dependent Bim-Bax Interaction Preceding Mitochondrial Bax Translocation during Radiation-Induced Apoptosis ». *Scientific Reports* 5 (octobre): 15923. <https://doi.org/10.1038/srep15923>.
- Kwekkeboom, Dik J., Wouter W. de Herder, Boen L. Kam, Casper H. van Eijck, Martijn van Essen, Peter P. Kooij, Richard A. Feelders, Maarten O. van Aken, et Eric P. Krenning. 2008. « Treatment With the Radiolabeled Somatostatin Analog [177Lu-DOTA0,Tyr3]Octreotate: Toxicity, Efficacy, and Survival ». *Journal of Clinical Oncology* 26 (13): 2124-30. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.2553>.
- Lagouge, Marie, Carmen Argmann, Zachary Gerhart-Hines, Hamid Meziane, Carles Lerin, Frederic Daussin, Nadia Messadeq, et al. 2006. « Resveratrol Improves Mitochondrial Function and Protects against Metabolic Disease by Activating SIRT1 and PGC-1alpha ». *Cell* 127 (6): 1109-22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.013>.
- Lamberts, S. W., E. P. Krenning, et J. C. Reubi. 1991. « The Role of Somatostatin and Its Analogs in the Diagnosis and Treatment of Tumors ». *Endocrine Reviews* 12 (4): 450-82. <https://doi.org/10.1210/edrv-12-4-450>.
- Lathia, Justin, Huiping Liu, et Daniela Matei. 2020. « The Clinical Impact of Cancer Stem Cells ». *The Oncologist* 25 (2): 123-31. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2019-0517>.
- Lawrence, Ben, Bjorn I. Gustafsson, Anthony Chan, Bernhard Svejda, Mark Kidd, et Irvin M. Modlin. 2011. « The Epidemiology of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors ».

- Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, Gastroenteropancreatic System and Its Tumors: Part 2*, 40 (1): 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2010.12.005>.
- Leduc-Gaudet, Jean-Philippe, Céline Guirguis, et Marie-Claude Sincennes. 2023. « Des liens entre métabolisme et régulation épigénétique des cellules souches musculaires ». *médecine/sciences* 39 (6-7): 530-36. <https://doi.org/10.1051/medsci/2023084>.
- Lee, Tae-Hee, et Tae-Hong Kang. 2019. « DNA Oxidation and Excision Repair Pathways ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (23): 6092. <https://doi.org/10.3390/ijms20236092>.
- Lehman, John J., Philip M. Barger, Attila Kovacs, Jeffrey E. Saffitz, Denis M. Medeiros, et Daniel P. Kelly. 2000. « Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis ». *Journal of Clinical Investigation* 106 (7): 847-56. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC517815/>.
- Leja, Justyna, Ahmed Essaghir, Magnus Essand, Kenneth Wester, Kjell Öberg, Thomas H. Tötterman, Ricardo Lloyd, George Vasmatzis, Jean Baptiste Demoulin, et Valeria Giandomenico. 2009. « Novel markers for enterochromaffin cells and gastrointestinal neuroendocrine carcinomas ». *Modern Pathology* 22 (2): 261-72. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2008.174>.
- Leoncini, Emanuele, Paolo Boffetta, Michail Shafir, Katina Aleksovska, Stefania Bocchia, et Guido Rindi. 2017. « Increased incidence trend of low-grade and high-grade neuroendocrine neoplasms ». *Endocrine* 58 (2): 368-79. <https://doi.org/10.1007/s12020-017-1273-x>.
- Lepage, C, A M Bouvier, J M Phelip, C Hatem, C Vernet, et J Faivre. 2004. « Incidence and management of malignant digestive endocrine tumours in a well defined French population ». *Gut* 53 (4): 549-53. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.026401>.
- Lepage, Côme. 2004. « Lepage C, Bouvier AM, Phelip JM, Hatem C, Vernet C, Faivre J Incidence and management of malignant digestive endocrine tumours in a well defined French population. *Gut* 53: 549-553 ». *Gut* 53 (avril): 549-53. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.026401>.
- Lepage, Côme, Bernard Rachet, et Michel Philippe Coleman. 2007. « Survival From Malignant Digestive Endocrine Tumors in England and Wales: A Population-Based Study ». *Gastroenterology* 132 (3): 899-904. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.01.006>.
- Levick, Scott P., David R. Soto-Pantoja, Jianli Bi, W. Gregory Hundley, Alexander Widiapradja, Edward J. Manteufel, Tancia W. Bradshaw, et Giselle C. Meléndez. 2019. « Doxorubicin-Induced Myocardial Fibrosis Involves the Neurokinin-1 Receptor and Direct Effects on Cardiac Fibroblasts ». *Heart, Lung & Circulation* 28 (10): 1598-1605. <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2018.08.003>.
- Li, Guo, Yuan Tian, et Wei-Guo Zhu. 2020. « The Roles of Histone Deacetylases and Their Inhibitors in Cancer Therapy ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2020.576946>.
- Li, Su-Chen, Mohid Khan, Martyn Caplin, Tim Meyer, Kjell Öberg, et Valeria Giandomenico. 2015. « Somatostatin Analogs Treated Small Intestinal Neuroendocrine Tumor Patients Circulating MicroRNAs ». *PLOS ONE* 10 (5): e0125553. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125553>.
- Li, Xiaoyu, Xue Wang, Chunmei Zhang, Jinsong Wang, Songlin Wang, et Lei Hu. 2022. « Dysfunction of Metabolic Activity of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Aged Mice ». *Cell Proliferation* 55 (3): e13191. <https://doi.org/10.1111/cpr.13191>.
- Li, Xinghai, Bobby Monks, Qingyuan Ge, et Morris J. Birnbaum. 2007. « Akt/PKB Regulates Hepatic Metabolism by Directly Inhibiting PGC-1 α Transcription Coactivator ». *Nature* 447 (7147): 1012-16. <https://doi.org/10.1038/nature05861>.
- Li, Xiuchun, Xiaoliang Wang, Pan He, Edward Bennett, Erin Haggard, Jianjie Ma, et Chuanxi Cai. 2022. « Mitochondrial Membrane Potential Identifies a Subpopulation of Mesenchymal Progenitor Cells to Promote Angiogenesis and Myocardial Repair ». *Cells* 11 (10): 1713. <https://doi.org/10.3390/cells11101713>.
- Li, Yanan, Han Gong, Pan Wang, Yu Zhu, Hongling Peng, Yajuan Cui, Heng Li, Jing Liu, et Zi Wang. 2021. « The emerging role of ISWI chromatin remodeling complexes in cancer ». *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 40 (1): 346. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-02151-x>.
- Li, Yujue, Mingxing Hu, Jinwei Xie, Shuangqing Li, et Lunzhi Dai. 2023. « Dysregulation of histone modifications in bone marrow mesenchymal stem cells during skeletal ageing: roles and therapeutic prospects ». *Stem Cell Research & Therapy* 14 (1): 166. <https://doi.org/10.1186/s13287-023-03393-6>.
- Liesa, Marc, Manuel Palacín, et Antonio Zorzano. 2009. « Mitochondrial Dynamics in Mammalian Health and Disease ». *Physiological Reviews* 89 (3): 799-845. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2008>.

- Lin, Jiandie, Pere Puigserver, Jerry Donovan, Paul Tarr, et Bruce M. Spiegelman. 2002. « Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Coactivator 1 β (PGC-1 β), A Novel PGC-1-Related Transcription Coactivator Associated with Host Cell Factor* ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (3): 1645-48. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100631200>.
- Liu, Caojie, Ning Kang, Yuchen Guo, et Ping Gong. 2021. « Advances in Chromodomain Helicase DNA-Binding (CHD) Proteins Regulating Stem Cell Differentiation and Human Diseases ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9 (septembre): 710203. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.710203>.
- Liu, Jiejie, Haojie Hao, Lei Xia, Dongdong Ti, Hong Huang, Liang Dong, Chuan Tong, et al. 2015. « Hypoxia Pretreatment of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Facilitates Angiogenesis by Improving the Function of Endothelial Cells in Diabetic Rats with Lower Ischemia ». *PLoS ONE* 10 (5): e0126715. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126715>.
- Liu, Ling, Tom H. Cheung, Gregory W. Charville, Bernadette Marie Ceniza Hurgo, Tripp Leavitt, Johnathan Shih, Anne Brunet, et Thomas A. Rando. 2013. « Chromatin Modifications as Determinants of Muscle Stem Cell Quiescence and Chronological Aging ». *Cell Reports* 4 (1): 189-204. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.043>.
- Liu, Shiyu, Dawei Liu, Chider Chen, Kazunori Hamamura, Alireza Moshaverinia, Ruili Yang, Yao Liu, Yan Jin, et Songtao Shi. 2015. « MSC Transplantation Improves Osteopenia via Epigenetic Regulation of Notch Signaling in Lupus ». *Cell Metabolism* 22 (4): 606-18. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.08.018>.
- Liu, Wei, Pengyu Tang, Jiaying Wang, Wu Ye, Xuhui Ge, Yuluo Rong, Chengyue Ji, et al. 2021. « Extracellular Vesicles Derived from Melatonin-Preconditioned Mesenchymal Stem Cells Containing USP29 Repair Traumatic Spinal Cord Injury by Stabilizing NRF2 ». *Journal of Pineal Research* 71 (4): e12769. <https://doi.org/10.1111/jpi.12769>.
- Liu, Yijun, Nathalie Muñoz, Ang-Chen Tsai, Timothy M. Logan, et Teng Ma. 2017. « Metabolic Reconfiguration Supports Reacquisition of Primitive Phenotype in Human Mesenchymal Stem Cell Aggregates ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 35 (2): 398-410. <https://doi.org/10.1002/stem.2510>.
- Liu, Zhen, Guo-Dong Hu, Xiao-Bo Luo, Bin Yin, Bin Shu, Jing-Zhi Guan, et Chi-Yu Jia. 2017. « Potential of bone marrow mesenchymal stem cells in rejuvenation of the aged skin of rats ». *Biomedical Reports* 6 (3): 279-84. <https://doi.org/10.3892/br.2017.842>.
- Lloyd, Katie A., Andrew R. Moore, Bryony N. Parsons, Adrian O'Hara, Malcolm Boyce, Graham J. Dockray, Andrea Varro, et D. Mark Pritchard. 2016. « Gastrin-induced miR-222 promotes gastric tumor development by suppressing p27kip1 ». *Oncotarget* 7 (29): 45462-78. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9990>.
- Lombard-Bohas, C., E. Mitry, D. O'Toole, C. Louvet, D. Pillon, G. Cadiot, F. Borson-Chazot, et al. 2009. « Thirteen-Month Registration of Patients with Gastroenteropancreatic Endocrine Tumours in France ». *Neuroendocrinology* 89 (2): 217-22. <https://doi.org/10.1159/000151562>.
- Loyer, Xavier, Ana María Gómez, Paul Milliez, María Fernandez-Velasco, Peter Vangheluwe, Laurent Vinet, Dominique Charue, et al. 2008. « Cardiomyocyte Overexpression of Neuronal Nitric Oxide Synthase Delays Transition Toward Heart Failure in Response to Pressure Overload by Preserving Calcium Cycling ». *Circulation* 117 (25): 3187-98. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.741702>.
- Luo, Cheng, Guo-Xing Ling, Bin-Feng Lei, Xu Feng, Xiao-Yong Xie, Chen Fang, Yu-Gui Li, Xiong-Wei Cai, et Bao-Shi Zheng. 2021. « Circular RNA PVT1 Silencing Prevents Ischemia-Reperfusion Injury in Rat by Targeting microRNA-125b and microRNA-200a ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 159 (octobre): 80-90. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2021.05.019>.
- Luo, Zhen, Mingfu Tian, Ge Yang, Qiaoru Tan, Yubing Chen, Geng Li, Qiwei Zhang, Yongkui Li, Pin Wan, et Jianguo Wu. 2022. « Hypoxia Signaling in Human Health and Diseases: Implications and Prospects for Therapeutics ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 7 (1): 1-30. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01080-1>.
- « LUTATHERA (177Lutécium oxodotrétotide), radiopharmaceutique ». s. d. Haute Autorité de Santé. Consulté le 16 novembre 2023. https://www.has-sante.fr/jcms/c_2864194/fr/lutathera-177lutecium-oxodotreotide-radiopharmaceutique.
- Lv, Feng-Juan, Rocky S. Tuan, Kenneth M. C. Cheung, et Victor Y. L. Leung. 2014. « Concise Review: The Surface Markers and Identity of Human Mesenchymal Stem Cells ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 32 (6): 1408-19. <https://doi.org/10.1002/stem.1681>.
- Lyko, Frank. 2018. « The DNA Methyltransferase Family: A Versatile Toolkit for Epigenetic Regulation ». *Nature Reviews. Genetics* 19 (2): 81-92. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.80>.

- M, Kidd, Nadler B, Mane S, Eick G, Malfertheiner M, Champaneria M, Pfragner R, et Modlin I. 2007. « GeneChip, geNorm, and Gastrointestinal Tumors: Novel Reference Genes for Real-Time PCR ». *Physiological Genomics* 30 (3). <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00251.2006>.
- M, Kidd, Modlin Im, Mane Sm, Camp RI, Eick G, et Latich I. 2006. « The Role of Genetic Markers--NAP1L1, MAGE-D2, and MTA1--in Defining Small-Intestinal Carcinoid Neoplasia ». *Annals of Surgical Oncology* 13 (2). <https://doi.org/10.1245/ASO.2006.12.011>.
- M, Peracchi, Gebbia C, Basilisco G, Quatrini M, Tarantino C, Vescarelli C, Massironi S, et Conte D. 2005. « Plasma Chromogranin A in Patients with Autoimmune Chronic Atrophic Gastritis, Enterochromaffin-like Cell Lesions and Gastric Carcinoids ». *European Journal of Endocrinology* 152 (3). <https://doi.org/10.1530/eje.1.01862>.
- Ma, Xiang, et Sona Kang. 2019. « Functional Implications of DNA Methylation in Adipose Biology ». *Diabetes* 68 (5): 871-78. <https://doi.org/10.2337/dbi18-0057>.
- Maacha, Selma, Heba Sidahmed, Shana Jacob, Giusy Gentilcore, Rita Calzone, Jean-Charles Grivel, et Chiara Cugno. 2020. « Paracrine Mechanisms of Mesenchymal Stromal Cells in Angiogenesis ». *Stem Cells International* 2020: 4356359. <https://doi.org/10.1155/2020/4356359>.
- Magliulo, Daniela, Rosa Bernardi, et Samantha Messina. 2018. « Lysine-Specific Demethylase 1A as a Promising Target in Acute Myeloid Leukemia ». *Frontiers in Oncology* 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2018.00255>.
- Maiti, Atanu, et Alexander C. Drohat. 2011. « Thymine DNA Glycosylase Can Rapidly Excise 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine: Potential Implications for Active Demethylation of CpG Sites ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (41): 35334-38. <https://doi.org/10.1074/jbc.C111.284620>.
- Malczewska, Anna, Mark Kidd, Somer Matar, Beata Kos-Kudla, et Irvin M. Modlin. 2018. « A Comprehensive Assessment of the Role of miRNAs as Biomarkers in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors ». *Neuroendocrinology* 107 (1): 73-90. <https://doi.org/10.1159/000487326>.
- Malliaras, K., M. Kreke, et E. Marbán. 2011. « The Stuttering Progress of Cell Therapy for Heart Disease ». *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 90 (4): 532-41. <https://doi.org/10.1038/clpt.2011.175>.
- Mangi, Abeel A., Nicolas Noiseux, Deling Kong, Huamei He, Mojgan Rezvani, Joanne S. Ingwall, et Victor J. Dzau. 2003. « Mesenchymal Stem Cells Modified with Akt Prevent Remodeling and Restore Performance of Infarcted Hearts ». *Nature Medicine* 9 (9): 1195-1201. <https://doi.org/10.1038/nm912>.
- Margiana, Ria, Alexander Markov, Angelina O. Zekiy, Mohammed Ubaid Hamza, Khalid A. Al-Dabbagh, Sura Hasan Al-Zubaidi, Noora M. Hameed, et al. 2022. « Clinical application of mesenchymal stem cell in regenerative medicine: a narrative review ». *Stem Cell Research & Therapy* 13 (juillet): 366. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-03054-0>.
- Marmorstein, Ronen, et Ming-Ming Zhou. 2014. « Writers and Readers of Histone Acetylation: Structure, Mechanism, and Inhibition ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6 (7): a018762. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018762>.
- Martini, Hélène, Jason S. Iacovoni, Damien Maggiorani, Marianne Dutaur, Dimitri J. Marsal, Jerome Roncalli, Romain Itier, et al. 2019. « Aging Induces Cardiac Mesenchymal Stromal Cell Senescence and Promotes Endothelial Cell Fate of the CD90 + Subset ». *Aging Cell* 18 (5): e13015. <https://doi.org/10.1111/acer.13015>.
- Maryanovich, Maria, Yehudit Zaltsman, Antonella Ruggiero, Andres Goldman, Liat Shachnai, Smadar Levin Zaidman, Ziv Porat, Karin Golan, Tsvee Lapidot, et Atan Gross. 2015. « An MTCH2 Pathway Repressing Mitochondria Metabolism Regulates Haematopoietic Stem Cell Fate ». *Nature Communications* 6 (juillet): 7901. <https://doi.org/10.1038/ncomms8901>.
- Mathiyalagan, Prabhu, Marta Adamiak, Joshua Mayourian, Yassine Sassi, Yaxuan Liang, Neha Agarwal, Divya Jha, et al. 2019. « FTO-Dependent N6-Methyladenosine Regulates Cardiac Function During Remodeling and Repair ». *Circulation* 139 (4): 518-32. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.033794>.
- Matta, Anthony, Vanessa Nader, Marine Lebrin, Fabian Gross, Anne-Catherine Prats, Daniel Cussac, Michel Galinier, et Jerome Roncalli. 2022. « Pre-Conditioning Methods and Novel Approaches with Mesenchymal Stem Cells Therapy in Cardiovascular Disease ». *Cells* 11 (10): 1620. <https://doi.org/10.3390/cells11101620>.
- Mazo, Manuel, Valérie Planat-Bénard, Gloria Abizanda, Beatriz Pelacho, Bertrand Léobon, Juan José Gavira, Iván Peñuelas, et al. 2008. « Transplantation of Adipose Derived Stromal Cells Is

- Associated with Functional Improvement in a Rat Model of Chronic Myocardial Infarction ». *European Journal of Heart Failure* 10 (5): 454-62. <https://doi.org/10.1016/j.ejheart.2008.03.017>.
- Medaer, Eva, Chris Verslype, Eric Van Cutsem, Jeroen Dekervel, Paul M. Clement, Kristiaan Nackaerts, Annouschka Laenen, et al. 2020. « Influence of Pretreatment with Everolimus or Sunitinib on the Subacute Hematotoxicity of 177Lu-DOTATATE PRRT ». *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)* 59 (6): 644-51. <https://doi.org/10.1080/0284186X.2020.1723161>.
- Meijer, WG, IP Kema, M Volmer, PHB Willemse, et EGE De Vries. 2000. « Discriminating capacity of indole markers in the diagnosis of carcinoid tumors ». *Clinical Chemistry* 46 (10): 1588-96.
- Melkov, Anna, Raju Baskar, Yehonatan Alcalay, et Uri Abdu. 2016. « A New Mode of Mitochondrial Transport and Polarized Sorting Regulated by Dynein, Milton and Miro ». *Development (Cambridge, England)* 143 (22): 4203-13. <https://doi.org/10.1242/dev.138289>.
- Menard, Cedric, Luciano Pacelli, Giulio Bassi, Joelle Dulong, Francesco Bifari, Isabelle Bezier, Jasmina Zanoncello, et al. 2013. « Clinical-Grade Mesenchymal Stromal Cells Produced under Various Good Manufacturing Practice Processes Differ in Their Immunomodulatory Properties: Standardization of Immune Quality Controls ». *Stem Cells and Development* 22 (12): 1789-1801. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0594>.
- Menasché, Philippe. 2016. « The Future of Stem Cells: Should We Keep the “Stem” and Skip the “Cells”? ». *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 152 (2): 345-49. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2016.02.058>.
- Mestier, Louis de, Olivia Hentic, Hedia Brixi, Philippe Ruzsniowski, et Guillaume Cadiot. 2014. « Effet antitumoral des analogues de la somatostatine dans les tumeurs neuroendocrines digestives ». *Hépto-Gastro & Oncologie Digestive* 21 (10): 835-44. <https://doi.org/10.1684/hpg.2014.1090>.
- Meyer, Mark B., Nancy A. Benkusky, Buer Sen, Janet Rubin, et J. Wesley Pike. 2016. « Epigenetic Plasticity Drives Adipogenic and Osteogenic Differentiation of Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells * ». *Journal of Biological Chemistry* 291 (34): 17829-47. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.736538>.
- Mias, Céline, Olivier Lairez, Elodie Trouche, Jérôme Roncalli, Denis Calise, Marie-Hélène Seguelas, Catherine Ordener, et al. 2009. « Mesenchymal Stem Cells Promote Matrix Metalloproteinase Secretion by Cardiac Fibroblasts and Reduce Cardiac Ventricular Fibrosis after Myocardial Infarction ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 27 (11): 2734-43. <https://doi.org/10.1002/stem.169>.
- Mirebeau-Prunier, Delphine, Soazig Le Pennec, Caroline Jacques, Naig Gueguen, Julie Poirier, Yves Malthiery, et Frédérique Savagner. 2010. « Estrogen-Related Receptor α and PGC-1-Related Coactivator Constitute a Novel Complex Mediating the Biogenesis of Functional Mitochondria ». *The FEBS Journal* 277 (3): 713-25. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07516.x>.
- Mm, Khalil, Tremoleda JI, Bayomy Tb, et Gsell W. 2011. « Molecular SPECT Imaging: An Overview ». *International Journal of Molecular Imaging* 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/796025>.
- Modlin, I. M., M. Kidd, M. Falconi, P. L. Filosso, A. Frilling, A. Malczewska, C. Toumpanakis, et al. 2021. « A Multigenomic Liquid Biopsy Biomarker for Neuroendocrine Tumor Disease Outperforms CgA and Has Surgical and Clinical Utility ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 32 (11): 1425-33. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.08.1746>.
- Modlin, Irvin M., Ignat Drozdov, et Mark Kidd. 2013. « The Identification of Gut Neuroendocrine Tumor Disease by Multiple Synchronous Transcript Analysis in Blood ». *PLOS ONE* 8 (5): e63364. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063364>.
- . 2014. « Gut Neuroendocrine Tumor Blood qPCR Fingerprint Assay: Characteristics and Reproducibility ». *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 52 (3): 419-29. <https://doi.org/10.1515/cclm-2013-0496>.
- Modlin, Irvin M., Mark Kidd, Anna Malczewska, Ignat Drozdov, Lisa Bodei, Somer Matar, et Kyung-Min Chung. 2018. « The NETest: The Clinical Utility of Multigene Blood Analysis in the Diagnosis and Management of Neuroendocrine Tumors ». *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, Innovations in the Management of Neuroendocrine Tumors*, 47 (3): 485-504. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2018.05.002>.
- Modlin, Irvin M, Kjell Oberg, Daniel C Chung, Robert T Jensen, Wouter W de Herder, Rajesh V Thakker, Martyn Caplin, et al. 2008. « Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours ». *The Lancet Oncology* 9 (1): 61-72. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(07\)70410-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(07)70410-2).
- Mohammad, Helai P., Olena Barbash, et Caretha L. Creasy. 2019. « Targeting Epigenetic Modifications in Cancer Therapy: Erasing the Roadmap to Cancer ». *Nature Medicine* 25 (3): 403-18. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0376-8>.
- Mongelli, Alessia, Sandra Atlante, Tiziana Bachetti, Fabio Martelli, Antonella Farsetti, et Carlo Gaetano. 2020. « Epigenetic Signaling and RNA Regulation in Cardiovascular Diseases ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (2): 509. <https://doi.org/10.3390/ijms21020509>.

- Monsalve, María, Zhidan Wu, Guillaume Adelmant, Pere Puigserver, Melina Fan, et Bruce M. Spiegelman. 2000. « Direct Coupling of Transcription and mRNA Processing through the Thermogenic Coactivator PGC-1 ». *Molecular Cell* 6 (2): 307-16. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00031-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00031-9).
- Mootha, Vamsi K., Christoph Handschin, Dan Arlow, Xiaohui Xie, Julie St. Pierre, Smita Sihag, Wenli Yang, et al. 2004. « Errα and Gabpa/b specify PGC-1α-dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (17): 6570-75. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401401101>.
- Morin, Morgane, Hadia Moindjie, et Clara Nahmias. 2022. « Le transport mitochondrial - Quel impact dans le cancer ? » *médecine/sciences* 38 (6-7): 585-93. <https://doi.org/10.1051/medsci/2022085>.
- Mortada, Ibrahim, et Rola Mortada. 2018. « Epigenetic Changes in Mesenchymal Stem Cells Differentiation ». *European Journal of Medical Genetics* 61 (2): 114-18. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2017.10.015>.
- Mount, Natalie M., Stephen J. Ward, Panos Kefalas, et Johan Hyllner. 2015. « Cell-based therapy technology classifications and translational challenges ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 370 (1680): 20150017. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0017>.
- Mudd, James O., et David A. Kass. 2008. « Tackling Heart Failure in the Twenty-First Century ». *Nature* 451 (7181): 919-28. <https://doi.org/10.1038/nature06798>.
- Mukamel, Zohar, et Adi Kimchi. 2004. « Death-Associated Protein 3 Localizes to the Mitochondria and Is Involved in the Process of Mitochondrial Fragmentation during Cell Death ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (35): 36732-38. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400041200>.
- Müller, Martin, Anke Samel-Pommerencke, Carine Legrand, Francesca Tuorto, Frank Lyko, et Ann E. Ehrenhofer-Murray. 2019. « Division of Labour: tRNA Methylation by the NSun2 tRNA Methyltransferases Trm4a and Trm4b in Fission Yeast ». *RNA Biology* 16 (3): 249-56. <https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1568819>.
- Muscarella, Lucia Anna, Vito D'Alessandro, Annamaria la Torre, Massimiliano Copetti, Angelo De Cata, Paola Parrella, Marco Sperandeo, et al. 2011. « Gene Expression of Somatostatin Receptor Subtypes SSTR2a, SSTR3 and SSTR5 in Peripheral Blood of Neuroendocrine Lung Cancer Affected Patients ». *Cellular Oncology* 34 (5): 435-41. <https://doi.org/10.1007/s13402-011-0025-9>.
- Musselman, Catherine A., Marie-Eve Lalonde, Jacques Côté, et Tatiana G. Kutateladze. 2012. « Perceiving the Epigenetic Landscape through Histone Readers ». *Nature Structural & Molecular Biology* 19 (12): 1218-27. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2436>.
- Mylonis, Ilias, George Simos, et Efrosyni Paraskeva. 2019. « Hypoxia-Inducible Factors and the Regulation of Lipid Metabolism ». *Cells* 8 (3): 214. <https://doi.org/10.3390/cells8030214>.
- Na, Un, Wendou Yu, James Cox, Daniel K. Bricker, Knut Brockmann, Jared Rutter, Carl S. Thummel, et Dennis R. Winge. 2014. « The LYR Factors SDHAF1 and SDHAF3 Mediate Maturation of the Iron-Sulfur Subunit of Succinate Dehydrogenase ». *Cell Metabolism* 20 (2): 253-66. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.05.014>.
- Nagaya, Noritoshi, Kenji Kangawa, Takefumi Itoh, Takashi Iwase, Shinsuke Murakami, Yoshinori Miyahara, Takafumi Fujii, et al. 2005. « Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Improves Cardiac Function in a Rat Model of Dilated Cardiomyopathy ». *Circulation* 112 (8): 1128-35. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.500447>.
- Nagtegaal, Iris D, Robert D Odze, David Klimstra, Valerie Paradis, Massimo Rugge, Peter Schirmacher, Kay M Washington, Fatima Carneiro, et Ian A Cree. 2020. « The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system ». *Histopathology* 76 (2): 182-88. <https://doi.org/10.1111/his.13975>.
- Nakamura, Tamami, Tohru Hosoyama, Daichi Kawamura, Yuriko Takeuchi, Yuya Tanaka, Makoto Samura, Koji Ueno, et al. 2016. « Influence of aging on the quantity and quality of human cardiac stem cells ». *Scientific Reports* 6 (mars): 22781. <https://doi.org/10.1038/srep22781>.
- Nalawansha, Dhanusha A., et Mary Kay H. Pflum. 2017. « LSD1 Substrate Binding and Gene Expression Are Affected by HDAC1-Mediated Deacetylation ». *ACS chemical biology* 12 (1): 254-64. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b00776>.
- Nath, Sunil. 2017. « Two-Ion Theory of Energy Coupling in ATP Synthesis Rectifies a Fundamental Flaw in the Governing Equations of the Chemiosmotic Theory ». *Biophysical Chemistry* 230 (novembre): 45-52. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2017.08.005>.

- Nie, Wen-Bo, Dan Zhang, et Li-Sheng Wang. 2020. « Growth Factor Gene-Modified Mesenchymal Stem Cells in Tissue Regeneration ». *Drug Design, Development and Therapy* 14: 1241-56. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S243944>.
- Niederle, B., U.-F. Pape, F. Costa, D. Gross, F. Kelestimur, U. Knigge, K. Öberg, et al. 2016. « ENETS Consensus Guidelines Update for Neuroendocrine Neoplasms of the Jejunum and Ileum ». *Neuroendocrinology* 103 (2): 125-38. <https://doi.org/10.1159/000443170>.
- Niemann, Axel, Marcel Ruegg, Veronica La Padula, Angelo Schenone, et Ueli Suter. 2005. « Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network ». *The Journal of Cell Biology* 170 (7): 1067-78. <https://doi.org/10.1083/jcb.200507087>.
- Nikfarjam, Sepideh, Jafar Rezaie, Naime Majidi Zolbanin, et Reza Jafari. 2020. « Mesenchymal stem cell derived-exosomes: a modern approach in translational medicine ». *Journal of Translational Medicine* 18 (1): 449. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02622-3>.
- Nishiyama, Atsuya, et Makoto Nakanishi. 2021. « Navigating the DNA Methylation Landscape of Cancer ». *Trends in Genetics: TIG* 37 (11): 1012-27. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.05.002>.
- Noiseux, Nicolas, Massimiliano Gnechi, Marco Lopez-Illasaca, Lunan Zhang, Scott D. Solomon, Arjun Deb, Victor J. Dzau, et Richard E. Pratt. 2006. « Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation ». *Molecular Therapy* 14 (6): 840-50. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.05.016>.
- Öberg, K., A. Califano, J. R. Strosberg, S. Ma, U. Pape, L. Bodei, G. Kaltsas, et al. 2020. « A Meta-Analysis of the Accuracy of a Neuroendocrine Tumor mRNA Genomic Biomarker (NETest) in Blood ». *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 31 (2): 202-12. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2019.11.003>.
- Ogata, Kenichi, Masashi Osugi, Takamasa Kawai, Yukiko Wakayama, Kohei Sakaguchi, Seiji Nakamura, et Wataru Katagiri. 2018. « Secretomes of Mesenchymal Stem Cells Induce Early Bone Regeneration by Accelerating Migration of Stem Cells ». *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology* 30 (5): 445-51. <https://doi.org/10.1016/j.ajoms.2018.04.002>.
- Oh, Juhyun, Yang David Lee, et Amy J Wagers. 2014. « Stem cell aging: mechanisms, regulators and therapeutic opportunities ». *Nature medicine* 20 (8): 870-80. <https://doi.org/10.1038/nm.3651>.
- O'Malley, Bert W., et Rakesh Kumar. 2009. « Nuclear Receptor Coregulators in Cancer Biology ». *Cancer research* 69 (21): 8217-22. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2223>.
- Ozkul, Yusuf, et Umberto Galderisi. 2016. « The Impact of Epigenetics on Mesenchymal Stem Cell Biology ». *Journal of Cellular Physiology* 231 (11): 2393-2401. <https://doi.org/10.1002/jcp.25371>.
- Panarelli, Nicole, Kathrin Tyryshkin, Justin Jong Mun Wong, Adrianna Majewski, Xiaojing Yang, Theresa Scognamiglio, Michelle Kang Kim, et al. 2019a. « Evaluating Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors through microRNA Sequencing ». *Endocrine-Related Cancer* 26 (1): 47-57. <https://doi.org/10.1530/ERC-18-0244>.
- Papa, Sergio, Pietro Luca Martino, Giuseppe Capitanio, Antonio Gaballo, Domenico De Rasmio, Anna Signorile, et Vittoria Petruzzella. 2012. « The Oxidative Phosphorylation System in Mammalian Mitochondria ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 942: 3-37. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2869-1_1.
- Park, Jisu, Kyubin Lee, Kyunghwan Kim, et Sun-Ju Yi. 2022. « The Role of Histone Modifications: From Neurodevelopment to Neurodiseases ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 7 (1): 1-23. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01078-9>.
- Park, Won Soon, So Yoon Ahn, Se In Sung, Jee-Yin Ahn, et Yun Sil Chang. 2018. « Strategies to Enhance Paracrine Potency of Transplanted Mesenchymal Stem Cells in Intractable Neonatal Disorders ». *Pediatric Research* 83 (1): 214-22. <https://doi.org/10.1038/pr.2017.249>.
- Parkinson, Helen, Misha Kapushesky, Nikolay Kolesnikov, Gabriella Rustici, Mohammad Shojatalab, Niran Abeygunawardena, Hugo Berube, et al. 2009. « ArrayExpress update—from an archive of functional genomics experiments to the atlas of gene expression ». *Nucleic Acids Research* 37 (suppl_1): D868-72. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn889>.
- Parmar, Jyotsana J, et Ranjith Padinhateeri. 2020. « Nucleosome positioning and chromatin organization ». *Current Opinion in Structural Biology, Biophysical and Computational Methods • Cryo EM*, 64 (octobre): 111-18. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.06.021>.
- Peltzer, Juliette, Kyle Lund, et Jean-Jacques Lataillade. 2015. « Modes d'actions paracrines des Cellules Stromales Mésenchymateuses ». *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine* 199 (4): 501-14. [https://doi.org/10.1016/S0001-4079\(19\)30923-9](https://doi.org/10.1016/S0001-4079(19)30923-9).
- Podyacheva, Ekaterina, Tatiana Shmakova, Ekaterina Kushnareva, Anatoliya Onopchenko, Mikhail Martynov, Daria Andreeva, Roman Toropov, et al. 2022. « Modeling Doxorubicin-Induced

- Cardiomyopathy With Fibrotic Myocardial Damage in Wistar Rats ». *Cardiology Research* 13 (6): 339-56. <https://doi.org/10.14740/cr1416>.
- Poller, Wolfgang, Stefanie Dimmeler, Stephane Heymans, Tanja Zeller, Jan Haas, Mahir Karakas, David-Manuel Leistner, et al. 2018. « Non-Coding RNAs in Cardiovascular Diseases: Diagnostic and Therapeutic Perspectives ». *European Heart Journal* 39 (29): 2704-16. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx165>.
- Ponnusamy, Murugavel, Fang Liu, Yu-Hui Zhang, Rui-Bei Li, Mei Zhai, Fei Liu, Lu-Yu Zhou, et al. 2019. « Long Noncoding RNA CPR (Cardiomyocyte Proliferation Regulator) Regulates Cardiomyocyte Proliferation and Cardiac Repair ». *Circulation* 139 (23): 2668-84. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.035832>.
- Pool, Stefan E., Eric P. Krenning, Gerben A. Koning, Casper H. J. van Eijck, Jaap J. M. Teunissen, Boen Kam, Roelf Valkema, Dik J. Kwekkeboom, et Marion de Jong. 2010. « Preclinical and Clinical Studies of Peptide Receptor Radionuclide Therapy ». *Seminars in Nuclear Medicine* 40 (3): 209-18. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2009.12.001>.
- Pouikli, Andromachi, et Peter Tessarz. 2021. « Metabolism and Chromatin: A Dynamic Duo That Regulates Development and Ageing: Elucidating the Metabolism-Chromatin Axis in Bone-Marrow Mesenchymal Stem Cell Fate Decisions ». *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 43 (5): e2000273. <https://doi.org/10.1002/bies.202000273>.
- Poulos, Jordan. 2018. « The limited application of stem cells in medicine: a review ». *Stem Cell Research & Therapy* 9 (janvier): 1. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0735-7>.
- Powelka, Aimee M., Asha Seth, Joseph V. Virbasius, Evangelos Kiskinis, Sarah M. Nicoloso, Adilson Guilherme, Xiaoqing Tang, et al. 2006. « Suppression of oxidative metabolism and mitochondrial biogenesis by the transcriptional corepressor RIP140 in mouse adipocytes ». *The Journal of Clinical Investigation* 116 (1): 125-36. <https://doi.org/10.1172/JCI26040>.
- Price, James M., Hitesh B. Mistry, Guy Betts, Eleanor J. Cheadle, Lynne Dixon, Kate Garcez, Tim Illidge, et al. 2022. « Pretreatment Lymphocyte Count Predicts Benefit From Concurrent Chemotherapy With Radiotherapy in Oropharyngeal Cancer ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 40 (20): 2203-12. <https://doi.org/10.1200/JCO.21.01991>.
- Puigserver, Pere, James Rhee, Jiandie Lin, Zhidan Wu, J. Cliff Yoon, Chen-Yu Zhang, Stefan Krauss, Vamsi K Mootha, Bradford B Lowell, et Bruce M Spiegelman. 2001. « Cytokine Stimulation of Energy Expenditure through P38 MAP Kinase Activation of PPAR γ Coactivator-1 ». *Molecular Cell* 8 (5): 971-82. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00390-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00390-2).
- Pulido-Escribano, Victoria, Bárbara Torrecillas-Baena, Marta Camacho-Cardenosa, Gabriel Dorado, María Ángeles Gálvez-Moreno, et Antonio Casado-Díaz. 2022. « Role of Hypoxia Preconditioning in Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem-Cell-Derived Extracellular Vesicles ». *World Journal of Stem Cells* 14 (7): 453-72. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v14.i7.453>.
- Qu, Shibin, Xisheng Yang, Xiaolei Li, Jianlin Wang, Yuan Gao, Runze Shang, Wei Sun, Kefeng Dou, et Haimin Li. 2015. « Circular RNA: A New Star of Noncoding RNAs ». *Cancer Letters* 365 (2): 141-48. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.06.003>.
- Quinn, Jeffrey J., et Howard Y. Chang. 2016. « Unique Features of Long Non-Coding RNA Biogenesis and Function ». *Nature Reviews Genetics* 17 (1): 47-62. <https://doi.org/10.1038/nrg.2015.10>.
- R, Arnold, Wilke A, Rinke A, Mayer C, Kann Ph, Klose KJ, Scherag A, Hahmann M, Müller Hh, et Barth P. 2008. « Plasma Chromogranin A as Marker for Survival in Patients with Metastatic Endocrine Gastroenteropancreatic Tumors ». *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association* 6 (7). <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2008.02.052>.
- Rambold, Angelika S., Brenda Kostecky, Natalie Elia, et Jennifer Lippincott-Schwartz. 2011. « Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (25): 10190-95. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107402108>.
- Razeghian-Jahromi, Iman, Anthony G. Matta, Ronan Canitrot, Mohammad Javad Zibaenezhad, Mahboobeh Razmkhah, Anahid Safari, Vanessa Nader, et Jerome Roncalli. 2021. « Surfing the Clinical Trials of Mesenchymal Stem Cell Therapy in Ischemic Cardiomyopathy ». *Stem Cell Research & Therapy* 12 (1): 361. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02443-1>.
- « Référence Tumeurs neuroendocrines du grêle ». s.d. Consulté le 22 novembre 2023. <http://oncologik.fr/referentiels/interregion/tumeurs-neuroendocrines-du-grele>.
- Rehman, Jalees. 2010. « Empowering Self-Renewal and Differentiation: The Role of Mitochondria in Stem Cells ». *Journal of Molecular Medicine* 88 (10): 981-86. <https://doi.org/10.1007/s00109-010-0678-2>.

- Reik, Wolf. 2007. « Stability and Flexibility of Epigenetic Gene Regulation in Mammalian Development ». *Nature* 447 (7143): 425-32. <https://doi.org/10.1038/nature05918>.
- Reilly, Shannon M., et Chih-Hao Lee. 2008. « PPAR δ as a Therapeutic Target in Metabolic Disease ». *FEBS Letters* 582 (1): 26-31. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.11.040>.
- Ren, Jianhan, Delan Huang, Runze Li, Weicai Wang, et Chen Zhou. 2020. « Control of Mesenchymal Stem Cell Biology by Histone Modifications ». *Cell & Bioscience* 10 (1): 11. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-0378-8>.
- Ren, Ruotong, Alejandro Ocampo, Guang-Hui Liu, et Juan Carlos Izpisua Belmonte. 2017. « Regulation of Stem Cell Aging by Metabolism and Epigenetics ». *Cell Metabolism* 26 (3): 460-74. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.07.019>.
- Reubi, J. C., J. Laissue, E. Krenning, et S. W. J. Lamberts. 1992. « Somatostatin receptors in human cancer: Incidence, characteristics, functional correlates and clinical implications ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 43 (1): 27-35. [https://doi.org/10.1016/0960-0760\(92\)90184-K](https://doi.org/10.1016/0960-0760(92)90184-K).
- Reubi, Jean, Beatrice Waser, Jean-Claude Schaer, et Jean A. Laissue. 2001. « Somatostatin Receptor Sst1–Sst5 Expression in Normal and Neoplastic Human Tissues Using Receptor Autoradiography with Subtype-Selective Ligands ». *European Journal of Nuclear Medicine* 28 (7): 836-46. <https://doi.org/10.1007/s002590100541>.
- Rigaud, Vagner O. C., Robert Hoy, Sadia Mohsin, et Mohsin Khan. 2020. « Stem Cell Metabolism: Powering Cell-Based Therapeutics ». *Cells* 9 (11): 2490. <https://doi.org/10.3390/cells9112490>.
- Rindi, Guido, Ozgur Mete, Silvia Uccella, Olca Basturk, Stefano La Rosa, Lodewijk A. A. Brosens, Shereen Ezzat, et al. 2022. « Overview of the 2022 WHO Classification of Neuroendocrine Neoplasms ». *Endocrine Pathology* 33 (1): 115-54. <https://doi.org/10.1007/s12022-022-09708-2>.
- Rodgers, Joseph T., Carles Lerin, Zachary Gerhart-Hines, et Pere Puigserver. 2008. « Metabolic Adaptations through the PGC-1 α and SIRT1 Pathways ». *FEBS letters* 582 (1): 46-53. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.11.034>.
- Roth, Gregory A., Catherine Johnson, Amanuel Abajobir, Foad Abd-Allah, Semaw Ferede Abera, Gebre Abyu, Muktar Ahmed, et al. 2017. « Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015 ». *Journal of the American College of Cardiology* 70 (1): 1-25. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.04.052>.
- Ruano, David, José A. López-Martín, Lucas Moreno, Álvaro Lassaletta, Francisco Bautista, Maitane Andión, Carmen Hernández, et al. 2020. « First-in-Human, First-in-Child Trial of Autologous MSCs Carrying the Oncolytic Virus Icovir-5 in Patients with Advanced Tumors ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 28 (4): 1033-42. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.01.019>.
- Rube, Daniel A., et Alexander M. van der Blik. 2004. « Mitochondrial Morphology Is Dynamic and Varied ». *Molecular and Cellular Biochemistry* 256 (1): 331-39. <https://doi.org/10.1023/B:MCBI.0000009879.01256.f6>.
- Rytinki, Miia M., et Jorma J. Palvimo. 2008. « SUMOylation Modulates the Transcription Repressor Function of RIP140 ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (17): 11586-95. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709359200>.
- S, Massironi, Conte D, Sciola V, Spampatti Mp, Ciafardini C, Valenti L, Rossi Re, et Peracchi M. 2010. « Plasma Chromogranin A Response to Octreotide Test: Prognostic Value for Clinical Outcome in Endocrine Digestive Tumors ». *The American Journal of Gastroenterology* 105 (9). <https://doi.org/10.1038/ajg.2010.154>.
- Sadek, Hesham, et Eric N. Olson. 2020. « Toward the Goal of Human Heart Regeneration ». *Cell Stem Cell* 26 (1): 7-16. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.12.004>.
- Salmena, Leonardo, Laura Poliseno, Yvonne Tay, Lev Kats, et Pier Paolo Pandolfi. 2011. « A ceRNA Hypothesis: The Rosetta Stone of a Hidden RNA Language? ». *Cell* 146 (3): 353-58. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.014>.
- Sánchez-Aragó, María, Javier García-Bermúdez, Inmaculada Martínez-Reyes, Fulvio Santacatterina, et José M Cuezva. 2013. « Degradation of IF1 controls energy metabolism during osteogenic differentiation of stem cells ». *EMBO reports* 14 (7): 638-44. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.72>.
- Santos, Janine Hertzog. 2021. « Mitochondria signaling to the epigenome: A novel role for an old organelle ». *Free radical biology & medicine* 170 (juillet): 59-69. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.11.016>.
- Sauvanet, Cécile, Laetitia Arnauné-Pelloquin, Claudine David, Pascale Belenguer, et Manuel Rojo. 2010. « Dynamique et morphologie mitochondriales - Acteurs, mécanismes et pertinence

- Savagner, Frédérique, Delphine Mirebeau, Caroline Jacques, Serge Guyetant, Catherine Morgan, Brigitte Franc, Pascal Reynier, et Yves Malthièry. 2003. « PGC-1-related coactivator and targets are upregulated in thyroid oncocyoma ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 310 (3): 779.
https://www.academia.edu/12781358/PGC_1_related_coactivator_and_targets_are_upregulated_in_thyroid_oncocyoma.
- Savarese, Gianluigi, Peter Moritz Becher, Lars H. Lund, Petar Seferovic, Giuseppe M. C. Rosano, et Andrew J. S. Coats. 2023. « Global Burden of Heart Failure: A Comprehensive and Updated Review of Epidemiology ». *Cardiovascular Research* 118 (17): 3272-87.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvac013>.
- Scarpulla, Richard C. 2002. « Transcriptional Activators and Coactivators in the Nuclear Control of Mitochondrial Function in Mammalian Cells ». *Gene*, Papers presented at the International Meeting « Mitochondria: Evolution, Genomics, Homeostasis and Pathology », Selva di Fasano (BR, Italy), 9-12 May 2001, 286 (1): 81-89. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(01\)00809-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00809-5).
- . 2008. « Transcriptional Paradigms in Mammalian Mitochondrial Biogenesis and Function ». *Physiological Reviews* 88 (2): 611-38. <https://doi.org/10.1152/physrev.00025.2007>.
- . 2011. « Metabolic Control of Mitochondrial Biogenesis through the PGC-1 Family Regulatory Network ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, Mitochondria and Cardioprotection, 1813 (7): 1269-78. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.09.019>.
- Schell, John C., Dona R. Wisidagama, Claire Bensard, Helong Zhao, Peng Wei, Jason Tanner, Aimee Flores, et al. 2017. « Control of Intestinal Stem Cell Function and Proliferation by Mitochondrial Pyruvate Metabolism ». *Nature Cell Biology* 19 (9): 1027-36. <https://doi.org/10.1038/ncb3593>.
- Schneider, Caroline A., Wayne S. Rasband, et Kevin W. Eliceiri. 2012. « NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis ». *Nature Methods* 9 (7): 671-75. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>.
- Schneider, Robert, Andrew J. Bannister, Fiona A. Myers, Alan W. Thorne, Colyn Crane-Robinson, et Tony Kouzarides. 2004. « Histone H3 Lysine 4 Methylation Patterns in Higher Eukaryotic Genes ». *Nature Cell Biology* 6 (1): 73-77. <https://doi.org/10.1038/ncb1076>.
- Schreiner, Silke, Anna Didio, Lee-Hsueh Hung, et Albrecht Bindereif. 2020. « Design and application of circular RNAs with protein-sponge function ». *Nucleic Acids Research* 48 (21): 12326-35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1085>.
- Schwarz, Thomas L. 2013. « Mitochondrial Trafficking in Neurons ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (6): a011304. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011304>.
- Seo, Arnold Y., Anna-Maria Joseph, Debapriya Dutta, Judy C. Y. Hwang, John P. Aris, et Christiaan Leeuwenburgh. 2010. « New insights into the role of mitochondria in aging: mitochondrial dynamics and more ». *Journal of Cell Science* 123 (15): 2533-42. <https://doi.org/10.1242/jcs.070490>.
- Sesaki, H., et R. E. Jensen. 1999. « Division versus Fusion: Dnm1p and Fzo1p Antagonistically Regulate Mitochondrial Shape ». *The Journal of Cell Biology* 147 (4): 699-706. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.4.699>.
- Shammaa, Riam, Abed El-Hakim El-Kadiry, Jamilah Abusarah, et Moutih Rafei. 2020. « Mesenchymal Stem Cells Beyond Regenerative Medicine ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8: 72. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00072>.
- Sharkis, Saul J., Richard J. Jones, Curt Civin, et Yoon-Young Jang. 2012. « Pluripotent Stem Cell-Based Cancer Therapy: Promise and Challenges ». *Science Translational Medicine* 4 (127): 127ps9. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003920>.
- Sharma, Nancy, Boris G. Naraev, Eric G. Engelman, M. Bridget Zimmerman, David L. Bushnell, Thomas M. O'Dorisio, M. Sue O'Dorisio, et al. 2017. « Peptide Receptor Radionuclide Therapy Outcomes in a North American Cohort With Metastatic Well-Differentiated Neuroendocrine Tumors ». *Pancreas* 46 (2): 151-56. <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000000734>.
- Sheng, Wanqiang, Martin W. LaFleur, Thao H. Nguyen, Sujun Chen, Ankur Chakravarthy, Jake Ryan Conway, Ying Li, et al. 2018. « LSD1 ablation stimulates anti-tumor immunity and enables checkpoint blockade ». *Cell* 174 (3): 549-563.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.052>.
- Shi, Deshun, Fenghua Lu, Yingming Wei, Kuiqing Cui, Sufang Yang, Jingwei Wei, et Qingyou Liu. 2007. « Buffalos (Bubalus Bubalis) Cloned by Nuclear Transfer of Somatic Cells ». *Biology of Reproduction* 77 (2): 285-91. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.060210>.
- Shi, Yujiang, Fei Lan, Caitlin Matson, Peter Mulligan, Johnathan R. Whetstone, Philip A. Cole, Robert A. Casero, et Yang Shi. 2004. « Histone Demethylation Mediated by the Nuclear Amine Oxidase Homolog LSD1 ». *Cell* 119 (7): 941-53. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.012>.

- Shutt, Timothy E., Maria F. Lodeiro, Justin Cotney, Craig E. Cameron, et Gerald S. Shadel. 2010. « Core human mitochondrial transcription apparatus is a regulated two-component system in vitro ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (27): 12133-38. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910581107>.
- Shyh-Chang, Ng, et Huck-Hui Ng. 2017. « The metabolic programming of stem cells ». *Genes & development* 31 (4): 336-46.
- Sierra, Maribel L., Alberto Agazzi, Lisa Bodei, Monica Pacifici, Demetrio Aricò, Concetta De Cicco, Jessica Quarna, Maddalena Sansovini, Michele De Simone, et Giovanni Paganelli. 2009. « Lymphocytic Toxicity in Patients after Peptide-Receptor Radionuclide Therapy (PRRT) with ¹⁷⁷Lu-DOTATATE and ⁹⁰Y-DOTATOC ». *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 24 (6): 659-65. <https://doi.org/10.1089/cbr.2009.0641>.
- Silva Meirelles, Lindolfo da, Aparecida Maria Fontes, Dimas Tadeu Covas, et Arnold I. Caplan. 2009. « Mechanisms Involved in the Therapeutic Properties of Mesenchymal Stem Cells ». *Cytokine & Growth Factor Reviews*, Bone Morphogenetic Proteins, Stem Cells and Regenerative Medicine, 20 (5): 419-27. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.10.002>.
- Silvestre, Jean-Sébastien, et Philippe Menasché. 2015. « The Evolution of the Stem Cell Theory for Heart Failure ». *EBioMedicine* 2 (12): 1871-79. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.11.010>.
- Skene, Peter J., et Steven Henikoff. 2017. « An Efficient Targeted Nuclease Strategy for High-Resolution Mapping of DNA Binding Sites ». *eLife* 6 (janvier): e21856. <https://doi.org/10.7554/eLife.21856>.
- Soltanian, Sara, et Maryam M. Matin. 2011. « Cancer Stem Cells and Cancer Therapy ». *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 32 (3): 425-40. <https://doi.org/10.1007/s13277-011-0155-8>.
- Sommer, Cesar A., et Gustavo Mostoslavsky. 2010. « Experimental Approaches for the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells ». *Stem Cell Research & Therapy* 1 (3): 26. <https://doi.org/10.1186/scrt26>.
- Soriano, Francesc X., Marc Liesa, Daniel Bach, David C. Chan, Manuel Palacín, et Antonio Zorzano. 2006. « Evidence for a Mitochondrial Regulatory Pathway Defined by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Coactivator-1 α , Estrogen-Related Receptor- α , and Mitofusin 2 ». *Diabetes* 55 (6): 1783-91. <https://doi.org/10.2337/db05-0509>.
- St Laurent, Georges, Claes Wahlestedt, et Philipp Kapranov. 2015. « The Landscape of long non-coding RNA classification ». *Trends in genetics: TIG* 31 (5): 239-51. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.03.007>.
- Stiburek, L., H. Hansikova, M. Tesarova, L. Cerna, et J. Zeman. 2006. « Biogenesis of Eukaryotic Cytochrome c Oxidase ». *Physiological Research* 55 Suppl 2: S27-41. <https://doi.org/10.33549/physiolres.930000.55.S2.27>.
- St-Pierre, Julie, Jiandie Lin, Stefan Krauss, Paul T. Tarr, Ruoqing Yang, Christopher B. Newgard, et Bruce M. Spiegelman. 2003. « Bioenergetic Analysis of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in Muscle Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (29): 26597-603. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301850200>.
- Strosberg, J., G. El-Haddad, E. Wolin, A. Hendifar, J. Yao, B. Chasen, E. Mittra, et al. 2017. « Phase 3 Trial of ¹⁷⁷Lu-Dotatate for Midgut Neuroendocrine Tumors ». *The New England journal of medicine* 376 (2): 125-35. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1607427>.
- Strosberg, Jonathan, Ghassan El-Haddad, Edward Wolin, Andrew Hendifar, James Yao, Beth Chasen, Erik Mittra, et al. 2017. « Phase 3 Trial of ¹⁷⁷Lu-Dotatate for Midgut Neuroendocrine Tumors ». *New England Journal of Medicine* 376 (2): 125-35. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1607427>.
- Strosberg, Jonathan R., Martyn E. Caplin, Pamela L. Kunz, Philippe B. Ruzsniwski, Lisa Bodei, Andrew Hendifar, Erik Mittra, et al. 2021. « ¹⁷⁷Lu-Dotatate plus Long-Acting Octreotide versus High-dose Long-Acting Octreotide in Patients with Midgut Neuroendocrine Tumours (NETTER-1): Final Overall Survival and Long-Term Safety Results from an Open-Label, Randomised, Controlled, Phase 3 Trial ». *The Lancet. Oncology* 22 (12): 1752-63. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(21\)00572-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(21)00572-6).
- Strübbe, Gero, Christian Popp, Alexander Schmidt, Andrea Pauli, Leonie Ringrose, Christian Beisel, et Renato Paro. 2011. « Polycomb purification by in vivo biotinylation tagging reveals cohesin and Trithorax group proteins as interaction partners ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (14): 5572-77. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007916108>.
- Suga, Hirotaka, Hitomi Eto, Tomokuni Shigeura, Keita Inoue, Noriyuki Aoi, Harunosuke Kato, Satoshi Nishimura, Ichiro Manabe, Koichi Gonda, et Kotaro Yoshimura. 2009. « IFATS Collection:

- Fibroblast Growth Factor-2-Induced Hepatocyte Growth Factor Secretion by Adipose-Derived Stromal Cells Inhibits Postinjury Fibrogenesis Through a c-Jun N-Terminal Kinase-Dependent Mechanism ». *Stem Cells* 27 (1): 238-49. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0261>.
- Sugiyama, Tatsuki, Hiroshi Kohara, Mamiko Noda, et Takashi Nagasawa. 2006. « Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool by CXCL12-CXCR4 Chemokine Signaling in Bone Marrow Stromal Cell Niches ». *Immunity* 25 (6): 977-88. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.10.016>.
- Sui, Bing-Dong, Chen-Xi Zheng, Meng Li, Yan Jin, et Cheng-Hu Hu. 2020. « Epigenetic Regulation of Mesenchymal Stem Cell Homeostasis ». *Trends in Cell Biology* 30 (2): 97-116. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.11.006>.
- Sukoyan, M. A., S. Y. Vatolin, A. N. Golubitsa, A. I. Zhelezova, L. A. Semenova, et O. L. Serov. 1993. « Embryonic Stem Cells Derived from Morulae, Inner Cell Mass, and Blastocysts of Mink: Comparisons of Their Pluripotencies ». *Molecular Reproduction and Development* 36 (2): 148-58. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080360205>.
- Sukumar, Madhusudhanan, Jie Liu, Gautam U. Mehta, Shashank J. Patel, Rahul Roychoudhuri, Joseph G. Crompton, Christopher A. Klebanoff, et al. 2016. « Mitochondrial membrane potential identifies cells with enhanced stemness for cellular therapy ». *Cell metabolism* 23 (1): 63-76. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.11.002>.
- Sun, Bingbing, Long Wang, Wenmin Guo, Shixuan Chen, Yujie Ma, et Dongwei Wang. 2023. « New treatment methods for myocardial infarction ». *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcvm.2023.1251669>.
- Sun, Rongguo, et Liang Zhang. 2019. « Long Non-Coding RNA MALAT1 Regulates Cardiomyocytes Apoptosis after Hypoxia/Reperfusion Injury via Modulating miR-200a-3p/PDCD4 Axis ». *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 111 (mars): 1036-45. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.122>.
- Sun, Xinghui, Mohamed Sham Shihabudeen Haider Ali, et Matthew Moran. 2017. « The role of interactions of long non-coding RNAs and heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in regulating cellular functions ». *Biochemical Journal* 474 (17): 2925-35. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170280>.
- Takahashi, Kazutoshi, et Shinya Yamanaka. 2013. « Induced Pluripotent Stem Cells in Medicine and Biology ». *Development (Cambridge, England)* 140 (12): 2457-61. <https://doi.org/10.1242/dev.092551>.
- Takubo, Keiyo, Go Nagamatsu, Chiharu I. Kobayashi, Ayako Nakamura-Ishizu, Hiroshi Kobayashi, Eiji Ikeda, Nobuhito Goda, et al. 2013. « Regulation of Glycolysis by Pdk Functions as a Metabolic Checkpoint for Cell Cycle Quiescence in Hematopoietic Stem Cells ». *Cell Stem Cell* 12 (1): 49-61. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.10.011>.
- Tan, Jiang, Jun Lu, Wei Huang, Zhixiong Dong, Chenfei Kong, Lin Li, Lina Gao, Jianhua Guo, et Baiqu Huang. 2009. « Genome-Wide Analysis of Histone H3 Lysine9 Modifications in Human Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation ». *PloS One* 4 (8): e6792. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006792>.
- Tang, Chao, Jun Qi, Yan Wu, Ling Luo, Ying Wang, Yongzhong Wu, et Xiaolong Shi. 2022. « Improving the prediction for the response to radiotherapy of clinical tumor samples by using combinatorial model of MicroRNA expression ». *Frontiers in Genetics* 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2022.1069112>.
- Tao, Ying, Hongjie Zhang, Shiqi Huang, Lijuan Pei, Mengying Feng, Xiaodong Zhao, Zhaohui Ouyang, Su Yao, Rui Jiang, et Ke Wei. 2019. « miR-199a-3p Promotes Cardiomyocyte Proliferation by Inhibiting Cd151 Expression ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 516 (1): 28-36. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.05.174>.
- Taylor, Cormac T., et Sean P. Colgan. 2017. « Regulation of immunity and inflammation by hypoxia in immunological niches ». *Nature reviews. Immunology* 17 (12): 774-85. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.103>.
- Terman, Alexei, Tino Kurz, Marian Navratil, Edgar A. Arriaga, et Ulf T. Brunk. 2010. « Mitochondrial Turnover and Aging of Long-Lived Postmitotic Cells: The Mitochondrial-Lysosomal Axis Theory of Aging ». *Antioxidants & Redox Signaling* 12 (4): 503-35. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2598>.
- Tirpe, Alexandru Andrei, Diana Gulei, Stefana Maria Ciortea, Carmen Crivii, et Ioana Berindan-Neagoe. 2019. « Hypoxia: Overview on Hypoxia-Mediated Mechanisms with a Focus on the Role of HIF Genes ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (24): 6140. <https://doi.org/10.3390/ijms20246140>.
- « TNM Classification of Malignant Tumours, 8th Edition | UICC ». s. d. Consulté le 20 novembre 2023. <https://www.uicc.org/resources/tnm-classification-malignant-tumours-8th-edition>.

- Tögel, Florian, Kathleen Weiss, Ying Yang, Zhuma Hu, Ping Zhang, et Christof Westenfelder. 2007. « Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury ». *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 292 (5): F1626-35. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00339.2006>.
- Tondera, Daniel, Frank Czauderna, Katharina Paulick, Rolf Schwarzer, Jörg Kaufmann, et Ansgar Santel. 2005. « The Mitochondrial Protein MTP18 Contributes to Mitochondrial Fission in Mammalian Cells ». *Journal of Cell Science* 118 (Pt 14): 3049-59. <https://doi.org/10.1242/jcs.02415>.
- Trefely, Sophie, Claudia D. Lovell, Nathaniel W. Snyder, et Kathryn E. Wellen. 2020. « Compartmentalised Acyl-CoA Metabolism and Roles in Chromatin Regulation ». *Molecular Metabolism* 38 (août). <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.01.005>.
- Treijen, Mark J. C. van, Catharina M. Korse, Rachel S. van Leeuwen, Lisette J. Saveur, Menno R. Vriens, Wieke H. M. Verbeek, Margot E. T. Tesselaar, et Gerlof D. Valk. 2018. « Blood Transcript Profiling for the Detection of Neuroendocrine Tumors: Results of a Large Independent Validation Study ». *Frontiers in Endocrinology* 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2018.00740>.
- Tsutsui, Hiroyuki, Shintaro Kinugawa, et Shouji Matsushima. 2011. « Oxidative stress and heart failure ». *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 301 (6): H2181-90. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00554.2011>.
- Twig, Gilad, Alvaro Elorza, Anthony J. A. Molina, Hibo Mohamed, Jakob D. Wikstrom, Gil Walzer, Linsey Stiles, et al. 2008. « Fission and Selective Fusion Govern Mitochondrial Segregation and Elimination by Autophagy ». *The EMBO Journal* 27 (2): 433-46. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601963>.
- Uzielienė, Ilona, Eiva Bernotienė, Greta Rakauskienė, Jaroslav Denkovskij, Edvardas Bagdonas, Zygmunt Mackiewicz, Narunas Porvaneckas, Giedrius Kvederas, et Ali Mobasher. 2019. « The Antihypertensive Drug Nifedipine Modulates the Metabolism of Chondrocytes and Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells ». *Frontiers in Endocrinology* 10: 756. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00756>.
- Valente, Andrew J., Lucas A. Maddalena, Ellen L. Robb, Fereshteh Moradi, et Jeffrey A. Stuart. 2017. « A Simple ImageJ Macro Tool for Analyzing Mitochondrial Network Morphology in Mammalian Cell Culture ». *Acta Histochemica* 119 (3): 315-26. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2017.03.001>.
- Van Essen, Martijn, Eric P. Krenning, Marion De Jong, Roelf Valkema, et Dik J. Kwekkeboom. 2007. « Peptide Receptor Radionuclide Therapy with Radiolabelled Somatostatin Analogues in Patients with Somatostatin Receptor Positive Tumours ». *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)* 46 (6): 723-34. <https://doi.org/10.1080/02841860701441848>.
- Van Vranken, Jonathan G., Daniel K. Bricker, Noah Dephoure, Steven P. Gygi, James E. Cox, Carl S. Thummel, et Jared Rutter. 2014. « SDHAF4 Promotes Mitochondrial Succinate Dehydrogenase Activity and Prevents Neurodegeneration ». *Cell Metabolism* 20 (2): 241-52. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.05.012>.
- Vannini, Nicola, Mukul Girotra, Olaia Naveiras, Gennady Nikitin, Vasco Campos, Sonja Giger, Aline Roch, Johan Auwerx, et Matthias P. Lutolf. 2016. « Specification of Haematopoietic Stem Cell Fate via Modulation of Mitochondrial Activity ». *Nature Communications* 7 (1): 13125. <https://doi.org/10.1038/ncomms13125>.
- Vega, Rick B., Janice M. Huss, et Daniel P. Kelly. 2000. « The Coactivator PGC-1 Cooperates with Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α in Transcriptional Control of Nuclear Genes Encoding Mitochondrial Fatty Acid Oxidation Enzymes ». *Molecular and Cellular Biology* 20 (5): 1868-76. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC85369/>.
- Vengrenyuk, Yuliya, Hitoo Nishi, Xiaochun Long, Mireille Ouimet, Nazir Savji, Fernando O. Martinez, Courtney P. Cassella, et al. 2015. « Cholesterol Loading Reprograms the microRNA-143/145-Myocardin Axis to Convert Aortic Smooth Muscle Cells to a Dysfunctional Macrophage-like Phenotype ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 35 (3): 535-46. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304029>.
- Vercauteren, Kristel, Natalie Gleyzer, et Richard C. Scarpulla. 2008. « PGC-1-Related Coactivator Complexes with HCF-1 and NRF-2beta in Mediating NRF-2(GABP)-Dependent Respiratory Gene Expression ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (18): 12102-11. <https://doi.org/10.1074/jbc.M710150200>.
- Vercauteren, Kristel, Raymond A. Pasko, Natalie Gleyzer, Vita Maria Marino, et Richard C. Scarpulla. 2006. « PGC-1-Related Coactivator: Immediate Early Expression and Characterization of a CREB/NRF-1 Binding Domain Associated with Cytochrome c Promoter Occupancy and

- Respiratory Growth ». *Molecular and Cellular Biology* 26 (20): 7409-19. <https://doi.org/10.1128/MCB.00585-06>.
- Villena, Josep A., et Anastasia Kralli. 2008. « ERRα: a metabolic function for the oldest orphan ». *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 19 (8): 269-76. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2008.07.005>.
- Vilquin, Jean-Thomas, et Jessy Etienne. 2016. « Thérapies cellulaires des cardiopathies - Évolution du paradigme ». *médecine/sciences* 32 (novembre): 30-39. <https://doi.org/10.1051/medsci/201632s209>.
- Virani, Salim S., Alvaro Alonso, Emelia J. Benjamin, Marcio S. Bittencourt, Clifton W. Callaway, April P. Carson, Alanna M. Chamberlain, et al. 2020. « Heart Disease and Stroke Statistics—2020 Update: A Report From the American Heart Association ». *Circulation* 141 (9): e139-596. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000757>.
- Virbasius, J. V., C. A. Virbasius, et R. C. Scarpulla. 1993. « Identity of GABP with NRF-2, a Multisubunit Activator of Cytochrome Oxidase Expression, Reveals a Cellular Role for an ETS Domain Activator of Viral Promoters. » *Genes & Development* 7 (3): 380-92. <https://doi.org/10.1101/gad.7.3.380>.
- Wagers, Amy J, et Irving L Weissman. 2004. « Plasticity of Adult Stem Cells ». *Cell* 116 (5): 639-48. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00208-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00208-9).
- Wagner, Alexandra, Helena Kosnacova, Miroslav Chovanec, et Dana Jurkovicova. 2022. « Mitochondrial Genetic and Epigenetic Regulations in Cancer: Therapeutic Potential ». *International Journal of Molecular Sciences* 23 (14): 7897. <https://doi.org/10.3390/ijms23147897>.
- Walewska, Alicja, Adrian Janucik, Marlena Tynecka, Marcin Moniuszko, et Andrzej Eljaszewicz. 2023. « Mesenchymal Stem Cells under Epigenetic Control - the Role of Epigenetic Machinery in Fate Decision and Functional Properties ». *Cell Death & Disease* 14 (11): 720. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-06239-4>.
- Walker, Brittni R., et Carlos T. Moraes. 2022. « Nuclear-Mitochondrial Interactions ». *Biomolecules* 12 (3): 427. <https://doi.org/10.3390/biom12030427>.
- Wallace, Douglas C. 1999. « Mitochondrial diseases in man and mouse ». *Science (Wash. DC)*, 1482-88.
- Wang, Dan, Yanling Kuang, Guolong Zhang, Kan Xiao, et Yulan Liu. 2022. « Lysine-Specific Demethylase 1 in Energy Metabolism: A Novel Target for Obesity ». *The Journal of Nutrition* 152 (7): 1611-20. <https://doi.org/10.1093/jn/nxac080>.
- Wang, Hongyun, et George Oster. 1998. « Energy Transduction in the F1 Motor of ATP Synthase ». *Nature* 396 (6708): 279-82. <https://doi.org/10.1038/24409>.
- Wang, Kang, Huicong Liu, Qinchao Hu, Lingna Wang, Jiaqing Liu, Zikai Zheng, Weiqi Zhang, Jie Ren, Fangfang Zhu, et Guang-Hui Liu. 2022. « Epigenetic Regulation of Aging: Implications for Interventions of Aging and Diseases ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 7 (1): 374. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01211-8>.
- Wang, Xia, Xinxin Zhu, Li Shi, Jingjing Wang, Qing Xu, Baoqi Yu, et Aijuan Qu. 2023. « A time-series minimally invasive transverse aortic constriction mouse model for pressure overload-induced cardiac remodeling and heart failure ». *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcvm.2023.1110032>.
- Wang, Ying, Xiaodong Chen, Wei Cao, et Yufang Shi. 2014. « Plasticity of Mesenchymal Stem Cells in Immunomodulation: Pathological and Therapeutic Implications ». *Nature Immunology* 15 (11): 1009-16. <https://doi.org/10.1038/ni.3002>.
- Wasilewski, Michał, et Luca Scorrano. 2009. « The Changing Shape of Mitochondrial Apoptosis ». *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 20 (6): 287-94. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.03.007>.
- Weckbecker, Gisbert, Ian Lewis, Rainer Albert, Herbert A. Schmid, Daniel Hoyer, et Christian Bruns. 2003. « Opportunities in Somatostatin Research: Biological, Chemical and Therapeutic Aspects ». *Nature Reviews Drug Discovery* 2 (12): 999-1017. <https://doi.org/10.1038/nrd1255>.
- Wei, Xin, Xue Yang, Zhi-peng Han, Fang-fang Qu, Li Shao, et Yu-fang Shi. 2013. « Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy ». *Acta Pharmacologica Sinica* 34 (6): 747-54. <https://doi.org/10.1038/aps.2013.50>.
- Wellen, Kathryn E., Georgia Hatzivassiliou, Uma M. Sachdeva, Thi V. Bui, Justin R. Cross, et Craig B. Thompson. 2009. « ATP-Citrate Lyase Links Cellular Metabolism to Histone Acetylation ». *Science* 324 (5930): 1076-80. <https://doi.org/10.1126/science.1164097>.
- White, Roger, Daniel Morganstein, Mark Christian, Asha Seth, Birger Herzog, et Malcolm G. Parker. 2008. « Role of RIP140 in Metabolic Tissues: Connections to Disease ». *FEBS Letters* 582 (1): 39-45. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.11.017>.

- Wiese, Meike, et Andrew J. Bannister. 2020. « Two Genomes, One Cell: Mitochondrial-Nuclear Coordination via Epigenetic Pathways ». *Molecular Metabolism* 38 (août): 100942. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.01.006>.
- Willhoft, Oliver, et Dale B Wigley. 2020. « INO80 and SWR1 Complexes: The Non-Identical Twins of Chromatin Remodelling ». *Current Opinion in Structural Biology* 61 (avril): 50-58. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.09.002>.
- Williams, E. D., et M. Sandler. 1963. « The Classification of Carcinoid Tumours ». *Lancet (London, England)* 1 (7275): 238-39. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(63\)90951-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(63)90951-6).
- Wise, Andrea F., Timothy M. Williams, Mensiena B. G. Kiewiet, Natalie L. Payne, Christopher Siatskas, Chrishan S. Samuel, et Sharon D. Ricardo. 2014. « Human mesenchymal stem cells alter macrophage phenotype and promote regeneration via homing to the kidney following ischemia-reperfusion injury ». *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 306 (10): F1222-35. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00675.2013>.
- Wohlgemuth, Stephanie Eva, Arnold Young Seo, Emanuele Marzetti, Hazel Anne Lees, et Christiaan Leeuwenburgh. 2010. « Skeletal Muscle Autophagy and Apoptosis during Aging: Effects of Calorie Restriction and Life-Long Exercise ». *Experimental Gerontology* 45 (2): 138-48. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2009.11.002>.
- Wu, Yan-Lin, Zheng-Jun Lin, Chang-Chun Li, Xiao Lin, Su-Kang Shan, Bei Guo, Ming-Hui Zheng, Fuxingzi Li, Ling-Qing Yuan, et Zhi-Hong Li. 2023. « Epigenetic Regulation in Metabolic Diseases: Mechanisms and Advances in Clinical Study ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 8 (1): 98. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01333-7>.
- Xin, Hongqi, Yi Li, Yisheng Cui, James J. Yang, Zheng Gang Zhang, et Michael Chopp. 2013. « Systemic Administration of Exosomes Released from Mesenchymal Stromal Cells Promote Functional Recovery and Neurovascular Plasticity after Stroke in Rats ». *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 33 (11): 1711-15. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2013.152>.
- Yang, Chao, Mingjun Wu, Min You, Yu Chen, Maowen Luo, et Qiang Chen. 2021. « The therapeutic applications of mesenchymal stromal cells from human perinatal tissues in autoimmune diseases ». *Stem Cell Research & Therapy* 12 (février): 103. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02158-3>.
- Yang, Ruili, Tingting Yu, Xiaoxing Kou, Xiang Gao, Chider Chen, Dawei Liu, Yanheng Zhou, et Songtao Shi. 2018. « Tet1 and Tet2 Maintain Mesenchymal Stem Cell Homeostasis via Demethylation of the P2RX7 Promoter ». *Nature Communications* 9 (1): 2143. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04464-6>.
- Yang, Sheng-Li, Chao Wu, Zhi-Fan Xiong, et Xiefan Fang. 2015. « Progress on hypoxia-inducible factor-3: Its structure, gene regulation and biological function (Review) ». *Molecular Medicine Reports* 12 (2): 2411-16. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3689>.
- Yang, Tianyu, Xiaofen Miao, Zhanxiang Bai, Jian Tu, Shanshan Shen, Hui Niu, Wei Xia, Juan Wang, et Yongsheng Zhang. 2021. « A Novel mRNA-miRNA Regulatory Sub-Network Associated With Prognosis of Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma ». *Frontiers in Oncology* 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.593601>.
- Yang, Yang, Ying Luan, Qi Feng, Xing Chen, Bo Qin, Kai-Di Ren, et Yi Luan. 2022. « Epigenetics and Beyond: Targeting Histone Methylation to Treat Type 2 Diabetes Mellitus ». *Frontiers in Pharmacology* 12 (janvier): 807413. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.807413>.
- Yang, Yanmeng, Eng Hin Lee, et Zheng Yang. 2022. « Hypoxia-Conditioned Mesenchymal Stem Cells in Tissue Regeneration Application ». *Tissue Engineering. Part B, Reviews* 28 (5): 966-77. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2021.0145>.
- Yang, Yi, Xiaotong Yin, Huirong Yang, et Yanhui Xu. 2015. « Histone Demethylase LSD2 Acts as an E3 Ubiquitin Ligase and Inhibits Cancer Cell Growth through Promoting Proteasomal Degradation of OGT ». *Molecular Cell* 58 (1): 47-59. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.038>.
- Yao, James C., Manal Hassan, Alexandria Phan, Cecile Dagohoy, Colleen Leary, Jeannette E. Mares, Eddie K. Abdalla, et al. 2008. « One Hundred Years After "Carcinoid": Epidemiology of and Prognostic Factors for Neuroendocrine Tumors in 35,825 Cases in the United States ». *Journal of Clinical Oncology* 26 (18): 3063-72. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.4377>.
- Yao, Qian, Yuqi Chen, et Xiang Zhou. 2019. « The roles of microRNAs in epigenetic regulation ». *Current Opinion in Chemical Biology, Chemical Genetics and Epigenetics • Molecular Imaging*, 51 (août): 11-17. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.01.024>.

- Yin, James Q., Jun Zhu, et James A. Ankrum. 2019. « Manufacturing of Primed Mesenchymal Stromal Cells for Therapy ». *Nature Biomedical Engineering* 3 (2): 90-104. <https://doi.org/10.1038/s41551-018-0325-8>.
- Ylä-Herttuala, Seppo, et Andrew H. Baker. 2017. « Cardiovascular Gene Therapy: Past, Present, and Future ». *Molecular Therapy* 25 (5): 1095-1106. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.03.027>.
- Yong, Cheryl Qian Ying, et Bor Luen Tang. 2018. « A Mitochondrial Encoded Messenger at the Nucleus ». *Cells* 7 (8): 105. <https://doi.org/10.3390/cells7080105>.
- Young, Matthew D., Tracy A. Willson, Matthew J. Wakefield, Evelyn Trounson, Douglas J. Hilton, Marnie E. Blewitt, Alicia Oshlack, et Ian J. Majewski. 2011. « ChIP-Seq Analysis Reveals Distinct H3K27me3 Profiles That Correlate with Transcriptional Activity ». *Nucleic Acids Research* 39 (17): 7415-27. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr416>.
- Yu, Rui, Yan Zhang, Mihail Barboiu, Marie Maumus, Danièle Noël, Christian Jorgensen, et Suming Li. 2020. « Biobased pH-responsive and self-healing hydrogels prepared from O-carboxymethyl chitosan and a 3-dimensional dynamer as cartilage engineering scaffold ». *Carbohydrate Polymers* 244 (septembre): 116471. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116471>.
- Yu, Xi-Yong, Yong-Jian Geng, Jia-Liang Liang, Saidan Zhang, He-Ping Lei, Shi-Long Zhong, Qiu-Xiong Lin, Zhi-Xin Shan, Shu-Guang Lin, et Yangxin Li. 2012. « High Levels of Glucose Induce "Metabolic Memory" in Cardiomyocyte via Epigenetic Histone H3 Lysine 9 Methylation ». *Molecular Biology Reports* 39 (9): 8891-98. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-1756-z>.
- Yucel, Nora, Yu Xin Wang, Thach Mai, Ermelinda Porpiglia, Peder J. Lund, Glenn Markov, Benjamin A. Garcia, Sean C. Bendall, Michael Angelo, et Helen M. Blau. 2019. « Glucose Metabolism Drives Histone Acetylation Landscape Transitions that Dictate Muscle Stem Cell Function ». *Cell Reports* 27 (13): 3939-3955.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.092>.
- Zakrzewski, Wojciech, Maciej Dobrzyński, Maria Szymonowicz, et Zbigniew Rybak. 2019. « Stem cells: past, present, and future ». *Stem Cell Research & Therapy* 10 (1): 68. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>.
- Zhang, Bin, Yijun Yin, Ruenn Chai Lai, Soon Sim Tan, Andre Boon Hwa Choo, et Sai Kiang Lim. 2014. « Mesenchymal Stem Cells Secrete Immunologically Active Exosomes ». *Stem Cells and Development* 23 (11): 1233-44. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0479>.
- Zhang, Cheng-Liang, Ting Huang, Bi-Li Wu, Wen-Xi He, et Dong Liu. 2017. « Stem cells in cancer therapy: opportunities and challenges ». *Oncotarget* 8 (43): 75756-66. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20798>.
- Zhang, Huafeng, Ping Gao, Ryo Fukuda, Ganesh Kumar, Balaji Krishnamachary, Karen I. Zeller, Chi V. Dang, et Gregg L. Semenza. 2007. « HIF-1 Inhibits Mitochondrial Biogenesis and Cellular Respiration in VHL-Deficient Renal Cell Carcinoma by Repression of C-MYC Activity ». *Cancer Cell* 11 (5): 407-20. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.04.001>.
- Zhang, Jie, Dong Li, Yueming Zhang, Zongli Ding, Yulong Zheng, Song Chen, et Yufeng Wan. 2020. « Integrative analysis of mRNA and miRNA expression profiles reveals seven potential diagnostic biomarkers for non-small cell lung cancer ». *Oncology Reports* 43 (1): 99-112. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7407>.
- Zhang, Jin, Ivan Khvorostov, Jason S Hong, Yavuz Oktay, Laurent Vergnes, Esther Nuebel, Paulin N Wahjudi, et al. 2011. « UCP2 regulates energy metabolism and differentiation potential of human pluripotent stem cells ». *The EMBO Journal* 30 (24): 4860-73. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.401>.
- Zhang, Jin, Sutteera Ratanasirintrao, Sriram Chandrasekaran, Zhaoting Wu, Scott B. Ficarro, Chunxiao Yu, Christian A. Ross, et al. 2016. « LIN28 Regulates Stem Cell Metabolism and Conversion to Primed Pluripotency ». *Cell Stem Cell* 19 (1): 66-80. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.05.009>.
- Zhao, J., F. Du, G. Shen, F. Zheng, et B. Xu. 2015. « The Role of Hypoxia-Inducible Factor-2 in Digestive System Cancers ». *Cell Death & Disease* 6 (1): e1600. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.565>.
- Zhao, Ru-Zhou, Shuai Jiang, Lin Zhang, et Zhi-Bin Yu. 2019. « Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review) ». *International Journal of Molecular Medicine* 44 (1): 3-15. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4188>.
- Zhao, Yi, Jiawei He, Tao Qiu, Haoyu Zhang, Li Liao, et Xiaoxia Su. 2022. « Epigenetic therapy targeting bone marrow mesenchymal stem cells for age-related bone diseases ». *Stem Cell Research & Therapy* 13 (1): 201. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02852-w>.
- Zhao, Yingming, et Benjamin A. Garcia. 2015. « Comprehensive Catalog of Currently Documented Histone Modifications ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7 (9): a025064. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025064>.

- Zhao, Zhuo, Wei Sun, Ziyuan Guo, Jichang Zhang, Hongyu Yu, et Bin Liu. 2020. « Mechanisms of lncRNA/microRNA interactions in angiogenesis ». *Life Sciences* 254 (août): 116900. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116900>.
- Zheng, Yi-Chao, Zhe-Sheng Chen, Ying Liu, et Hong-Min Liu. 2016. « TCPs: privileged scaffolds for identifying potent LSD1 inhibitors for cancer therapy ». *Epigenomics* 8 (avril): 651-66. <https://doi.org/10.2217/epi-2015-0002>.
- Zheng, Yi-Chao, Jinlian Ma, Zhiru Wang, Jinfeng Li, Bailing Jiang, Wenjuan Zhou, Xiaojing Shi, Xixin Wang, Wen Zhao, et Hong-Min Liu. 2015. « A Systematic Review of Histone Lysine-Specific Demethylase 1 and Its Inhibitors ». *Medicinal Research Reviews* 35 (5): 1032-71. <https://doi.org/10.1002/med.21350>.
- Zhong, Wei, Bo Li, Yao Xu, Ping Yang, Rui Chen, Zhongqun Wang, Chen Shao, Juan Song, et Jinchuan Yan. 2018. « Hypermethylation of the Micro-RNA 145 Promoter Is the Key Regulator for NLRP3 Inflammasome-Induced Activation and Plaque Formation ». *JACC: Basic to Translational Science* 3 (5): 604-24. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2018.06.004>.
- Zhu, Ling-Ping, Tian Tian, Jun-Yao Wang, Jing-Ni He, Tong Chen, Miao Pan, Li Xu, et al. 2018. « Hypoxia-elicited mesenchymal stem cell-derived exosomes facilitates cardiac repair through miR-125b-mediated prevention of cell death in myocardial infarction ». *Theranostics* 8 (22): 6163-77. <https://doi.org/10.7150/thno.28021>.
- Zimmermann, Nadine, Juliana Knief, Tim Kacprowski, Pamela Lazar-Karsten, Tobias Keck, Franck Billmann, Sebastian Schmid, et al. 2018. « MicroRNA Analysis of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors and Metastases ». *Oncotarget* 9 (47): 28379. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25357>.
- Zwan, W. A. van der, T. Brabander, B. L. R. Kam, J. J. M. Teunissen, R. A. Feelders, J. Hofland, E. P. Krenning, et W. W. de Herder. 2019. « Salvage Peptide Receptor Radionuclide Therapy with [177Lu-DOTA,Tyr3]Octreotate in Patients with Bronchial and Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumours ». *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 46 (3): 704-17. <https://doi.org/10.1007/s00259-018-4158-1>.

PROJETS ANNEXES

TARGETED NEXT-GENERATION SEQUENCING OF CONGENITAL HYPOTHYROIDISM-CAUSATIVE GENES REVEALS UNEXPECTED THYROGLOBULIN GENE VARIANTS IN PATIENTS WITH IODIDE TRANSPORT DEFECT

Carlos Eduardo Bernal Barquero ^{1,2} , Romina Celeste Geysels ^{1,2}, Virginie Jacques ^{3,4}, Gerardo Hernán Carro ^{1,2} , Mariano Martín ^{1,2}, Victoria Peyret ^{1,2,†}, María Celeste Abregú ^{1,2}, Patricia Pappendieck ^{5,6}, Ana María Masini-Repiso ^{1,2}, Frédérique Savagner ^{3,4}, Ana Elena Chiesa ^{5,6}, Cintia E. Citterio ^{7,8} and Juan Pablo Nicola ^{1,2}

¹ Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba 5000, Argentina

² Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CIBICI-CONICET), Córdoba 5000, Argentina

³ Laboratoire de Biochimie, Institut Fédératif de Biologie, Le Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, 31300 Toulouse, France

⁴ Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) UMR 1297, 31432 Toulouse, France

⁵ División de Endocrinología, Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez, Buenos Aires 1006, Argentina

⁶ Centro de Investigaciones Endocrinológicas Dr. César Bergadá, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CEDIE-CONICET), Buenos Aires 1120, Argentina

⁷ Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (INIGEM-CONIET), Buenos Aires 1120, Argentina

⁸ Division of Metabolism, Endocrinology and Diabetes, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, MI 48109, USA

CONTEXTE

Ce travail collaboratif sur neuf enfants présentant **une** hypothyroïdie congénitale glande en place nous a permis d'identifier différents variants dans le gène de la thyroglobuline sous une forme hétérozygote ou hétérozygote composite ce qui est inhabituel devant une maladie de transmission récessive concernant le gène de la thyroglobuline.

La conséquence fonctionnelle de ce type de transmission n'a jamais été explorée.

L'approche *in silico* pour un variant d'épissage ou par analyse fonctionnelle dans un modèle de culture cellulaire (HEK-293T) de deux nouveaux variants de la thyroglobuline (c.177-2A>C et c. 7688A>G) nous a permis d'identifier l'impact de variants hétérozygotes sur la conformation ou la sécrétion de la protéine.

Ceci permet de souligner l'intérêt de l'identification de variants hétérozygotes dans l'exploration des gènes habituellement décrits pour être impliqués dans les formes récessives des hypothyroïdies congénitales glande en place.



Article

Targeted Next-Generation Sequencing of Congenital Hypothyroidism-Causative Genes Reveals Unexpected Thyroglobulin Gene Variants in Patients with Iodide Transport Defect

Carlos Eduardo Bernal Barquero ^{1,2}, Romina Celeste Geysels ^{1,2}, Virginie Jacques ^{3,4}, Gerardo Hernán Carro ^{1,2}, Mariano Martín ^{1,2}, Victoria Peyret ^{1,2,4}, María Celeste Abregú ^{1,2}, Patricia Papendieck ^{5,6}, Ana María Masini-Repiso ^{1,2}, Frédérique Savagner ^{3,4}, Ana Elena Chiesa ^{5,6}, Cintia E. Citterio ^{7,8} and Juan Pablo Nicola ^{1,2,*}



Citation: Bernal Barquero, C.E.; Geysels, R.C.; Jacques, V.; Carro, G.H.; Martín, M.; Peyret, V.; Abregú, M.C.; Papendieck, P.; Masini-Repiso, A.M.; Savagner, F.; et al. Targeted Next-Generation Sequencing of Congenital Hypothyroidism-Causative Genes Reveals Unexpected Thyroglobulin Gene Variants in Patients with Iodide Transport Defect. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 9251. <https://doi.org/10.3390/ijms23169251>

Academic Editor: Giovanni Vitale and Maurizio DeRocchis

Received: 4 July 2022

Accepted: 8 August 2022

Published: 17 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba 5000, Argentina
 - ² Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CIBICI-CONICET), Córdoba 5000, Argentina
 - ³ Laboratoire de Biochimie, Institut Fédératif de Biologie, Le Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, 31300 Toulouse, France
 - ⁴ Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) UMR 1297, 31432 Toulouse, France
 - ⁵ División de Endocrinología, Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez, Buenos Aires 1006, Argentina
 - ⁶ Centro de Investigaciones Endocrinológicas Dr. César Bergadá, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CEDIE-CONICET), Buenos Aires 1120, Argentina
 - ⁷ Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (INIGEM-CONICET), Buenos Aires 1120, Argentina
 - ⁸ Division of Metabolism, Endocrinology and Diabetes, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, MI 48109, USA
- * Correspondence: juan.nicola@unc.edu.ar; Tel: +54-0351-535-3850 (ext. 55423)
† Current address: Hospital de Endocrinología y Metabolismo Dr. Arturo Onativia, Salta 4400, Argentina.

Abstract: Congenital iodide transport defect is an uncommon autosomal recessive disorder caused by loss-of-function variants in the sodium iodide symporter (NIS)-coding *SLC5A5* gene and leading to dyshormonogenic congenital hypothyroidism. Here, we conducted a targeted next-generation sequencing assessment of congenital hypothyroidism-causative genes in a cohort of nine unrelated pediatric patients suspected of having a congenital iodide transport defect based on the absence of ^{99m}Tc-pertechnetate accumulation in a eutopic thyroid gland. Although, unexpectedly, we could not detect pathogenic *SLC5A5* gene variants, we identified two novel compound heterozygous TG gene variants (p.Q29* and c.177-2A>C), three novel heterozygous TG gene variants (p.F1542Vfs*20, p.Y2563C, and p.S523P), and a novel heterozygous *DUOX2* gene variant (p.E1496Dfs*51). Splicing minigene reporter-based in vitro assays revealed that the variant c.177-2A>C affected normal TG pre-mRNA splicing, leading to the frameshift variant p.T59Sfs*17. The frameshift TG variants p.T59Sfs*17 and p.F1542Vfs*20, but not the *DUOX2* variant p.E1496Dfs*51, were predicted to undergo nonsense-mediated decay. Moreover, functional in vitro expression assays revealed that the variant p.Y2563C reduced the secretion of the TG protein. Our investigation revealed unexpected findings regarding the genetics of congenital iodide transport defects, supporting the existence of yet to be discovered mechanisms involved in thyroid hormonogenesis.

Keywords: congenital hypothyroidism; thyroid dyshormonogenesis; iodide transport defect; sodium iodide symporter; thyroglobulin

1. Introduction

Congenital hypothyroidism, the most frequent inborn disorder detected in newborn screening programs, is a dysfunction of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis that is present at birth, resulting in thyroid hormone deficiency [1]. Although iodine deficiency remains the leading cause of hypothyroidism at birth, in iodide-sufficient areas, over 65% of these patients present abnormalities in thyroid organogenesis (dysgenesis), with the remaining 35% of the patients developing eutopic thyroid glands with impaired thyroid hormonogenesis (dys hormonogenesis) [2]. Recent consensus guidelines from the European Reference Network on Rare Endocrine Conditions recommend molecular diagnosis using next-generation sequencing in order to explore the genetic basis of the disease, as well as facilitating an interdisciplinary follow-up of the patients and guaranteeing the provision of adequate genetic counseling to the families [3].

Current consensus guidelines also recommend that after the identification of the disease in neonatal screening, the biochemical confirmatory diagnosis should be followed by complementary biochemical and imaging studies to obtain a better understanding of the underlying etiology of the disease [3], in particular by using Sanger sequencing-based approaches to evaluate the sequence of candidate genes. The general clinical presentation of congenital iodide transport defect, an autosomal recessive disorder due to impaired iodide accumulation in the thyroid follicular cell, includes a variable degree of hypothyroidism, reduced to absent radioiodide accumulation in a normal to hyperplastic eutopic thyroid gland, a low saliva-to-plasma iodide ratio, and normal to increased thyroglobulin (TG) serum levels [4–7].

Since iodine is a crucial component of thyroid hormones, iodide accumulation in the thyroid follicular cell constitutes a critical requirement for thyroid hormonogenesis [8]. The sodium/iodide symporter (NIS) is the basolateral plasma membrane glycoprotein involved in the accumulation of iodide into the thyroid follicular cell [9]. The carboxy-terminus of this protein, which is oriented towards the cytoplasm, contains the specific sorting and retention signals required for NIS expression at the basolateral plasma membrane [10–12]. Over thirty pathogenic variants in the NIS-coding *SLC5A5* gene have been reported in patients with dys hormonogenic congenital hypothyroidism. The functional characterization of loss-of-function NIS variants identified in patients has provided mechanistic information about the transporter [9]. Given the relevance of NIS in thyroid physiology, we recently developed a machine learning-based NIS-specific variant classifier with the aim of improving the prediction of the pathogenicity of missense NIS variants [13].

Here, using targeted next-generation sequencing, we investigated the presence of pathogenic variants in the *SLC5A5* gene in a cohort of nine pediatric patients with dys hormonogenic congenital hypothyroidism, suspected of being due to an iodide transport defect based on the absence of ^{99m}Tc-pertechnetate accumulation in the thyroid gland. Unexpectedly, we could not identify any pathogenic *SLC5A5* gene variants. Therefore, we extended our analysis to a comprehensive panel of 16 other known causative congenital hypothyroidism genes. Surprisingly, we identified two novel compound heterozygous *TG* gene variants (p.Q29* and c.177-2A>C), three novel heterozygous *TG* gene variants (p.F1542Vfs*20, p.Y2563C, and p.S523P), and a novel heterozygous *DUOX2* gene variant (p.E1496Dfs*51). A functional in vitro characterization using splicing minigene reporter assays revealed that the c.177-2A>C variant caused exon 3 skipping during the pre-mRNA splicing process, leading to the *TG* pathogenic variant p.T595fs*17. Moreover, functional in vitro expression assays suggested that the variant p.Y2562C causes a defect in the secretion of *TG* polypeptides, thus resulting in a reduced export of the protein toward the colloid for thyroid hormonogenesis. Remarkably, the frameshift *TG* variants p.T595fs*17 and p.F1542Vfs*20, but not the *DUOX2* variant p.E1496Dfs*51, were predicted to undergo degradation by nonsense-mediated decay. In conclusion, our investigation revealed unexpected findings regarding the genetic and phenotypes of congenital iodide transport defects, suggesting the existence of yet to be discovered mechanisms being involved in thyroid hormonogenesis.

2. Results

2.1. Clinical, Biochemical and Imaging Characteristics of the Study Cohort

The study recruited a cohort of nine patients with permanent congenital hypothyroidism and suspected of iodide transport defect based on non-detectable ^{99m}Tc -pertechnetate uptake in a eutopic non-goitrous thyroid gland (Table 1). All patients were detected through newborn screening for congenital hypothyroidism using TSH levels (Table 1). Confirmatory thyroid function tests showed increased TSH and reduced total and free T4 serum levels. TG serum levels were mostly found to be in the normal range, and all patients tested negative for thyroid autoantibodies (Table 1).

Table 1. Summary of biochemical, imaging, and molecular findings.

Patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Neonatal screening									
Age (days)	20	3	30	6	20	2	30	3	15
TSH (<10 mU/L)	>200	190	>100	157	>100	>100	>100	>100	>100
Biochemical analysis									
Age (days)	37	15	50	27	22	12	43	15	21
TSH (0.8–7.8 µg/dL)	>200	193	>100	372	>100	290	>100	170	>100
T ₄ (6–16.5 µg/dL)	2.6	0.4	0.4	1.4	0.4	1.6	0.4	2.8	3.5
Free T ₄ (1–2.1 ng/dL)	-	0.3	-	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.4
T ₃ (100–310 ng/dL)	-	73	32	35	19	57	-	94	-
TG (6–83 ng/mL)	-	65	50	12	60	14	1.8	46	22
Anti-TPO/TG antibodies	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Imaging studies									
Ultrasonography	Eu	Eu	Eu	Eu	Eu	Eu	Eu	Eu	Eu
^{99m}Tc -pertechnetate scintigraphy (thyroid)	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
^{99m}Tc -pertechnetate scintigraphy (salivary glands)	Nd	Nd	Po	Po	Po	-	Po	Po	-
Molecular diagnosis									
Gene variant	TG p.Q29* c.177-2A>C	TG p.F1542V/s*20	TG p.Y2563C	DUOX2 p.E1496D/s*51	TG p.S523P				

Abbreviations: Eu: Euthyroid. Po: Positive. Nd: Non-detectable. (-): Data not available.

2.2. Genetic Analysis of Congenital Hypothyroidism Using Targeted Next-Generation Sequencing

Based on the radionuclide scintigraphy analysis revealing non-detectable ^{99m}Tc -pertechnetate uptake in the thyroid gland, we explored the presence of pathogenic *SLC5A5* gene variants using targeted next-generation sequencing. Unexpectedly, pathogenic *SLC5A5* gene variants were not detected. Interestingly, a radionuclide imaging of the salivary glands revealed an unexpected classification of the patient phenotype into two groups; patients with detectable (thyroid iodide transport defect) or non-detectable (complete iodide transport defect) ^{99m}Tc -pertechnetate uptake (Table 1). Patients with congenital iodide transport defects caused by pathogenic *SLC5A5* gene variants do not accumulate iodide either in the thyroid or in the salivary gland, as NIS-mediated iodide transport is impaired [14,15].

Next, we extended our analysis to a comprehensive panel of 16 other known causative congenital hypothyroidism genes. Targeted next-generation sequencing analysis revealed novel compound heterozygous (p.Q29* and c.177-2A>C) and heterozygous (p.F1542V/s*20) *TG* gene variants in patients with a complete iodide transport defect phenotype (Table 1). Moreover, the sequencing analysis revealed novel heterozygous *TG* gene variants (p.Y2563C and p.S523P) and *DUOX2* gene variants (p.E1496D/s*51) in patients with a thyroid iodide transport defect phenotype (Table 1).

The variant prioritization pipeline led to the absence of significant variants in any of the sequenced genes in four patients of the study cohort (Table 1). Among these patients, two revealed thyroid iodide transport defects and two were not classified, as no record of ^{99m}Tc -pertechnetate scintigraphy in the salivary glands was available.

2.3. In Silico Analysis of Variants Identified in Congenital Hypothyroidism-Causative Genes

Although not associated with congenital hypothyroidism, the TG variants p.Q29*, p.Y2563C and p.S523P have been reported in the Single Nucleotide Polymorphism database in heterozygosis, which showed a minor allele frequency of less than 1% (rare variants) according to The Genome Aggregation Database (Table 2). Nonsense (p.Q29* TG) variants and frameshift variants leading to premature stop codons (p.F1542Vfs*20 TG and p.E1496Dfs*51 DUOX2) were considered to be pathogenic. The algorithm NMDescPredictor [16] predicted that the transcript encoding the frameshift TG variant p.F1542Vfs*20, but not the DUOX2 variant p.E1496Dfs*51, undergoes degradation by nonsense-mediated decay. Moreover, an in silico analysis of missense TG variants using prediction algorithms revealed that p.S523P is benign, whereas p.Y2563C is pathogenic (Table 2).

Table 2. Overview of genetic variants and in silico analysis of missense variants.

Gene	Nucleotide Variant	Protein Variant	SNP	Allele Frequency gnomAD	In Silico Analysis			ACMG Guideline
					SIFT	PolyPhen-2	MetaLR	
TG	c.85C>T	p.Q29*	rs1554648860	0.0000007				PVS1, PM2, PM3, PM4 (Pathogenic)
TG	c.177-2A>C	p.Y59Sfs*17						PVS1, PS3, PM2, PM3, PP3 (Pathogenic)
TG	c.4623_4624insG	p.F1542Vfs*20						PVS1, PM2 (Pathogenic)
TG	c.7688A>G	p.Y2563C	rs368587657	0.0000318	0	0.995	0.586	PM2, PP3 (Uncertain significance)
TG	c.1567T>C	p.S523P	rs116062097	0.001536	0.06	0.026	0.222	BS1, BP4 (Likely benign)
DUOX2	c.4487_4488insC	p.E1496Dfs*51						PVS1, PM2 (Pathogenic)

In silico predictions were carried out using SIFT (score: 1 = tolerated, 0 = deleterious), PolyPhen-2 (score: 0 = benign, 1 = probably damaging), and MetaLR (score: 0 = tolerated, 1 = damaging). Pathogenic scores are indicated in bold. Abbreviations: SNP, Single Nucleotide Polymorphism. gnomAD, Genome Aggregation Database. SIFT, Sorting Intolerant from Tolerant. Polyphen-2, Polymorphism Phenotypic version 2. ACMG, American College of Medical Genetics.

All TG variants were mapped in the primary structure of the human TG monomer (Figure 1A). The variant p.Q29* is adjacent to the type 1 TG-like repeat A, where the variant p.T59Sfs*17 (protein product of c.177-2A>C, see below) is located, with the variant p.S523P being located in the linker domain spacing type 1 TG-like repeats D and F (domain E) within the amino-terminal domain (NTD). Recently, the functional characterization of the missense variant p.L571P revealed the relevance of the linker domain in the intracellular trafficking of TG [17]. The variant p.F1542Vfs*20 is located in the type-1 repeat P within the arm domain, while the variant p.Y2563C is located in the homodimerization carboxy-terminal V domain, also known as the choline esterase-like (ChEL) domain. The ChEL domain is known to be determinant for TG intracellular trafficking along the apical secretory pathway to the follicular lumen, where thyroid hormonogenesis occurs [18,19].

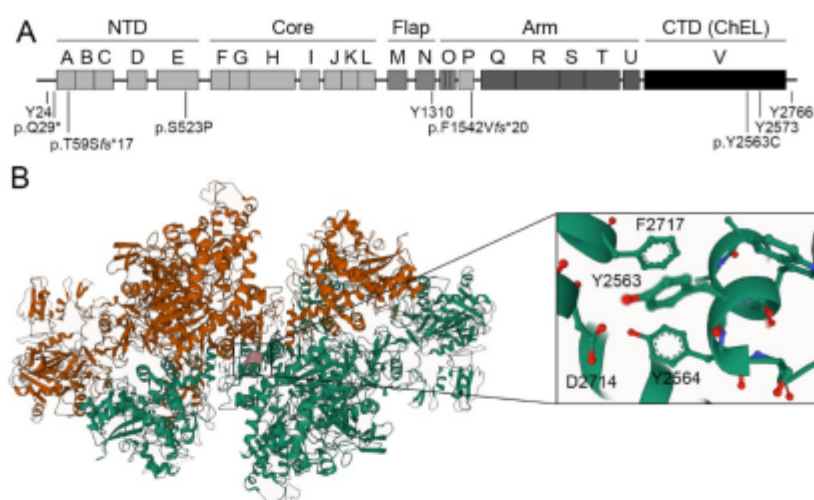


Figure 1. Schematic representation of detected TG variants. **(A)** Representation of TG variants in the primary structure of the human TG monomer. In the context of the 3D structure, the monomer of TG was divided into five regions: the amino-terminal domain (NTD), and the core, flap, arm, and carboxy-terminal domains (CTD), corresponding to the dimeric choline esterase-like domain (ChEL). Primary sequence-based internal homology domains named type 1, 2, and 3 TG-like repeats, as well as the ChEL domain are labeled as A to V. The hormonogenic tyrosines Y24, Y1310, Y2573, and Y2766 are indicated. **(B)** Representation of the residue p.Y2563C (colored in pink) in one monomer of the cryo-electron microscopy structure of TG homodimer (PDB ID 6SCJ). Monomers are displayed in orange and green. Close-up view of the structure showing Y2563-interacting residues Y2564, D2714 and F2717.

Recently, the cryo-electron microscopy 3D structure of the human TG dimer has revealed that the monomers are intertwined, with each monomer being entangled and revolving around the central ChEL dimer that interacts with the Arm and Core domains of the same monomer, and with the NTD of the partner monomer involving the E domain [20,21]. Using the web-based molecular visualization Mol* Viewer platform [22], we observed that the residue Y2563 was located in a short alpha-helix stretch in the ChEL dimer interface, forming a putative non-covalent intramonomeric hydrogen-bond interaction with D2714 and also pi-stacking interactions with Y2564 and F2717 (Figure 1B). The presence of cysteine residue at position 2563 may not only disrupt intramonomeric molecular interactions, but also reorder the complex disulfide bond network, thereby having an effect on the overall folding of the protein.

2.4. The Pathogenic Variant *c.177-2A>C* Impairs Normal TG Pre-Messenger RNA Splicing

In silico analysis using splicing prediction algorithms revealed that the variant *c.177-2A>C*, located in the canonical splicing acceptor site at the boundary of TG intron 2 and exon 3, had a deleterious effect on normal TG pre-messenger RNA splicing (Table 3). To assess the impact of the variant *c.177-2A>C*, pSPL3-based minigenes were generated and functionally tested in transiently transfected HeLa cells (Figure 2A). The wild-type (WT) minigene generated a major transcript of 470 bp compatible with the canonical spliced transcript including exons 2 and 3 (α splicing product), and also a minor transcript of 372 bp compatible with a partially spliced transcript including exon 2 alone (β splicing product) (Figure 2B). In contrast, minigene assays revealed that the variant *c.177-2A>C* generated only one transcript of 372 bp compatible with the skipping of exon 3 (γ splicing product). As expected, the empty reporter vector generated a transcript of 263 bp (γ splicing

product) (Figure 2B). Sanger sequencing confirmed the identity of all these PCR products (Figure 2C). Significantly, the variant c.177-2A>C changed the open reading frame of the transcript and generated a downstream premature translation stop codon, leading to the TG pathogenic variant p.T59Sfs*17. The algorithm NMDescPredictor [16] predicted that the transcript encoding the frameshift variant p.T59Sfs*17 is subjected to degradation by nonsense-mediated decay.

Table 3. In silico analysis of the variant c.177-2A>C TG.

Variant	Sequence	NNSplice (0–1)	HSF (0–100)	MES (0–16)	ASSP ≥4.5
WT	cctcagGAC	0.93	94.22	9.4	9.878
c.177-2A>C	cctcggGAC	0 (deleterious)	65.28 (deleterious)	1.36 (deleterious)	0 (deleterious)

The variant c.177-2A>C, located at position -2 in the splice acceptor site of intron 2 (lowercase) of the TG gene, is underlined. The exon 3 sequence is shown in capital letters. Scores obtained for WT and the c.177-2A>C splice acceptor site using the indicated software are shown. For each software, the scale range is indicated in parentheses. A deleterious effect of the variant is predicted if the change in variation is greater than 15% relative to WT (% variation = [(variant score – WT score)/WT score] × 100). Abbreviations: NNSplice, Splice Site Prediction by Neural Network; HSF, Human Splicing Finder; MES, MaxEntScan; ASSP, Alternative Splice Site Predictor.

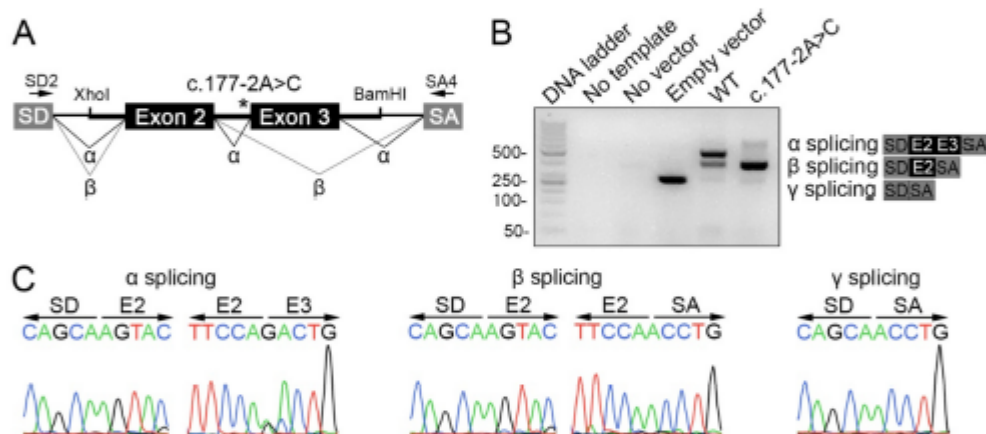


Figure 2. The variant c.177-2A>C causes exon 3 skipping during TG pre-mRNA splicing. (A) Scheme of pSPL3-based minigenes used in functional assays. The genomic fragment containing exons 2 (109 bp) and 3 (98 bp) along with a portion of the flanking introns 1 and 3 (247 and 236 bp, respectively), and the spacing intron 2 (1505 bp) was cloned in the multiple cloning site engineered within the single intron spanning splice donor (SD) and acceptor (SA) exons using the XhoI and BamHI restriction sites. Asterisk indicates the position of the variant c.177-2A>C. Arrows show the pSPL3 vector SD and SA exon-specific primers (SD2 and SA4) used in the RT-PCR analysis. Canonical (α) and aberrant (β) splicing products are indicated. (B) Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products from non-transfected (no vector) and empty, WT or c.177-2A>C pSPL3 minigenes transiently transfected into HeLa cells. In the negative PCR control, cDNA was replaced by nuclease-free water. The empty pSPL3 vector, where only SD-SA exon splicing occurred, led to a 263 bp PCR product (92 bp from exon SD and 171 bp from exon SA) (γ splicing). The WT pSPL3 minigene yielded a 470 bp PCR product including SD-SA exons flanking the exons 2 and 3 of the TG gene (α splicing). The c.177-2A>C pSPL3 minigene led to a PCR product of 372 bp including SD-SA exons flanking exon 2 alone (β splicing). The schemes represent the sequence of α, β and γ splicing RT-PCR products. (C) Sequencing analysis confirmed the sequence of α, β and γ splicing RT-PCR products.

2.5. The Variant p.Y2563C Reduces TG Secretion

In order to assess the pathogenicity of the TG variant p.Y2563C, we conducted functional assays in the HEK-293T cells, which do not express TG endogenously. HEK-293T cells were transiently transfected with an empty expression vector (Mock) or expression vectors encoding full-length mouse WT or p.Y2562C TG (equivalent to p.Y2563C in human TG). Western blot analysis revealed an expected specific band for TG with a molecular mass corresponding to ~330 kDa both in the cell lysate and in the supernatant, denoting TG expression and secretion, respectively (Figure 3A) [17,23]. In contrast, p.Y2562C TG protein expression in the cell lysate and its secretion to the supernatant was significantly reduced compared to WT TG (Figure 3B). In addition, we conducted a flow cytometry analysis to assess TG expression in permeabilized HEK-293T cells transiently expressing empty vector and WT or p.Y2562C TG. The data analysis showed that, although the percentage of transfection efficiency was comparable between WT and p.Y2562C TG transiently expressing cells, the levels of p.Y2562C TG were significantly lower than those of WT TG (Figure 3C). A putative dominant negative effect of p.Y2562C TG on the secretion of WT TG was dismissed as TG serum levels in patient #3 carrying p.Y2563C TG in the heterozygous state were found to be in the normal range (Table 1). Taken together, our findings suggest that the pathogenic variant p.Y2562C causes a possible defect in the stability of TG polypeptides in HEK-293T cells, thereby leading to a reduced expression and secretion of the protein for thyroid hormonogenesis.

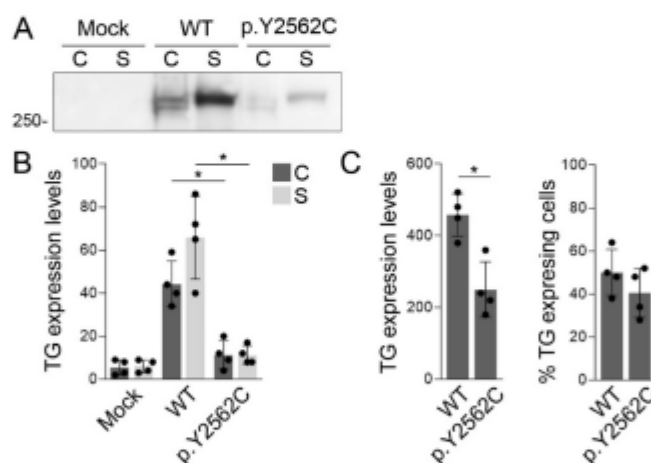


Figure 3. The variant p.Y2563C reduces the secretion of TG polypeptides. (A) Representative western blot analysis of TG expression in serum-free supernatants (S) and cell lysates (C) of HEK-293T cells transiently transfected with an empty expression vector (Mock) or expression vectors encoding full-length mouse TG or p.Y2562C TG. Monomers of TG were resolved as a single band of a molecular mass corresponding to ~330 kDa. (B) Densitometric analysis of TG expression levels in cell lysates (C) and supernatants (S). Data are expressed as relative units calculated based on the background-subtracted mean intensity of WT or p.Y2562C TG bands \pm SD ($n = 4$). * $p < 0.05$ vs. WT TG-expressing cells (ANOVA, Holm-Sidak tests). (C) Flow cytometry analysis to assess transfection efficiency and TG expression levels in permeabilized HEK-293T cells transiently expressing WT or p.Y2562C TG. The TG expression levels are expressed as median fluorescence intensity (MFI) \pm SD ($n = 4$). * $p < 0.05$ vs. WT TG-expressing cells (Student's *t*-test).

3. Discussion

Using targeted next-generation sequencing, we investigated the presence of pathogenic variants in the *SLC5A5* gene in a study cohort of nine unrelated patients with permanent dys-hormonogenic congenital hypothyroidism and that were suspected of having an iodide

transport defect. Unexpectedly, our analysis did not uncover pathogenic variants in the *SLC5A5* gene to account for the genetic basis of the thyroid disease. Recently, we reported a Sanger sequencing-based study which also assessed the presence of pathogenic *SLC5A5* gene variants in a study cohort of four patients suspected of congenital iodide transport defect, but we only identified the homozygous synonymous c.1326A>C variant, which led to aberrant NIS pre-mRNA splicing in one patient of the study cohort [24]. Although we focused on the coding region and exon-intron boundaries, other potential mechanisms, such as large genomic rearrangements or pathogenic variants that affect regulatory elements, including regulatory and deep intronic regions, should also be considered. Interestingly, two recent reports provided functional evidence that intronic variants (c.970-3C>A and c.970-48G>C) cause exon skipping during NIS pre-mRNA splicing, thus leading to iodide transport defects [25,26].

Over a decade ago, Fukata et al. [27] questioned whether the determination of the saliva-to-plasma radioactive iodide ratio is a requirement for the diagnosis of iodide transport defects. In addition to the thyroid, NIS also mediates active iodide transport in several extra-thyroidal tissues, including the salivary glands, stomach, small intestine, and lacrimal glands [28]. Consequently, in the absence of functional NIS molecules, iodide has no access to the thyroid (hampering thyroid hormonogenesis) or any extra-thyroidal tissue. These authors recommended first confirming the presence of eutopic thyroid glands by neck ultrasonography, and, if present, then conducting radionuclide scintigraphy to explore NIS-mediated iodide accumulation [27]. If neither the thyroid gland nor the salivary glands are observed to show NIS-mediated iodide accumulation during radionuclide scintigraphy, then a screening of pathogenic *SLC5A5* gene variants is encouraged for molecular diagnosis [27]. Here, we uncovered through a radionuclide scintigraphy analysis of the salivary glands an unexpected classification of patients with defective iodide accumulation in the thyroid gland into two groups: patients with detectable (thyroid iodide transport defect) or non-detectable (complete iodide transport defect) ^{99m}Tc -pertechnetate accumulation in the salivary glands. Based on these findings, it is reasonable to speculate that pathogenic variants may exist in yet to be discovered thyroid-specific genes, which were not targeted in our sequencing strategy, and are likely to be required for NIS-mediated iodide transport in the thyroid follicular cell. In line with this, the thyroid-stimulating hormone (TSH) is the primary hormonal regulator of thyroid NIS expression [29], and pathogenic variants in the TSH receptor-coding *TSHR* gene have been identified in patients with congenital hypothyroidism showing hypoplastic or normal-sized eutopic thyroid glands with reduced to absent radionuclide uptake on thyroid scintigraphy [30,31]. However, we could not reveal pathogenic variants in the *TSHR* gene in any patient of our cohort with thyroid iodide transport defect.

Targeted next-generation sequencing analysis demonstrated an unexpected enrichment in pathogenic compound heterozygous (p.Q29* and c.177-2A>C) and heterozygous (p.F1542Vfs*20) *TG* gene variants in patients with a complete iodide transport defect phenotype. Moreover, this analysis revealed pathogenic heterozygous *TG* (p.Y2563C) and *DUOX2* (p.E1496Dfs*51) gene variants in some patients with a thyroid iodide transport defect phenotype. Based on the autosomal recessive nature of dys-hormonogenic hypothyroidism, despite a discordant correlation between genotype and phenotype, the compound heterozygous variants in the *TG* gene leading to defective *TG* synthesis may partially explain the etiology of the disease in one of our patients (patient #1). Patients with *TG* defects usually present goiter, moderate to severe hypothyroidism, low to undetectable *TG* serum levels, and normal to increased iodide accumulation [18]. Unfortunately, *TG* serum levels were not available in our patient in order to establish further correlation between genotype and phenotype. Although heterozygous pathogenic *TG* variants are unlikely to explain the defective iodide transport phenotype, they may contribute to modulate the thyroid phenotype in patients with oligogenic forms of congenital hypothyroidism. Structurally defective *TG* variants tend to misfold and accumulate in the endoplasmic reticulum, causing severe thyroidal reticulum stress [32], which could lead to a reduced iodide accumulation

and expression of proteins involved in thyroid hormonogenesis, thereby being a possible TSH signaling-dependent counter-regulatory mechanism to reduce endoplasmic reticulum stress [33]. In addition, the absence of TG variants in the only patient of our cohort showing reduced TG serum levels (patient #7) does not explain the etiology of the disease. Taking these results together, our analysis reinforces the need to expand the current knowledge on the genetic landscape of the disease.

The advent of next-generation sequencing has expanded the mutational landscape of monogenic forms of congenital hypothyroidism, as well as uncovering the potential oligogenic origin of the disease [2]. Lately, whole-exome sequencing has revealed pathogenic variants in novel genes that lead to thyroid dysgenesis [34–36] and dyshormonogenesis [37–39]. Although the genetic basis underlying defective iodide accumulation in our study cohort remains elusive, the future implementation of next-generation sequencing-based approaches (i.e., whole-exome or whole-genome sequencing) might reveal novel disease-causing gene variants leading to the complete or thyroid phenotype of defective iodide accumulation. This hypothesis is supported by the observation that the function of the TSH-stimulated KCNQ1/KCNE2 potassium channel is required for thyroid hormonogenesis by sustaining normal NIS-mediated iodide transport in the thyroid follicular cell [40].

4. Material and Methods

4.1. Patients

Nine unrelated patients with permanent dyshormonogenic congenital hypothyroidism suspected of an iodide transport defect were enrolled in the study. All patients were full-term newborns of non-consanguineous Caucasian (of European descent) parents, and showed an abnormally high thyroid-stimulating hormone (TSH) serum level (cut-off value 15 mIU/L) during the newborn screening program (Table 1). The diagnosis of congenital hypothyroidism was made by assessing increased TSH serum levels, with total or free thyroxine (T4) levels being below the normal range (Table 1). The patients revealed variable clinical signs of hypothyroidism at birth, including jaundice, umbilical hernia, cutis marmorata, puffy dull face, and macroglossia, with delayed bone maturation on a knee X-ray suggesting severe intrauterine hypothyroidism. The inclusion criterion was congenital hypothyroidism with a reduced to absent ^{99m}Tc-pertechnetate accumulation in the thyroid gland, as assessed by radionuclide scintigraphy, and with the eutopic thyroid gland being examined by ultrasonography. In addition, the accumulation of ^{99m}Tc-pertechnetate in the salivary glands was recorded during thyroid gland scintigraphy. A determination of the saliva-to-plasma iodide ratio was not available. Levothyroxine therapy was started immediately after diagnosis at doses of 10–15 µg/kg per day. All patients were re-evaluated at approximately three years of age, as recommended by consensus guidelines [3], with the discontinuation of levothyroxine treatment for a month revealing permanent hypothyroidism. All parents were clinically and biochemically euthyroid. Parental DNA samples were not available for segregation analysis.

4.2. Targeted Next-Generation Sequencing

Genomic DNA was purified from peripheral blood mononuclear cells using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). Genomic DNA (10 ng/per sample) was used for library preparation, using the DNA prep with an enrichment protocol (Illumina, San Diego, CA, USA) and a custom targeted panel of the 17 congenital hypothyroidism-causative genes TG (NM_003235.4), TPO (NM_000547.5), DUOXA2 (NM_207581.3), DUOX2 (NM_014080.4), SLC5A5 (NM_000453.2), SLC16A2 (NM_006517.4), SLC26A4 (NM_000441.1), TSHR (NM_000369.2), GNAS1 (NM_000516.4), THRB (NM_000461.4), THRA (NM_003250.5), PAX8 (NM_003466.3), NKX2.1 (NM_001079668.2), NKX2.5 (NM_004387.3), FOXE1 (NM_004473.3), IYD (NM_001164694.1), and SECISBP2 (NM_024077.4) [41]. Next-generation sequencing was performed on the NextSeq 550 platform using the Mid Output kit v2.5 (Illumina). Sequencing coverage of 30x reads was considered to be the minimum requirement for a sequence variant to be

GENETIC BIOMARKERS OF LIFE-THREATENING PHEOCHROMOCYTOMA-INDUCED CARDIOMYOPATHY

Jacques Amar^{1,2}, Jeremy Brunel¹, Catherine Cardot Bauters³, Virginie Jacques^{4,5}, Clément Delmas^{2,6}, Marie-Françoise Odou^{7,8} and Frédérique Savagner^{4,5}

¹Department of Arterial Hypertension, Toulouse University, Hôpital Rangueil, Toulouse, France

²INSERM UMR1048, I2MC, Toulouse, France

³Service d'Endocrinologie, Hôpital Claude Huriez, CHU Lille, Lille, France

⁴INSERM UMR1297, I2MC, Toulouse, France

⁵Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, IFB-CHU, Toulouse, France

⁶Department of Cardiology Toulouse University, Hôpital Rangueil, Toulouse, France

⁷Service de Biochimie et Biologie Moléculaire 'Hormonologie, Métabolisme-Nutrition, Oncologie', CHU Lille, Lille, France

⁸Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U1286 – Infinite – Institute for Translational Research in Inflammation, Lille, France

CONTEXTE

Les phéochromocytomes-paragangliomes (PPGL) sont des tumeurs rares le plus souvent fonctionnelles (85%) de localisation principalement thoraco-abdomino-pelvien.

La libération de quantités excessives de catécholamines peut entraîner des complications cardiovasculaires potentiellement mortelles telles que la cardiomyopathie adrénérgique ou Takostubo (ou encore syndrome du cœur brisé).

Des études rétrospectives ont rapporté la prévalence de Takostubo chez 8 à 11 % des patients atteints de PPGL.

L'incidence de ce syndrome a été particulièrement augmentée lors de l'épidémie de coronavirus.

Certains des mécanismes impliqués dans ce syndrome comprennent l'activation des récepteurs adrénérgiques bêta1 et alpha-2.

La surexcitation des récepteurs bêta1-adrénérgiques augmente les activités inotropes et chronotropes du cœur et s'accompagne d'une augmentation secondaire de la demande en oxygène du myocarde, dépassant l'apport d'oxygène et produisant souvent des zones hypoxiques dans le cœur.

Alternativement, une surstimulation des récepteurs adrénérgiques alpha-1 et alpha-2 des petites artères coronaires et des artérioles pourrait entraîner une vasoconstriction non physiologique conduisant à une ischémie myocardique.

Ces deux mécanismes pourraient agir en synergie.

Il est important de noter que les polymorphismes mononucléotidiques des récepteurs adrénérgiques bêta-1 et alpha-2 altèrent la fonction des récepteurs myocytaires et augmentent la libération synaptique de noradrénaline et pourraient ainsi entraîner une hyperactivité nocive du système nerveux sympathique.

À cet égard, certains de ces polymorphismes ont été associés au risque de développer une insuffisance cardiaque et sont ensuite associés à une réponse bêtabloquante en cas d'insuffisance cardiaque.

À la lumière de ces données, nous avons émis l'hypothèse que de telles variations génétiques pourraient avoir un impact sur le risque de développer un Takostubo.

Pour tester cette hypothèse, nous avons réalisé une étude rétrospective chez trente et un patients atteints de PPGL, dont neuf ayant des antécédents de Takostubo, ont été analysés pour le génotypage des récepteurs alpha-2-adrénergiques (ADRA2C) et des récepteurs adrénergiques bêta-1 et bêta-2 (ADRB1 et ADRB2).

Deux cohortes ont été explorés (Toulouse et Lille) permettant de définir une cohorte de réplication.

La détection des patients à risque de Takostubo a ainsi été lié à l'absence de la délétion 322_325 dans le gène du récepteur alpha-2-adrénergique (ADRA2C).

L'obtention d'un financement de la Ligue contre le Cancer en 2023, nous a permis de de lancer un protocole d'étude prospective sur le variant Alpha2Cdel322_325 comme facteur de risque de choc cardioadrenergique pour une cohorte de patients de réanimation présentant des tumeurs solides ou hématologiques.

RESEARCH

Genetic biomarkers of life-threatening pheochromocytoma-induced cardiomyopathy

Jacques Amar^{1,2}, Jeremy Brunel¹, Catherine Cardot Bauters³, Virginie Jacques^{4,5}, Clément Delmas^{2,6}, Marie-Françoise Odou^{7,8} and Frédérique Savagner^{4,5}

¹Department of Arterial Hypertension, Toulouse University, Hôpital Rangueil, Toulouse, France

²INSERM UMR1048, I2MC, Toulouse, France

³Service d'Endocrinologie, Hôpital Claude Huriez, CHU Lille, Lille, France

⁴INSERM UMR1297, I2MC, Toulouse, France

⁵Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, IFB-CHU, Toulouse, France

⁶Department of Cardiology Toulouse University, Hôpital Rangueil, Toulouse, France

⁷Service de Biochimie et Biologie Moléculaire 'Hormonologie, Métabolisme-Nutrition, Oncologie', CHU Lille, Lille, France

⁸Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U1286 – Infinite – Institute for Translational Research in Inflammation, Lille, France

Correspondence should be addressed to J Amar: amar.j@chu-toulouse.fr

Abstract

The release of excessive amounts of catecholamine by pheochromocytoma–paragangliomas (PPGL) can lead to life-threatening catecholamine-induced cardiomyopathy (CIC). Single-nucleotide polymorphisms of the beta1 and alpha-2c adrenergic receptors alter myocyte receptor function and enhanced norepinephrine release. We tested the hypothesis that such genetic variations may impact the risk of developing CIC in the context of PPGL. Thirty-one patients with PPGL, including nine with a history of CIC, were analyzed for alpha-2-adrenergic receptors: ADRA2C, beta-1 and beta-2 adrenergic receptors: *ADRB1* and *ADRB2* genotyping. CIC was defined either by a history of heart failure or cardiogenic shock associated with dilated or Takotsubo cardiomyopathy. Subjects were genotyped for *ADRA2C* (rs61767072 for del322_325), *ADRB1* (rs1801252 for Ser49Gly and rs1801253 for Arg389Gly) and *ADRB2* (rs1042713 for Arg16Gly and rs1042714 for Gln27Glu). Single-locus analysis revealed that variant in *ADRA2C* (alpha 2Cdel322–325) was more common among patients with CIC than among controls (allele frequency, 0.44 vs 0.05; $P < 0.001$). The lack of alpha 2Cdel322–325 polymorphism has a negative predictive value of 95% for the onset of CIC. In a replication cohort including 26 patients with PPGL whom eight have developed a CIC, the association between Alpha 2Cdel322–325 and CIC was confirmed (allele frequency, 0.33 vs 0.; $P = 0.0001$). In conclusion, Alpha 2Cdel322–325 through the identification of patients at low risk of developing CIC can help physicians to better determine the most appropriate therapeutic approach, notably in patients at high risk of surgical complications.

Key Words

- ▶ pheochromocytoma
- ▶ paraganglioma
- ▶ genetic biomarkers
- ▶ catecholamine receptors
- ▶ catecholamine-induced cardiomyopathy

Endocrine-Related Cancer
(2022) 29, 267–272

Introduction

Pheochromocytoma–paraganglioma (PPGL) are rare tumors (Berends *et al.* 2018) that produce and store catecholamines. The release of excessive amounts

of catecholamines can lead to life-threatening cardiovascular complications such as catecholamine-induced cardiomyopathy (CIC). Retrospective studies

reported the prevalence of CIC at 8–11% of patients with PPGL (Park *et al.* 2011, Giavarini *et al.* 2013). Some of the mechanisms involved in CIC include the activation of beta1-adrenoceptors and alpha-2 adrenoceptors. The overexcitation of beta1-adrenoceptors heightens the inotropic and chronotropic activities of the heart and is accompanied by a secondary increase in myocardial oxygen demand, surpassing the oxygen delivery and often producing hypoxic areas in the heart (Costa *et al.* 2011, Khan *et al.* 2012). Alternatively, overstimulation of the alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors of the small coronary arteries and arterioles could result in non-physiologic vasoconstriction leading to myocardial ischemia. (Small *et al.* 2000). These two mechanisms could act synergistically. Importantly, single-nucleotide polymorphisms of the beta-1 and alpha 2c adrenergic receptors alter myocyte receptor function and enhanced synaptic norepinephrine release and thus could result in harmful sympathetic nervous system overactivity (Heusch *et al.* 2000, Mann & Bristow 2005). In this respect, some of these polymorphisms have been associated with the risk of developing heart failure and then are associated with beta-blocker response in heart failure (Bristow 2000, Liggett *et al.* 2006, 2008, Shin *et al.* 2007, Cresci *et al.* 2009, Bristow *et al.* 2010). In light of these data, we hypothesized that such genetic variations may impact the risk of developing CIC. To test this hypothesis, we carried out a retrospective study in patients who had surgery for PPGL comparing the polymorphisms of the gene coding for beta1 and alpha 2c adrenergic receptors according to the history of CIC.

Methods

Population

First, we built a discovery cohort. All patients monitored for a secreting PPGL referred to the department of hypertension at Toulouse University until 2020 were considered eligible. Among them, those for whom DNA was available and who gave their informed consent were included in the study. Informed consent for genetic testing was collected for all patients and conserved at Toulouse's academic hospital. Biological collection was included in the bio collection declared by the biological resource center of the academic hospital of Toulouse and the protocol was approved by the Ethics Committee of Sud-Ouest et Outre-Mer I et II (DC-2015-2450). Clinical and biological characteristics were recorded. Thirty-one patients were analyzed, nine with a history of CIC. Genetic testing for

PPGL was performed for all patients. Then, we built a case-control confirmatory study to check the robustness of the results found in the discovery cohort. DNA from 26 patients with PPGL, 8 with a history of CIC and 18 controls were analyzed. The last consecutive patients with PPGL and who develop CIC managed at Lille hospital were included. Ten controls were managed at Lille University whereas the last eight consecutive patients with PPGL free of CIC managed at Toulouse University, distinct from those included in the discovery cohort, were analyzed. These controls were added before any genetic analysis was carried out in the confirmatory cohort and in order to build up a confirmatory cohort that was close to the size of the discovery cohort. Biological collections were included in the bio collections declared either by the biological resource center of the academic hospital of Toulouse or by the biological resource center of Lille and the protocol was approved by the Ethics Committee of Sud-Ouest et Outre-Mer I et II (DC-2015-2450) and the Ethics Committee of Sud Est I (DC-2021-47). CIC was defined either by a history of heart failure or cardiogenic shock associated with dilated or Takotsubo cardiomyopathy (Y-Hassan & Falhammar 2020).

Genetic analysis

Subjects from the discovery cohort were genotyped for five variants in three adrenergic pathway genes encoding receptors as *ADRA2C* (one variant: rs61767072 for del322_325), *ADRB1* (two variants: rs1801252 for Ser49Gly and rs1801253 for Arg389Gly) and *ADRB2* (two variants: rs1042713 for Arg16Gly and rs1042714 for Gln27Glu). Subjects from the confirmatory cohort were genotyped for *ADRA2C* (rs61767072 for del322_325) and *ADRB1* (rs1801252 for Ser49Gly). For the *ADRA2C* gene, the nomenclature (i.e. del322_325) used in the reference paper of Small *et al.* (2002) was maintained. The genotyping was performed on genomic DNA from blood samples (MagNA Pure Total NA isolation kit, Roche Life Science, Chemagic Star blood 1K kit, Perkin Elmer) by sequencing PCR products spanning one or two variant positions as previously mentioned (Small *et al.* 2002, Liggett *et al.* 2006, Shin *et al.* 2007). BigDye Terminator Chemistry was used according to the manufacturer's instructions and analyzed on an ABI 3100 sequencer (all from Applied Biosystems).

Statistical analysis

Continuous variables were recorded as means \pm s.d. and categorical variables as percentages. Patients referred to

the discovery cohort, 22 exempt of CIC and 9 patients with a history of CIC were compared. We used the chi-squared test or exact Fisher's test for categorical variables and the Student's or the Wilcoxon tests for continuous variables as appropriate. We did not perform any multiple testing adjustments. Cox proportional-hazards stepwise regression analysis was used to identify the independent predictors of CIC. The time to event corresponded to the age at which a person received the diagnosis of PPGL (Hughey *et al.* 2019). The variables found to be significantly associated with the onset of CIC in bivariate analysis were inserted in Cox's model for survival analysis as explanatory variables. Before entering the model, continuous variables with skewness distribution (Shapiro's test) were log transformed. A variable has to be significant at the 0.20 level before it can be entered into the model, while the variable has to be significant at the 0.05 level for it to remain in the model. In the confirmatory cohort, the two polymorphisms found to be associated in bivariate analysis with the onset of CIC in the discovery cohort at 0.10 level were analyzed using Fisher's exact test. We did not perform any multiple testing adjustments. $P < 0.05$ was considered as statistically significant. Statistical analyses were performed using SAS software (version 9.4 for Windows).

Results

The characteristics of the discovery cohort are presented in Table 1. All patients ($n = 31$) had surgical resection of a pheochromocytoma ($n = 29$) or a paraganglioma ($n = 2$). All patients except one are Caucasians. Twenty-two patients were free of CIC. Of nine patients with a history of CIC, five had a Takotsubo cardiomyopathy and four a dilated cardiomyopathy, five developed heart failure and three had a cardiogenic shock requiring extracorporeal membrane oxygenation. The time of diagnosis of CIC corresponded to the time of diagnosis of PPGL in all case patients. There were triggering circumstances in 2/9 patients: a planned surgery and an altercation at work respectively. Age, sex and the prevalence of syndromic disease were not significantly different between the groups. Also, at the time of diagnosis of CIC, calcium channel blockers were more frequently prescribed in patients exempt from CIC. A significant increase in 24-h urine metanephrine levels was detected in patients with CIC. Single-locus analysis (Table 2) revealed that 2CDe1322–325 was more common among patients with CIC than among controls. No significant association was observed for the other tested genotypes: *ADRB1* rs1801252, *ADRB1* (rs1801253), *ADRB2* (rs1800888,

rs1042714 and rs1042713) and the onset of CIC. Also, 89% of the patients (8/9) with CIC had alpha 2CDe1322–325 polymorphism as compared with 9% (2/22) of the patients exempt from this complication. Hence, in this population, the lack of alpha 2CDe1322–325 polymorphism has a negative predictive value of 95% (75.1–99.9%). Eventually, 24-h urinary metanephrin, the prescription of calcium channel blocker and alpha 2CDe1322–325 polymorphism were inserted in Cox's regression model. In this model, alpha 2CDe1322–325 polymorphism only predicted the onset of CIC (hazard ratio 13.59; 95% CI limits: 1.69–109.39; $P = 0.01$). Of note, when focused on patients with pheochromocytoma ($n = 29$), alpha 2CDe1322–325 polymorphism also predicted the onset of CIC (hazard ratio 12.38% CI limits: 1.54–99.54; $P = 0.002$). Importantly, we confirmed in a case-control confirmatory study that alpha 2CDe1322–325 polymorphism was associated with the onset of CIC whereas no significant association with CIC was observed for rs1801252 (Table 3).

Discussion

The main finding of the study was that 2CDe1322–325 polymorphism was a biomarker of the risk of CIC in patients with PPGL. Some studies have previously identified such a relationship between one SNP and acute events (Kim & Jeong 2020, Li *et al.* 2020). Also, this finding is biologically plausible. Indeed, the alpha-2c receptor inhibits norepinephrine release from cardiac sympathetic nerves. In humans, a 4-amino acid deletion polymorphism is associated with decreased G-protein coupling. Then, the presence of the dysfunctional α_{2c} De1322–325 receptor could lead to increased norepinephrine release and consequently sympathetic overstimulation which could be a risk factor for CIC (Small *et al.* 2000). In line with this hypothesis, the (2/21) 9.5% prevalence of this deletion in patients who did not develop CIC is close to that observed (6%) in the Caucasian population (Belfer *et al.* 2005), in striking contrast with the (8/9) 88% observed prevalence in patients who developed CIC. Then we observed in bivariate analysis a non-significant trend between beta1-adrenergic receptor polymorphism rs1801252 and the onset of CIC ($P = 0.08$). However, this association was not confirmed in the case-control confirmatory study. Thus, it is likely that this association had arisen by chance. Also, regarding antihypertensive agents, we observed differences in the frequency with which these medications were prescribed between patients who did develop CIC and patients exempt from this complication, notably for

Table 1 Characteristics of the study population. Means \pm s.d.

	Life-threatening CIC (<i>n</i> = 9)	Patients who did not develop life-threatening CIC (<i>n</i> = 22)	P value
Age (years)	47.8 \pm 14.4	50.6 \pm 12.4	0.59
Body mass index (kg/m ²)	23.1 \pm 4.2	25.2 \pm 4.9	0.26
NM (μ g/24 h)	3596.4 \pm 3450.8	2198.2 \pm 1948.5	0.28
M (μ g/24 h) ^a	6011.4 \pm 6687.1	2261.1 \pm 4252.3	0.05
Tumor size (mm)	60.3 \pm 28.0	44.65 \pm 22.5	0.15
Pass score	3.3 \pm 2.6	2.7 \pm 3.2	0.36
<i>N</i> (%)			
Male sex	3 (33.3)	8 (36.4)	0.87
M above the upper limit of normal	8 (88.9)	9 (40.9)	0.01
NM above the upper limit of normal	8 (88.9)	17 (77.3)	0.46
Preexisting hypertension	2 (22.2)	12 (57.1)	0.08
Prescribed drugs at time of diagnosis			
Alphablockers	0	5 (27.3)	0.12
Betablockers	1 (11.1)	8 (36.4)	0.16
ACEI	1 (11.1)	4 (18.2)	0.62
ARB	0	4 (18.2)	0.18
Calcium channel blockers ^b	0	13 (59.1)	0.003
Diuretic	0	4 (18.18)	0.17
Type 2 diabetes	0	4 (18.2)	0.36
Antidepressant medication	1 (11.1)	2 (9.1)	0.86
Paraganglioma	0	2 (9.10)	0.35
Syndromic disorder	2 (22.2)	4 (18.2)	0.77
Neurofibromatosis 1	1 (11.1)	1 (4.6)	
Multiple endocrine neoplasia type 2A	1 (11.1)	0	
Germline mutation in TMEM127 gene	0	1 (4.6)	
Germline mutation in succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A	0	1 (4.6)	
Germline mutation in succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit B	0	1 (4.6)	
Smoking status			0.69
Never	3 (33.3)	11 (50)	
Former smoker	4 (44.4)	7 (31.8)	
Active	2 (22.2)	4 (18.2)	

Percentages are in brackets.

^a*P* < 0.05; ^b*P* < 0.01.

ACEI, angiotensin-converting enzyme inhibitor; ARB, angiotensin receptor blocker; NM, 24-h urinary normetanephrine (μ g/24 h); M, 24-h urinary metanephrine (μ g/24 h).

calcium channel blockers. Further studies are required to explore the effect of antihypertensive agents on the onset of CIC.

Clinical perspectives

Genetic biomarkers able to rule out the onset of CIC should be clinically useful. These biomarkers should provide valuable help for the evaluation of the benefit/risk balance of the surgery, especially in patients with bilateral pheochromocytoma in whom surgery can result in adrenal failure even when partial adrenalectomy was performed (Lenders *et al.* 2014) or in patients at high surgical risk. Indeed, as a consequence of bilateral adrenalectomy, patients

became steroid dependent and will develop in 30% of cases either adrenal crisis or symptoms consistent with steroid over replacement (Neumann *et al.* 2019). Also, patients with adrenal insufficiency suffer from impaired quality of life (Kluger *et al.* 2014) and are at increased mortality risk, with some data suggesting that cardiovascular, malignant and infectious causes contributed to this (Berghorsdottir *et al.* 2006, Bensing *et al.* 2008). Furthermore, in the small proportion - about 3% (Schwaber *et al.* 1984) of patients with secreting head or neck paraganglioma or in patients with mediastinal paraganglioma, notably paraganglioma supplied by coronary arteries, surgical morbidity remains significant. In such cases, reliable biomarkers associated with a very low incidence of CIC can help physicians better

Table 2 Genetic analysis in the discovery cohort.

Alleles	Allele frequency	P	Genotype		
			Wt/wt	Wt/mut	Mut/mut
<i>ADRA2C</i> rs61767072					
Life-threatening CIC	0.44	<0.0001	1 (11.1)	8 (88.9)	0
Controls	0.05		19 (90.5)	2 (9.5)	0
<i>ARDB2</i> rs1042714					
Life-threatening CIC	0.56	0.25	G/G	G/C	C/C
Controls	0.36		2 (22.2)	6 (66.7)	1 (11.11)
<i>ADRB2</i> rs1042713					
Life-threatening CIC	0.72	0.22	G/G	G/A	A/A
Controls	0.68		2 (9.1)	12 (54.6)	8 (38.36)
<i>ADRB1</i> rs1801252					
Life-threatening CIC	0.28	0.08	G/G	G/A	A/A
Controls	0.09		4 (44.4)	5 (55.6)	0
<i>ADRB1</i> rs1801253					
Life-threatening CIC	0.33	0.14	A/A	A/G	G/G
Controls	0.14		18 (81.8)	4 (18.2)	0
			G/G	C/G	C/C
Life-threatening CIC	0.33		5 (55.6)	2 (22.2)	2 (22.2)
Controls	0.14		16 (72.7)	6 (27.3)	0

CIC, catecholamine-induced cardiomyopathy; Mut, mutant.

Table 3 Genetic analysis in the validation cohort.

Alleles	Allele frequency	P*	Genotype		
			Wt/wt	Wt/del	Del/del
<i>ADRA2C</i> rs61767072					
Life-threatening CIC	0.3	0.0001	2 (25)	6 (75)	0
Controls	0		18 (100)	0	0
<i>ADRB1</i> rs1801252					
Life-threatening CIC	0.7	0.77	A/A	A/G	G/G
Controls	0.8		4 (50)	4 (50)	0
			11 (61.1)	6 (33.3)	1 (5.6)

*P value for exact fisher's test.

determine which patients may benefit from medical or surgical treatment.

Limitation and strength of the study

As expected, since the Department of Arterial Hypertension is directly downstream from an expert and regional reference intensive cardiac care unit, the prevalence of patients with CIC was 29%, which is high compared with previous reports (Park *et al.* 2011, Giavarini *et al.* 2013). Thus, based on our data, the positive predictive value of our biomarker could be overestimated, whereas the negative predictive value is likely to be underestimated. Therefore, the negative predictive value of alpha 2C Del322–325 polymorphism is likely to be higher than 95%. Hence, alpha 2C Del322–325 polymorphism should be of valuable help in ruling out the onset of CIC in patients with PPGL. Eventually, the robustness of this result was checked by means of replication using a case–control confirmatory study. In this respect, the repeated observation of the association between alpha 2C Del322–325 polymorphism and CIC in patients

with PPGL by different investigative teams, in different populations greatly improved the credibility of the result.

Conclusion

We showed that α_2c adrenergic receptors polymorphism predict the risk of CIC in patients with PPGL. This finding has been confirmed in a replication study and should be a useful tool in determining therapeutic strategy in patients with PPGL at high risk of surgical complication.

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Funding

This work did not receive any specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sector.

References

- Belfer I, Buzas B, Evans C, Hipp H, Phillips G, Taubman J, Lorincz I, Lipsky RH, Enoch MA, Max MB, et al. 2005 Haplotype structure of the beta adrenergic receptor genes in US Caucasians and African Americans. *European Journal of Human Genetics* **13** 341–351. (<https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201313>)
- Bensing S, Brandt L, Tabaroj F, Sjöberg O, Nilsson B, Ekblom A, Blomqvist P & Käme O 2008 Increased death risk and altered cancer incidence pattern in patients with isolated or combined autoimmune primary adrenocortical insufficiency. *Clinical Endocrinology* **69** 697–704. (<https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2008.03340.x>)
- Berends AMA, Buitemwerf E, de Krijger RR, Veeger NJGM, van der Horst-Schrivers ANA, Links TP & Kerstens MN 2018 Incidence of pheochromocytoma and sympathetic paraganglioma in the Netherlands: a nationwide study and systematic review. *European Journal of Internal Medicine* **51** 68–73. (<https://doi.org/10.1016/j.ejim.2018.01.015>)
- Bergthorsdottir R, Leonsson-Zachrisson M, Oden A & Johannsson G 2006 Premature mortality in patients with Addison's disease: a population-based study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **91** 4849–4853. (<https://doi.org/10.1210/jc.2006-0076>)
- Bristow MR 2000 beta-adrenergic receptor blockade in chronic heart failure. *Circulation* **101** 558–569. (<https://doi.org/10.1161/01.cir.101.5.558>)
- Bristow MR, Murphy GA, Krause-Steinrauf H, Anderson JL, Carlquist JE, Thaneem-Chen S, Krishnan V, Abraham WT, Lowes BD, Port JD, et al. 2010 An alpha2C-adrenergic receptor polymorphism alters the norepinephrine-lowering effects and therapeutic response of the beta-blocker bucindolol in chronic heart failure. *Circulation: Heart Failure* **3** 21–28. (<https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.109.885962>)
- Costa VM, Carvalho F, Bastos ML, Carvalho RA, Carvalho M & Remiao F 2011 Contribution of catecholamine reactive intermediates and oxidative stress to the pathologic features of heart diseases. *Current Medicinal Chemistry* **18** 2272–2314. (<https://doi.org/10.2174/092986711795656081>)
- Cresci S, Kelly RJ, Cappola TP, Diwan A, Dries D, Kardia SL & Dorn 2nd GW 2009 Clinical and genetic modifiers of long-term survival in heart failure. *Journal of the American College of Cardiology* **54** 432–444. (<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.05.009>)
- Giavarini A, Chedid A, Bobrie G, Plouin PF, Hagege A & Amar L 2013 Acute catecholamine cardiomyopathy in patients with pheochromocytoma or functional paraganglioma. *Heart* **99** 1438–1444. (<https://doi.org/10.1136/heartjnl-2013-304073>)
- Heusch G, Baumgart D, Camici P, Chilian W, Gregorini L, Hess O, Indolfi C & Rimoldi O 2000 alpha-Adrenergic coronary vasoconstriction and myocardial ischemia in humans. *Circulation* **101** 689–694. (<https://doi.org/10.1161/01.cir.101.6.689>)
- Hughes JJ, Rhoades SD, Fu DY, Bastarache L, Denny JC & Chen Q 2019 Cox regression increases power to detect genotype-phenotype associations in genomic studies using the electronic health record. *BMC Genomics* **20** 805. (<https://doi.org/10.1186/s12864-019-6192-1>)
- Khan MU, Cheema Y, Shahbaz AU, Abokas RA, Sun Y, Gerling IC, Bhattacharya SK & Weber KT 2012 Mitochondria play a central role in nonischemic cardiomyocyte necrosis: common to acute and chronic stressor states. *Pflügers Archiv* **464** 123–131. (<https://doi.org/10.1007/s00424-012-1079-x>)
- Kim YC & Jeong BH 2020 Strong correlation between the case fatality rate of COVID-19 and the rs6598045 single nucleotide polymorphism (SNP) of the interferon-induced transmembrane protein 3 (IFITM3) gene at the population-level. *Genes* **12** E42. (<https://doi.org/10.3390/genes12010042>)
- Kluger N, Matikainen N, Sintonen H, Ranki A, Roine RP & Schalin-Jäättö C 2014 Impaired health-related quality of life in Addison's disease – impact of replacement therapy, comorbidities and socio-economic factors. *Clinical Endocrinology* **81** 511–518. (<https://doi.org/10.1111/cen.12484>)
- Lenders JW, Duh QY, Eisenhofer G, Gimenez-Roqueplo AP, Grebe SK, Murad MH, Naruse M, Pacak K, Young Jr WF & Endocrine Society 2014 Pheochromocytoma and paraganglioma: an endocrine society clinical practice guideline. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **99** 1915–1942. (<https://doi.org/10.1210/jc.2014-1498>)
- Li J, Qin R, Wang W, Huang Z, Huang DL, Li T, Wang F, Zeng XT, Sun ZY, Liu XF, et al. 2020 Relationship between SNP rs1764391 and susceptibility, risk factors, gene-environment interactions of acute myocardial infarction in Guangxi Han Chinese population. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **21** 79–88. (<https://doi.org/10.2174/1389201019666191003150015>)
- Liggett SB, Miale-Perez J, Thaneem-Chen S, Weber SA, Greene SM, Hodne D, Nelson B, Morrison J, Domanski MJ, Wagoner LE, et al. 2006 A polymorphism within a conserved beta(1)-adrenergic receptor motif alters cardiac function and beta-blocker response in human heart failure. *PNAS* **103** 11288–11293. (<https://doi.org/10.1073/pnas.0509937103>)
- Liggett SB, Cresci S, Kelly RJ, Syed FM, Matkovich SJ, Hahn HS, Diwan A, Martini JS, Sparks L, Parekh RR, et al. 2008 A GRK5 polymorphism that inhibits beta-adrenergic receptor signaling is protective in heart failure. *Nature Medicine* **14** 510–517. (<https://doi.org/10.1038/nm1750>)
- Mann DL & Bristow MR 2005 Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond. *Circulation* **111** 2837–2849. (<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.500546>)
- Neumann HPH, Tsey U, Bancos I, Amodru V, Wälz MK, Tirosh A, Kaur RJ, McKenzie T, Qi X, Bandgar T, et al. 2019 Comparison of pheochromocytoma-specific morbidity and mortality among adults with bilateral pheochromocytomas undergoing total adrenalectomy vs cortical-sparing adrenalectomy. *JAMA Network Open* **2** e198898. (<https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2019.8898>)
- Park JH, Kim KS, Sul JY, Shin SK, Kim JH, Lee JH, Choi SW, Jeong JO & Seong IW 2011 Prevalence and patterns of left ventricular dysfunction in patients with pheochromocytoma. *Journal of Cardiovascular Ultrasound* **19** 76–82. (<https://doi.org/10.4250/jcu.2011.19.2.76>)
- Schwaber MK, Glasscock ME, Nissen AJ, Jackson CG & Smith PG 1984 Diagnosis and management of catecholamine secreting glomus tumors. *Laryngoscope* **94** 1008–1015. (<https://doi.org/10.1288/00005537-198408000-00002>)
- Shin J, Lohmeyer MT, Gong Y, Zineh I, Langae TY, Yarandi H, Schofield RS, Aranda JM Jr, Hill JA, Pauly DE, et al. 2007 Relation of beta(2)-adrenoceptor haplotype to risk of death and heart transplantation in patients with heart failure. *American Journal of Cardiology* **99** 250–255. (<https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2006.08.020>)
- Small KM, Forbes SL, Rahman FE, Bridges KM & Liggett SB 2000 A four amino acid deletion polymorphism in the third intracellular loop of the human alpha 2C-adrenergic receptor confers impaired coupling to multiple effectors. *Journal of Biological Chemistry* **275** 23059–23064. (<https://doi.org/10.1074/jbc.M000796200>)
- Small KM, Wagoner LE, Levin AM, Kardia SL & Liggett SB 2002 Synergistic polymorphisms of beta 1- and alpha2C-adrenergic receptors and the risk of congestive heart failure. *New England Journal of Medicine* **347** 1135–1142. (<https://doi.org/10.1056/NEJMoa020803>)
- Y-Hassan S & Falhammar H Cardiovascular manifestations and complications of pheochromocytomas and paragangliomas 2020. *Journal of Clinical Medicine* **9** 2435. (<https://doi.org/10.3390/jcm9082435>)

Received in final form 20 February 2022

Accepted 8 March 2022

Accepted Manuscript published online 8 March 2022

NEXT-GENERATION SEQUENCING ANALYSIS REVEALS FREQUENT FAMILIAL ORIGIN AND OLIGOGENISM IN CONGENITAL HYPOTHYROIDISM WITH DYSHORMONOGENESIS

Isabelle Oliver-Petit¹, Thomas Edouard^{1,2}, Virginie Jacques^{2,3}, Marie Bournez⁴, Audrey Cartault¹, Solange Grunenwald⁵ and Frédérique Savagner^{2,3}

¹ Endocrine, Genetics, Bone Diseases, and Paediatric Gynecology Unit, Children's Hospital, CHU Toulouse, Toulouse, France

² Inserm UMR 1048, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases (I2MC), Toulouse, France

³ Biochemistry and Genetic Laboratory, Federative Institute of Biology, CHU Toulouse, Toulouse, France

⁴ Pediatric Unit, Hospital Le Bocage, CHU Dijon, Dijon, France

⁵ Department of Endocrinology and Metabolic Diseases, Cardio-Vascular and Metabolic Unit, CHU Larrey, Toulouse, France

CONTEXTE

L'hypothyroïdie congénitale est le trouble endocrinien néonatal le plus courant devant l'hypoglycémie.

L'épidémiologie de la CH a récemment évolué avec une augmentation de l'incidence proche de 1/2 600 en France, principalement liée à une augmentation des hypothyroïdies congénitales à glande eutopique, représentant 37 à 49% des cas de CH par rapport à l'origine régionale.

L'exploration moléculaire des CHEG d'origine familiale a souvent été limitée à un petit nombre de gènes en raison du processus coûteux et long pour les explorer par la technologie de séquençage Sanger.

La technologie NGS a permis de lancer une approche exhaustive permettant l'identification de processus complexes tels des anomalies de type hétérozygote composite ou d'oligogenisme.

Cette étude NGS établit un panel de dix-neuf gènes ciblé impliquant TG, TPO, DUOX1, DUOX2, DUOX2, IYD, SLC5A5, SLC26A4, TSHR ainsi que des gènes associés à d'autres dysfonctionnements thyroïdiens, à savoir la dysgénésie thyroïdienne et la dysthyroïdie, dans un sous-ensemble de soixante-cinq enfants dépistés à la naissance et confirmé pour CHEG.

Hormis un mode de transmission monogénique, le rôle de l'oligogénicité dans le développement de la maladie reste peu exploré.

Malgré les différences dans l'approche méthodologique, nous confirmons la proportion accrue d'origine familiale de variants pathogènes uniques ou multiples de type hétérozygote composite mais aussi de digénisme dans 21,6 % des cas conduisant à une dys-hormonogénèse thyroïdienne.

L'analyse de cette population nombreuse et multiethnique nous a permis de préciser l'étiologie familiale dans le développement des CHEG tout en tenant compte de la fréquence des CH transitoires.

Cela représente un enjeu thérapeutique majeur dans la prise en charge des nouveau nés avec CHEG puisque les enfants présentant un ou des variants constitutionnels seront traités à vie par Levothyrox sans réévaluation à l'âge de deux ans.



Next-Generation Sequencing Analysis Reveals Frequent Familial Origin and Oligogenism in Congenital Hypothyroidism With Dysmorphogenesis

Isabelle Oliver-Petit¹, Thomas Edouard^{1,2}, Virginie Jacques^{2,3}, Marie Bournez⁴, Audrey Cartault¹, Solange Grunenwald⁵ and Frédérique Savagner^{2,3*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Juan Pablo Nicolás,
National University of Córdoba,
Argentina

Reviewed by:

Uth Graselj,
University of Ljubljana, Slovenia
Cristina E. Citterio,
CONICET Institute of Immunology,
Genetics and Metabolism (INIGEM),
Argentina

*Correspondence:

Frédérique Savagner
frederique.savagner@univ-tlse3.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Thyroid Endocrinology,
a section of the journal
Frontiers in Endocrinology

Received: 24 January 2021

Accepted: 31 May 2021

Published: 24 June 2021

Citation:

Oliver-Petit I, Edouard T, Jacques V,
Bournez M, Cartault A, Grunenwald S
and Savagner F (2021) Next-Generation
Sequencing Analysis Reveals Frequent
Familial Origin and Oligogenism in
Congenital Hypothyroidism
With Dysmorphogenesis.
Front. Endocrinol. 12:657913.
doi: 10.3389/fendo.2021.657913

¹ Endocrine, Genetics, Bone Diseases, and Paediatric Gynecology Unit, Children's Hospital, CHU Toulouse, Toulouse, France, ² Inserm UMR 1048, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases (IMC), Toulouse, France, ³ Biochemistry and Genetic Laboratory, Federative Institute of Biology, CHU Toulouse, Toulouse, France, ⁴ Pediatric Unit, Hospital Le Bocage, CHU Dijon, Dijon, France, ⁵ Department of Endocrinology and Metabolic Diseases, Cardio-Vascular and Metabolic Unit, CHU Larrey, Toulouse, France

Context: Congenital hypothyroidism (CH) is related to dysmorphogenesis in 15% to 40% of the world population and associated with homozygous or heterozygous variants in the main genes of the hormone synthesis pathway. Emerging diagnostic tools, such as next-generation sequencing (NGS), have been used to efficiently explore panels of genes and identify complex mechanisms of pathogenesis.

Objective: We explored 19 candidate genes known to be causative for permanent or transient CH to evaluate the role of complex gene variations in CH phenotype.

Patients, Design and Setting: Using the NGS approach, we studied 65 newborns with thyroid dysmorphogenesis (TDH). New variants were assessed *in silico* for pathogenicity.

Results: Among the 65 infants, 56.9% presented a variant in one or more genes of the thyroid hormone synthesis axis. We identified homozygous or compound heterozygous variants in the *TG*, *DUOX2*, *TPO*, or *SLC5A5* genes in 10 infants and heterozygous variants in *DUOX2*, *TG*, *TPO*, and *TSHR* in 19 others. In seven cases, a heterozygous variant in the *TG* gene was the unique anomaly detected, but related to disturbed hormonal balance. Oligogenic variants were found in eight infants associated with severe CH and goiter in five of them.

Conclusion: The systematic exploration of genes involved in thyroid hormone synthesis by NGS in TDH showed high diagnostic relevance. Oligogenic inheritance could be related to phenotypic heterogeneity and a high frequency of goiter.

Keywords: high throughput molecular screening, familial origin, oligogenicity, congenital hypothyroidism, thyroid dysmorphogenesis

INTRODUCTION

Congenital hypothyroidism (CH) is the most common inborn endocrine disorder detected at birth by mass biochemical newborn screening. Epidemiology for CH has recently changed with an increased incidence close to 1/2,600 in France, mainly related to an increase in CH with thyroid dysharmonogenesis (TDH) representing 37% to 49% of CH cases relative to regional origin (1–3). In the south of France, 47% of CH are due to TDH and 53% to thyroid dysgenesis (TD). Genetic exploration of CH has often been restricted to a small number of genes because of a cost and time-consuming process to explore them by Sanger technology. Apart from a monogenic pattern of inheritance, the role of oligogenicity in disease development remains poorly explored. Recent studies have used next-generation sequencing (NGS) technology for better genotyping of newborns with suspected CH (4–9). Despite differences in the methodological approach, all studies highlighted an increased proportion of familial origin single or multiple pathogenic variants leading to thyroid dysharmonogenesis.

In France, the nationwide neonatal screening program of CH, implemented since 1978, identifies without ethnic *a priori* assumptions all children with high TSH levels. They are explored in accordance with the European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE) consensus by biology, ultrasonography, and scintigraphy to distinguish aetiologies between TD and TDH. Analysis of this large and multi-ethnic unselected population could specify the landscape of familial aetiology in TDH development while considering the frequency of transient CH. The present NGS study established a targeted thyroid gene panel in a subset of 65 children screened at birth and confirmed to have CH. The aim of our study was to explore the frequency of complex molecular mechanisms for TDH related to phenotypic heterogeneity. We focused on TDH due to its increased incidence in our region (+7.9% per year) compared to the stable incidence of TD.

PATIENTS AND METHODS

Patients

Sixty-five patients were included in the study (30 females and 35 males); all except one were issued from non-related families living in the Midi-Pyrenees' region (south west of France, 3 million inhabitants). In 10% (7/65), different ethnic origins were present (Turkish, Maghreb countries).

All patients had early hypothyroidism as defined by ESPE consensus guidelines for congenital hypothyroidism screened at birth (regional neonatal screening), confirmed at the age of 10 days, and explored by ultrasonography (10). Secondary to genetic sampling, scintigraphy was performed to confirm aetiologies and for three infants to redirect toward TD (F37 for ectopia and F6, F14 for hypoplasia). Ectopia is a rare event in our population, as only 16% of TD presented ectopia during the same period of this study. For F2 patient, radionuclide scintigraphy revealed severely reduced uptake by the thyroid gland suggesting

a functional defect of NIS. Based on serum FT4 levels, CH was defined as severe when FT4 was <5 pmol/L, moderate when FT4 was 5 to 10 pmol/L, and mild when FT4 was 10 to 15 pmol/L. TSH resistance was referred as FT4 in the normal range with a high level of TSH.

Infants were treated from diagnosis by levothyroxine (5–15 µg/kg/d) and re-evaluated after two or three years as proposed by consensus: 44 (67%, 44/65) were confirmed as persistent TDH; the 21 remaining infants had transient CH, but for seven of them, the biological profile showed persistent high levels of TSH and normal FT4. Relative to FT4 values, treatment was stopped for infants with transient CH. For 27 children (41.5%, 27/65), clinical goiter was suspected and confirmed by ultrasonography.

For all families except five (F22, F31, F33, F36, and F37), samples were obtained from family members to check for inheritance and co-segregation with phenotype. Written informed consent for patients or relatives was obtained for NGS and/or Sanger analyses and data were included in a biocollection (number: DC-2015-2450).

DNA Extraction and Sequencing

Genomic DNA was isolated from peripheral blood using the QIAamp DNA blood kit according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Hilden, Germany). A total of 10 ng of DNA per sample was used for library preparation, using the DNAPrep with enrichment protocol (Illumina; San Diego, CA) and a custom NGS panel including in 19 thyroid-related genes (Supplemental Table 1). Sequencing was performed on the Nextseq550 platform (Illumina) using the Mid Output kit v2.5. For a sequence variant to be considered valuable, a sequencing coverage of 30× reads was used as a minimum requirement in the present study. Sequence data were processed using custom bioinformatic software and compared to NextGENe independent analysis (Softgenetics, State College, PA, USA) to align reads to the HG19 reference genome. Copy number variants (CNVs) were detected using the COV'COPI tool (11) and confirmed by MLPA analysis (MRC-Holland, Amsterdam, Netherlands). All reported variants, described using the HGVS nomenclature, were explored using public and license databases, including HGMD professional, gnomAD, and ClinVar, as well as literature searches. Minor allele frequency <5% was considered. The majority of variants were rated according to the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) guidelines (12) and VarSome ACMG implementation (<http://varsome.com>). For variants with no pathogenic reporting, we classified them based on allele frequency in corresponding ethnic population, cosegregation with thyroid balance within the upper limit (TSH value) for the carrier parent and non-published data. Amino acid predictions were performed using the MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org>), SIFT (<http://sift.jvci.org>), and PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>) software tools and additional supporting evidence for pathogenicity was stated for variants of uncertain significance (VUS). We considered variants as deleterious when concordant annotations by two of these software tools using different algorithms were present. For intronic variants close to the splicing site, we used the ESEFinder2.0 software tool.

Variants detected by the Illumina platform were confirmed by targeted Sanger sequencing on an ABI3130XL apparatus using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.).

The data for this study have been deposited in the European Nucleotide Archive (ENA) at EMBL-EBI under accession number PRJEB42793.

Statistical Analysis

The statistical significance was assessed using the Mann-Whitney *U* test. Differences were considered significant at $P < 0.05$. All analyses were performed using StatView, version 5.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

RESULTS

Spectrum of Genetic Variants

Among the 65 children, 37 (56.9%) presented a constitutive variant from different ACMG classes: 3 (VUS), 4 (probably pathogenic), and 5 (pathogenic) in one or two genes of the thyroid hormone biosynthesis pathway, according to VarSome results and, for some variants, to our own pathogenicity evidence as referred in *Patients and Methods* section. Functional studies will ultimately be required to prove the pathogenicity of novel variants. We showed that for the majority of patients (78.4%; 29/37), variants belonging to classes 4 and 5 have been previously reported in databases and/or in the literature. Biallelic variants in *TG*, *TPO*, *DUOX2*, and *SLC5A5* genes were found in 27% (10/37) of patients, whereas monoallelic variants in *TSHR*, *TPO*, *DUOX2*, and *TG* were identified in 51.3% (19/37). Oligogenism was identified for 21.6% (8/37) of the infants, mainly involving variants in the *TG* and *DUOX2* genes, except for homozygous twins (F32, *DUOX2/TPO*). Considering mono or biallelic variants in a unique gene independently of oligogenic inheritance (29/37), the *TG* gene was most commonly associated with TDH in our cohort (37.9%; 11/29), followed by a fairly equivalent percentage of variants in the *TPO* (24.1%; 7/29) and *DUOX2* (20.7%; 6/29) genes. For *TG*, six variants (F1, F4, F24, F28, F31, and F33) led to truncated *TG* before or in the carboxy-terminal acetyl cholinesterase-like domain, which is crucial for conformation and intracellular trafficking (13, 14).

According to ACMG class 3, VUS corresponded to monoallelic variants in the *TG* (F3, F4, F9, F13, and F29), *TPO* (F27), and *DUOX2* (F9) genes. For F3 and F4, VUS in *TG* were associated with pathogenic *TG* variants. For F9, two VUS were associated (in *TG* and *DUOX2*) and related to neonatal goiter. The latest two VUS in the *TG* gene (F13, F29) were related to moderate CH in a 27-week premature girl without goiter (F13) and to mild CH in a child presenting with psychomotor delay (F29). Finally, for F27, the splicing variant was related to homozygous deletion of exon 17 of the *TPO* gene, confirmed by MLPA analysis (data not shown).

We did not detect any variants in the *DUOX1*, *DUOXA1*, and *GNAS1* genes, according to the low frequency of these events in familial TDH (15, 16). No pathogenic variants in other genes

(coding and non-coding regions) explored in our study and related to dysgenesis and dysthyroidism were identified.

Genotypical data and inheritance for the 37 children positive for ACMG classes 3 to 5 of the constitutive variants are shown in **Table 1**.

Phenotype-Genotype Correlation

Among the 37 children presenting constitutive variants, 21/37 (55.5%) were male with an increased male/female sex ratio of 1.31 (21/16) compared to the global sex ratio of 1.18 (35/30) or to that of the NGS negative group of 1.15 (15/13). No extra-thyroidal phenotype has been noticed for all the children. Goiter was significantly associated with positive cases (56.7%, 21/37) compared to infants negative for variants but with proven CH, (14.2%, 4/28). Goiter was also significantly associated with homozygous, compound heterozygous and oligogenic variants regardless of the severity of CH (94% 17/18). Types of variants related to CH severity and goiter for the 37 infants are presented in **Figure 1**.

Pathogenic variants or VUS were associated with permanent TDH for 89.1% (33/37) and with transient hypothyroidism in 10.8% (4/37), all of the latter associated with *DUOX2* variants. For 75% of the *TSHR*-positive cases (F6, F14, F15, F34), no goiter was detected, but hypoplasia was noticed in two infants after scintigraphy. Two cases corresponded to the same heterozygous variant Arg450His with a difference in the biological spectrum from TSH resistance for F6 to severe hypothyroidism for F15.

Comparing patient phenotypes using the ESPE criteria for CH severity based on FT4 levels, biallelic and oligogenic variants were associated with severe CH (73.3%, 11/15) and goiter 90.9%, 10/11), while heterozygous variants in the *TG*, *TPO*, *DUOX2*, and *TSHR* genes were associated with infants presenting moderate and mild CH (63.2%, 12/19) with a low risk of goiter (25%, 3/12).

We also identified a new homozygous deletion in the *TPO* gene in one infant (F27) presenting moderate CH with goiter. Among the diverse splicing mRNA *TPO* variants already described, none were related to the unique absence of exon 17 (17). Even if the structure of *TPO* remains to be determined, a recent modelling study suggested that homozygous loss of the intracellular domain of this enzyme is responsible for cell trafficking and could impact the conformation of its active site (18).

Exploring for the role of heterozygous *TG* VUS in CH (F13 and F29), we showed that for F13 with CH in a 27-week premature girl, the mother presented with clinical adult-onset goiter and moderate hypothyroidism associated with the same heterozygous variant in the *TG* gene. For F29, the father of a boy with mild CH had a history of hypothyroidism and goiter with adult onset, related to the same VUS. Clinical and inheritance data for the 37 infants are shown in **Table 2**. Clinical and biological data for the 28 remaining infants without identified variant are listed in **Supplemental Table 2**.

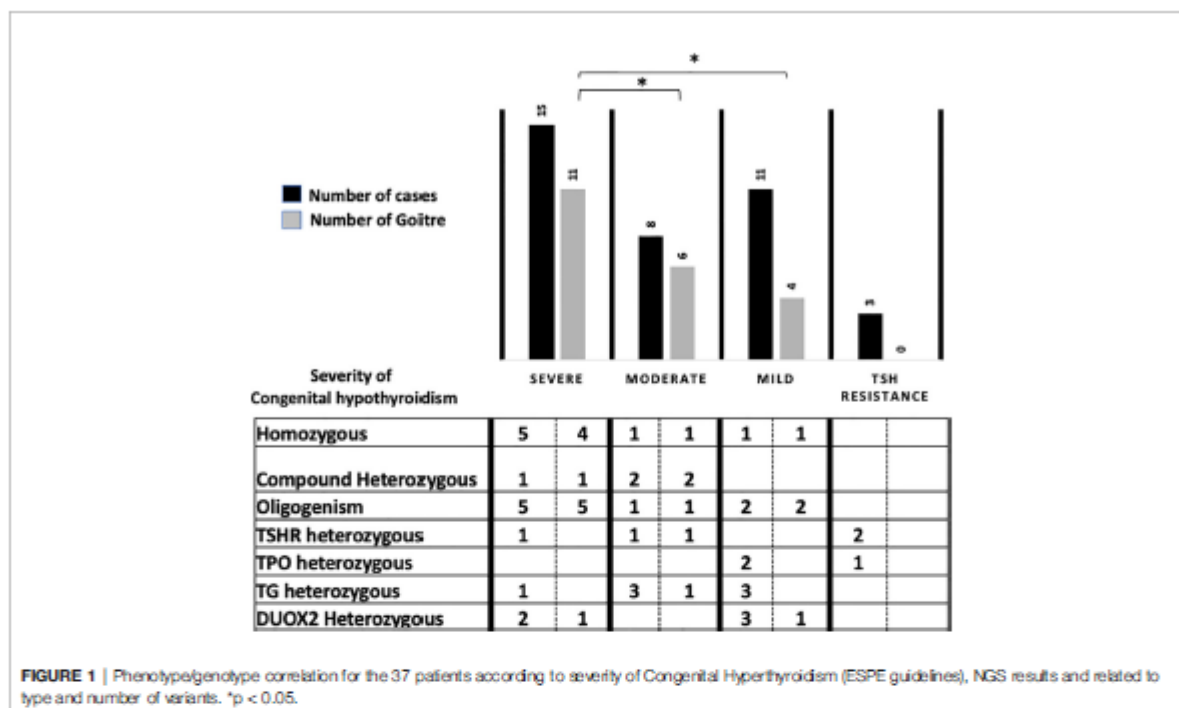
DISCUSSION

Early TDH diagnosis and treatment are essential for normal brain development and physical growth, but genetic and carrier

TABLE 1 | Genotypical data and inheritance for the 37 children diagnosed for TDH.

ID	Gene	acofntron	Nucleotide	Protein (zygosity)	dbSNP number	gnomAD	Pathogenicity	Maternal	Paternal	SIFT	Polyphen-2	Mutation/alter	Improved classification according to ACMG	Causative ACMG level	HGMD - first report	
																MAF
F11	DUO2	E22	c.2856_2880del	p.Phe669Serfs*23 (Het)	rs530719719	G002	P	WT	Het	WT	0	1	Disease-causing	P651+P93+P95	5	Morero, 2002, N Engl J Med
F12	DUO2	E22	c.2856_2880del	p.Phe669Serfs*23 (Het)	rs530719719	G002	P	Het	WT	Het	0	1	Disease-causing	P651+P93+P95	5	Morero, 2002, N Engl J Med
F21	DUO2	E22	c.2856_2880del	p.Phe669Serfs*23 (Het)	rs530719719	G002	P	Het	WT	Het	0	1	Disease-causing	P651+P93+P95	4	Morero, 2002, N Engl J Med
F30	DUO2/DUO2C	E5	c.490C>A	p.Ser189Arg (Homo)	rs370430048	G0003	LP	Het	Het	Het	0	1	Disease-causing	PM1+PM2+P93+P94	4	N/A
F36	DUO2	E16	c.3815-45 G>T	p.? (Het)	rs375943922	G00	LP	N/A	N/A	N/A	0	1	Disease-causing	PM2+P93+P94+P95	4	N/A
F37	DUO2	E20	c.3635G>A	p.Glu1219Glu (Het)	rs374590301	G00	LP	N/A	N/A	N/A	0	1	Disease-causing	PM1+PM2+P93+P95	4	Morero, 2000, J Clin Endocrinol Metab
F38-	DUO2/TPD	E29 (DUO2)	c.3786C>T	p.Arg1261Trp (Het oligo)	rs752431461	G00	LP	Het	WT	WT	0	1	Disease-causing	PM1+PM2+P93+P95	4	Wang, 2014, Clin Endocrinol
1		E9 (TPD)	c.1158T>A	p.Val400Asp (Het oligo)	N/A	N/A	LP	WT	Het	WT	0	1	Disease-causing	SP1+PM2+P93+P94+P95	4	N/A
F39-	DUO2/TPD	E29 (DUO2)	c.3786C>T	p.Arg1261Trp (Het oligo)	rs752431461	G00	LP	Het	WT	WT	0	1	Disease-causing	PM1+PM2+P93+P95	4	Wang, 2014, Clin Endocrinol
2		E9 (TPD)	c.1158T>A	p.Val400Asp (Het oligo)	N/A	N/A	LP	WT	Het	WT	0	1	Disease-causing	SP1+PM2+P93+P94+P95	4	N/A
F2	SLC24A5	E13	c.1581C>G	p.Tyr531Ile (Homo)	rs121903177	G00	P	Het	Het	Het	0	1	Disease-causing	PM51+PM2+P93+P95	5	Pulver, 1998, J Clin Invest
F13	ITG	E21	c.4481C>T	p.Pro1494Leu (Het)	rs148492331	G0009	MUS	Het	WT	WT	0	0.75	Disease-causing	SP1+PM2+PM3	3	Makrzhkaya, 2018, FEBS Lett
F18	ITG	E10	c.9996+103>A	p.? (Het)	rs374592355	G00	P	Het	WT	Het	0	0.9	Disease-causing	PM51+PM2+P93	5	Hermans, 2013, J Pediatr Endocrinol Metab
F18	ITG	E29	c.5485C>T	p.Arg1827Trp (Het)	rs148920115	G0002	LP	WT	Het	Het	0	0.9	Disease-causing	PM2+P93+P94+P95	4	N/A
F24	ITG	E11	c.2787G>A	p.Lys2848Metfs*17 (Het)	N/A	N/A	LP	WT	Het	WT	0	1	Disease-causing	PM51+PM2	4	N/A
F29	ITG	E44	c.1964T>A	p.Leu2947Gln (Het)	rs2979062	G0003	MUS	WT	Het	Het	0	0.95	Disease-causing	SP1+P93+P94+P95	3	Nichols, 2016, J Clin Endocrinol Metab
F31	ITG	E22	c.4990C>T	p.Arg1837 (Het)	rs121912646	G0001	P	N/A	N/A	N/A	0	1	Disease-causing	PM51+PM2+P93+P95	5	Tegoniak, 1993, J Clin Endocrinol Metab
F33	ITG	E10	c.1676G>A	p.Trp1862 (Het)	N/A	N/A	P	N/A	N/A	N/A	0	1	Disease-causing	PM51+PM2+P93	5	N/A
F10	ITG/DUO2C	E6 (ITG)	c.1806G>A	p.Gly933Arg (Het oligo)	rs2936948	G0110	LP	WT	Het	Het	0	0.99	Disease-causing	PM2+P93+P94+P95	4	deFappa, 2017, Hum Mol Genet
		E11 (DUO2)	c.4196G>A	p.Gly1395Ser (Het oligo)	rs139594933	G0003	LP	Het	WT	WT	0	1	Disease-causing	PM51+P93+P94+P95	4	Tan, 2016, Hum Mol Genet
F20	ITG/DUO2C	E3 (ITG)	c.1886G>A	p.Gly937Ser (Het oligo)	rs116340633	G0110	P	Het	WT	WT	0	1	Disease-causing	SP1+P93+P94+P95	3	deFappa, 2017, Hum Mol Genet
		E11 (DUO2)	c.2856_2880del	p.Phe669Serfs*23 (Het oligo)	rs530719719	G002	P	WT	Het	Het	0	1	Disease-causing	PM51+P93+P95	5	Morero, 2002, N Engl J Med
F7	ITG/DUO2C	E10 (ITG)	c.2081G>T	p.Gly934Asn (Het oligo)	rs181010594	G00	LP	Het	WT	WT	0	1	Disease-causing	P91+P93+P94+P95	4	N/A
		E10 (DUO2)	c.2957T>G	p.Met989Arg (Het oligo)	rs303948626	G0003	LP	WT	Het	WT	0	1	Disease-causing	PM1+PM2+P93+P94+P95	4	Mazza, 2013, J Clin Endocrinol Metab
F9	ITG/DUO2C	E7 (ITG)	c.3290T>C	p.Arg1787Met (Het oligo)	rs112746206	G0003	MUS	Het	WT	WT	0	1	Disease-causing	SP1+P93+P94+P95	3	N/A
		E15 (DUO2)	c.3907G>A	p.Asn1237Trp (Het oligo)	rs116352934	G0003	MUS	Het	Het	Het	0.99	1	Disease-causing	SP1+P93+P94+P95	3	Hin, 2013, J Pediatr Endocrinol
F1	ITG/TG	E47	c.1813A>T	p.Lys2711Ile (Homo)	N/A	N/A	P	Het	Het	Het	0	0.99	Disease-causing	PM51+PM2+P93+P95	5	N/A
F28	ITG/TG	E7	c.899C>T	p.Arg2561 (Homo)	rs121912646	G0004	P	Het	Het	Het	0	1	Disease-causing	PM51+PM2+P93+P95	5	Van de Graaf, 1999, J Clin Endocrinol Metab
F3	ITG/TG	E5	c.2292G>A	p.Gly1738 (Comp Het)	rs142268837	G0007	MUS	Het	WT	WT	0	1	Disease-causing	SP1+P93+P94+P95	3	Van de Graaf, 1999, J Clin Endocrinol Metab
		E41	c.7123G>A	p.Gly1738Arg (Comp Het)	rs131284434	G0002	LP	Het	WT	Het	0	1	Disease-causing	SP1+PM2+P93+P94+P95	4	Van de Graaf, 1999, J Clin Endocrinol Metab
F4	ITG/TG	E5	c.2292G>A	p.Gly1738 (Comp Het)	rs142268837	G0007	MUS	WT	Het	Het	0	1	Disease-causing	SP1+P93+P94+P95	3	Van de Graaf, 1999, J Clin Endocrinol Metab
		E6	c.4193G>A	p.Trp1397 (Comp Het)	rs141305917	G0001	P	Het	WT	WT	0	1	Disease-causing	PM51+PM2+P93+P95	5	Hoburn, 2006, J Clin Endocrinol Metab
F23	ITG/TPD	E9 (ITG)	c.1399G>A	p.Arg1787Met (Het oligo)	rs303948626	G0115	LP	Het	WT	WT	0	0.99	Disease-causing	PM2+P93+P94+P95	4	deFappa, 2017, Hum Mol Genet
		E13 (TPD)	c.2086G>A	p.Asp186Asn (Het oligo)	rs73759871	G00	P	WT	Het	Het	0	1	Disease-causing	PM51+PM2+PM3+P93	5	N/A
F8	ITG/TPD	E10 (ITG)	c.2610G>T	p.Glu1073fs (Het oligo)	rs2223943	G0042	LP	WT	Het	Het	0	0.96	Polymorphism	PM2+P93+P94+P95	4	N/A
		E14 (TPD)	c.2610G>A	p.Gly1073fs (Het oligo)	N/A	N/A	LP	Het	WT	WT	0	0.99	Disease-causing	PM1+PM2+P93+P94	4	N/A
F22	TPD	E9	c.1399G>A	p.Arg1787Met (Het)	rs303948626	G0002	LP	N/A	N/A	N/A	G01	0.94	Polymorphism	PM2+P93+P94+P95	4	N/A
F26	TPD	E9	c.1399G>A	p.Arg1787Met (Het)	rs303948626	G0002	LP	WT	Het	Het	G01	0.94	Polymorphism	PM2+P93+P94+P95	4	N/A
F5	TPD	E14	c.2422G>A	p.Cys1834Metfs*24 (Het)	rs70382774	G0003	P	WT	Het	Het	0	1	Disease-causing	PV51+PM2+P93+P95	5	Sköber, 2000, J Clin Endocrinol Metab
F19	TPD/TPD	E11	c.1678C>G	p.Glu1900Lys (Comp Het)	rs121903093	G0002	P	Het	WT	WT	0	1	Disease-causing	SP1+PM2+P93+P95	5	Sköber, 1998, Clin Endocrinol
		E14	c.2588G>C	p.Glu1900Lys (Comp Het)	N/A	N/A	LP	WT	Het	WT	0	1	Disease-causing	SP1+PM1+PM2+P93+P95	4	Sköber, 1998, Hum Mut
F28	TPD/TPD	E6	c.1197G>C	p.Ser388Trp (Homo)	N/A	N/A	P	Homo	WT	WT	0	0.94	Disease-causing	SP1+PM2+PM3+P93+P95	5	N/A
		E17	c.2749-	p.? (Homo)	N/A	N/A	MUS	Het	Het	Het	0	1	Disease-causing	SP1+PM2+PM3+P93+P95	3	N/A
F25	TPD/TPD	E6	c.3675A>G	p.Asn126Lysfs*10 (Homo)	rs79638662	G00	P	Het	Het	Het	0	1	Disease-causing	PV51+PM2+P93+P95	5	Rivola, 2003, Hum Mut
		E2	c.202C>T	p.Pro92Ser (Het)	rs142003491	G0004	P	Het	WT	WT	0	1	Disease-causing	SP1+PM2+P93+P94+P95	5	Terenbaum-Rakover, 2009, J Clin Endocrinol Metab
F15	TPSH	E11	c.1346G>A	p.Arg160Ile (Het)	rs185281836	G0003	P	Het	WT	WT	0	1	Disease-causing	SP1+PM2+P93+P94+P95	5	Terenbaum-Rakover, 2015, Thyroid
F34	TPSH	E11	c.1615G>A	p.Arg230Ile (Het)	rs151264746	G00	LP	WT	Het	WT	0	1	Disease-causing	SP1+PM2+P93+P94	4	N/A
F6	TPSH	E11	c.1346G>A	p.Arg160Ile (Het)	rs185281836	G0003	P	Het	WT	WT	0	1	Disease-causing	SP1+PM2+P93+P94+P95	5	Terenbaum-Rakover, 2015, Thyroid

WT, wild type; homo, homozygous; Het, heterozygous; Comp Het, compound heterozygous; Het Oligo, oligonucleotide; LP, likely pathogenic; PV5, variant of uncertain significance; TG, thyroglobulin; TPD, thyroparathyroid; TPH, TPH receptor; IC546, autosomal recessive form of TDH; DUO2, dual oxidase 2; N/A, not available.



identification encourage familial counselling and can allow for delaying the decision to treat for 3 years. Over the past two decades, the increased incidence of TDH associated with the high heterogeneity of its biological spectrum has been investigated. Relative to the technical limitations of direct sequencing for diagnosis, recent studies have demonstrated the efficiency of next-generation sequencing technology for CH screening (4, 6, 8, 19, 20). Our study exploring 65 patients identified by the French neonatal screening program in one reference centre showed that, for predominantly non-consanguineous families of different ethnic origins, familial TDH was frequent in France (56.9%). Irrespective of biological CH severity, we also observed that goiter was mainly associated with familial TDH (56.7%) compared to infants negative for ACMG variant classes 3 to 5, as a relevant clinical sign to ask for a genetic investigation. As previously described, we identified that homozygous variants in *TG*, *TPO*, and *SLC5A5* and oligogenicity were associated with goiter and severe CH whereas monoallelic variants in *TSHR*, *TG*, *DUOX2*, and *TPO* were related to milder phenotypes (21, 22). Inactivating heterozygous *TSHR* variants were present in 10.8% (4/37 cases) of our TDH cases with a heterogeneous clinical presentation: CH severity was inconstant, especially for the hot spot variant Arg450His leading to both subclinical (F6) and severe CH (F15). These results were in accordance with previous recommendations for systematic molecular analysis of the *TSHR* gene for CH with TSH resistance presentation (23). Thus, genetic exploration of TDH should be now considered as necessary as that for thyroid dysgenesis after neonatal screening.

In our study, monoallelic *DUOX2* variants were as frequent as monoallelic *TPO* variants, but were also more frequently involved

through an oligogenic mechanism. *DUOX2* variants are associated with high phenotypic variability from transient to permanent CH and sometimes there is a difference in CH severity for the same variant (24). We observed the same variability from severe to mild or transient CH for infants in our study without a convincing hypothyroidism being found in the carrier parent. The presence of two *DUOX* isoforms could constitute an efficient redundant mechanism to maintain sufficient H₂O₂ supply for iodide organification. Thus, transient CH could be related to the difference in thyroid hormone requirements from the neonatal period to adulthood with sufficient H₂O₂ supply by *DUOX1* only after the infantile period (5, 25, 26).

The contribution of oligogenic variants was frequent (21.6%) in our study, with diverse CH severity. Our results are consistent with the recent study of de Filippis and colleagues presenting frequent oligogenic inheritance (26.2%) in CH patients with either gland-in-situ or dysgenesis (6). In such cases, heterozygous variants in several genes can lead to cross-loss of enzyme activity (27, 28). Thus, monoallelic variants in the *TG* gene suggest that the oligogenic mechanism could be related to previous questionable CH cases with apparently unique heterozygous variants in the *TG* gene on direct sequencing (29). By exploring oligogenic inheritance, we showed that this mechanism was responsible for TDH with a significant association with severe CH and goiter. This oligogenic model could also explain differences in the penetrance and expressivity of CH in some families.

Our NGS design was able to detect CNV, intronic and proximal regulatory variants in the chromosomal region of the

TABLE 2 | Clinical and biological data for the 37 children diagnosed for TDH.

ID	Sex	Serum TSH (confirmation)	Serum FT4	Thyroid Evaluation	CH Severity	Zygoty	Gene	Permanent/transient
F11	F	109	3.4	Goitre	Severe	Het	<i>DUOX2</i>	Transient
F12	F	92	12	Eutopic	Mild	Het	<i>DUOX2</i>	Transient
F21	M	74	15	Eutopic	Mild	Het	<i>DUOX2</i>	Transient
F30	M	>300	3.4	Goitre	Severe	Homo	<i>DUOX2/DUOX2</i>	Permanent
F36	F	76	13	Goitre	Mild	Het	<i>DUOX2</i>	Transient
F37	F	640	2.6	Ectopia	Severe	Het	<i>DUOX2</i>	Permanent
F32-1	M	227	3.5	Goitre	Severe	Oligo	<i>DUOX2/TPO</i>	Permanent
F32-2	M	327	3.5	Goitre	Severe	Oligo	<i>DUOX2/TPO</i>	Permanent
F2	M	>150	1.7	Goitre	Severe	Homo	<i>SLC5A5/SLC5A5</i>	Permanent
F13	F	12	9.1	Eutopic	Moderate	Het	<i>TG</i>	Permanent
F16	M	>100	4.4	Eutopic	Severe	Het	<i>TG</i>	Permanent
F18	M	12	7	Eutopic	Moderate	Het	<i>TG</i>	Permanent
F24	M	150	5.6	Goitre	Moderate	Het	<i>TG</i>	Permanent
F29	M	34	14.3	Eutopic	Mild	Het	<i>TG</i>	Permanent
F31	M	26	14.2	Eutopic	Mild	Het	<i>TG</i>	Permanent
F33	F	95	11.2	Eutopic	Mild	Het	<i>TG</i>	Permanent
F10	M	128	7	Goitre	Moderate	Oligo	<i>TG/DUOX2</i>	Permanent
F20	F	300	4.4	Goitre	Severe	Oligo	<i>TG/DUOX2</i>	Permanent
F7	M	13	15	Goitre	Mild	Oligo	<i>TG/DUOX2</i>	Permanent
F9	M	62	10	Goitre	Mild	Oligo	<i>TG/DUOX2</i>	Permanent
F1	F	>500	4.3	Goitre	Severe	Homo	<i>TG/TG</i>	Permanent
F28	M	>180	3.7	Goitre	Severe	Homo	<i>TG/TG</i>	Permanent
F3	M	N/A	8.6	Goitre	Moderate	HetComp	<i>TG/TG</i>	Permanent
F4	M	173	5.1	Goitre	Moderate	HetComp	<i>TG/TG</i>	Permanent
F23	M	>100	1.6	Goitre	Severe	Oligo	<i>TG/TPO</i>	Permanent
F8	F	700	1.2	Goitre	Severe	Oligo	<i>TG/TPO</i>	Permanent
F22	F	N/A	11.9	Eutopic	Mild	Het	<i>TPO</i>	Permanent
F25	F	29	13.6	Eutopic	Mild	Het	<i>TPO</i>	Permanent
F5	M	13	18.2	Eutopic	TSH resistance	Het	<i>TPO</i>	Permanent
F19	F	>100	2	Goitre	Severe	HetComp	<i>TPO/TPO</i>	Permanent
F26	F	>150	2.9	Eutopic	Severe	Homo	<i>TPO/TPO</i>	Permanent
F27	F	N/A	8.7	Goitre	Moderate	Homo	<i>TPO/TPO</i>	Permanent
F35	M	24.2	12.6	Goitre	Mild	Homo	<i>TPO/TPO</i>	Permanent
F14	F	44	20.6	Hypo	TSH resistance	Het	<i>TSHR</i>	Permanent
F15	M	447	2.2	Eutopic	Severe	Het	<i>TSHR</i>	Permanent
F34	F	61	8.6	Goitre	Moderate	Het	<i>TSHR</i>	Permanent
F6	M	50	16.6	Hypo	TSH resistance	Het	<i>TSHR</i>	Permanent

Severity of disease is defined on FT4 levels at the age of 10 days according to ESPE consensus criteria in mild, moderate or severe (respectively in clear, gray, or black); severe, <5 pmol/L; moderate, 5–10 pmol/L; mild, 10–15 pmol/L. Serum TSH at confirmation, IU/mk; FT4, pmol/L.

Hom, homozygous; Het, heterozygous; HetComp, compound heterozygous; Oligo, oligogenic; TG, thyroglobulin; TPO, thyroperoxidase; TSHR, TSH receptor; SLC5A5, sodium/iodide symporter (NIS); DUOX2, dual oxidase 2; N/A, not applicable.

genes explored. None of these anomalies was detected in our families. This modern genetic testing has demonstrated that complex mechanisms can be frequently involved in the phenotypic heterogeneity of CH, even if the presence of additional variants on non-explored chromosomes or epigenetic regulation could not be excluded (30). We recommend increasing the diagnostic efficiency of CH by screening a large panel of genes involved in thyroid genesis, hormone synthesis and action from the TDH diagnosis. In accordance with recent recommendations from the ENDO-European Reference Network (30), we confirm that targeted-NGS or WES analyses for documented families should be used to

improve CH diagnosis and treatment. Thus, except for the *DUOX2* heterozygous variant, infants with TDH and positive for deleterious variants did not need a diagnostic re-evaluation between two- and three-years age.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data for this study have been deposited in the European Nucleotide Archive (ENA) at EMBL-EBI under accession number PRJEB42793.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by DC-2015-2450 Biological Resource Center of Toulouse Hospital. Written informed consent to participate in this study was provided by the participants' legal guardian/next of kin.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors provided contributions to study conception and design, acquisition and interpretation of data, and drafting the article. Most contributions in design of the study: IO-P and FS. Data collection: IO-P, TE, MB, SG and AC. Analysis of data: FS

REFERENCES

- Oliver-Petit I, Lobinet E, Gennero I, Edouard T, Cartault A, Tauber M. Recent Incidence of Congenital Hypothyroidism in Midi-Pyrenees Region. *Ann Endocrinol* (2016) 76:317. doi: 10.1016/j.ando.2015.07.081
- Barry Y, Bonaldi C, Goulet V, Coutant R, Léger J, Paty A-C, et al. Increased Incidence of Congenital Hypothyroidism in France From 1982 to 2012: A Nationwide Multicenter Analysis. *Ann Epidemiol* (2016) 26:100–5e4. doi: 10.1016/j.annepidem.2015.11.005
- Saba C, Guilmin-Crepon S, Zénaty D, Marinerie I, Paulsen A, Simon D, et al. Early Determinants of Thyroid Function Outcomes in Children With Congenital Hypothyroidism and a Normally Located Thyroid Gland: A Regional Cohort Study. *Thyroid* (2018) 28:959–67. doi: 10.1089/thy.2018.0154
- Löf C, Patyra K, Kuulasmaa T, Vangipurapu J, Udeniensch H, Jaeschke H, et al. Detection of Novel Gene Variants Associated With Congenital Hypothyroidism in a Finnish Patient Cohort. *Thyroid* (2016) 26:1215–24. doi: 10.1089/thy.2016.0016
- Park K-J, Park H-K, Kim Y-J, Lee K-R, Park J-H, Park J-H, et al. Duox2 Mutations Are Frequently Associated With Congenital Hypothyroidism in the Korean Population. *Ann Lab Med* (2016) 36:145–53. doi: 10.3343/alm.2016.36.2.145
- Filippis T, Gelmini G, Paroboschi E, Vigone MC, Frenna MD, Marelli F, et al. A Frequent Oligogenic Involvement in Congenital Hypothyroidism. *Hum Mol Genet* (2017) 26:2507–14. doi: 10.1093/hmg/ddx145
- Nicholas AK, Serra EG, Cangul H, Alyaarubi S, Ullah I, Schoenmakers E, et al. Comprehensive Screening of Eight Known Causative Genes in Congenital Hypothyroidism With Gland-In-Situ. *J Clin Endocrinol Metab* (2016) 101:4521–31. doi: 10.1210/jc.2016-1879
- Fan X, Fu C, Shen Y, Li C, Luo S, Li Q, et al. Next-Generation Sequencing Analysis of Twelve Known Causative Genes in Congenital Hypothyroidism. *Clin Chim Acta* (2017) 468:76–80. doi: 10.1016/j.cca.2017.02.009
- Peters C, Nicholas AK, Schoenmakers E, Lyons G, Langham S, Serra EG, et al. Duox2/Duoxa2 Mutations Frequently Cause Congenital Hypothyroidism That Evades Detection on Newborn Screening in the United Kingdom. *Thyroid* (2019) 29:790–801. doi: 10.1089/thy.2018.0587
- van Trotsenburg AS, Stoupa A, Léger J, Rohrer TR, Peters C, Fugazzola L, et al. Congenital Hypothyroidism: A 2020 Consensus Guidelines Update An Endo-European REFERENCE NETWORK (ERN) Initiative Endorsed by the European Society for Pediatric Endocrinology and the European Society for Endocrinology. *Thyroid* (2021) 31:387–419. doi: 10.1089/thy.2020.0333
- Derouault P, Chazeix J, Rizzo D, Miressi F, Magdelaine C, Bourthoumieu S, et al. Covcopcan: An Efficient Tool to Detect Copy Number Variation From Amplicon Sequencing Data in Inherited Diseases and Cancer. *PLoS Comput Biol* (2020) 16:e1007503. doi: 10.1371/journal.pcbi.1007503
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics

and VJ. Manuscript writing: IO-P and FS. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by the European Intereg Poctefa Pipepred Project (2014-2020).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2021.657913/full#supplementary-material>

- and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* (2015) 17:405–24. doi: 10.1038/gim.2015.30
- Lee J, Di Jeso B, Arvan P. The Cholinesterase-Like Domain of Thyroglobulin Functions as an Intramolecular Chaperone. *J Clin Invest* (2008) 118:2950–8. doi: 10.1172/JCI35164
- Kanou Y, Hishinuma A, Tsunekawa K, Seki K, Mizuno Y, Fujisawa H, et al. Thyroglobulin Gene Mutations Producing Defective Intracellular Transport of Thyroglobulin Are Associated With Increased Thyroidal Type 2 Iodothyronine Deiodinase Activity. *J Clin Endocrinol Metab* (2007) 92:1451–7. doi: 10.1210/jc.2006-1242
- Hulur I, Hermanns P, Nestoris C, Heger S, Refetoff S, Pohlenz J, et al. A Single Copy of the Recently Identified Dual Oxidase Maturation Factor (Duoxa) 1 Gene Produces Only Mild Transient Hypothyroidism in a Patient With a Novel Biallelic DUOX2 Mutation and Monoallelic Duoxa1 Deletion. *J Clin Endocrinol Metab* (2011) 96:E841–5. doi: 10.1210/jc.2010-2321
- Romanet P, Osei L, Netchine I, Pertuit M, Enjalbert A, Reynaud R, et al. Case Report of GNAS Epigenetic Defect Revealed by a Congenital Hypothyroidism. *Pediatrics* (2015) 135:e079–83. doi: 10.1542/peds.2014-2806
- Ferrand M, Le Fourn V, Franc J-L. Increasing Diversity of Human Thyroperoxidase Generated by Alternative Splicing. Characterized by Molecular Cloning of New Transcripts With Single- and Multispliced Mmas. *J Biol Chem* (2003) 278:3793–800. doi: 10.1074/jbc.M209513200
- Le SN, Porebski BT, McCoey J, Fodor J, Riley B, Godlewski M, et al. Modelling of Thyroid Peroxidase Reveals Insights Into Its Enzyme Function and Autoantigenicity. *PLoS One* (2015) 10:e0142615. doi: 10.1371/journal.pone.0142615
- Muzza M, Rabbiosi S, Vigone MC, Zampronio I, Cirillo V, Maffini MA, et al. The Clinical and Molecular Characterization of Patients With Dysharmonogenic Congenital Hypothyroidism Reveals Specific Diagnostic Clues for DUOX2 Defects. *J Clin Endocrinol Metab* (2014) 99:E544–53. doi: 10.1210/jc.2013-3618
- Fu C, Wang J, Luo S, Yang Q, Li Q, Zheng H, et al. Next-Generation Sequencing Analysis of TSHR in 384 Chinese Subclinical Congenital Hypothyroidism (CH) and CH Patients. *Clin Chim Acta* (2016) 462:127–32. doi: 10.1016/j.cca.2016.09.007
- Bakker B, Bükker H, Vulsma T, de Randamie JS, Wiedijk BM, De Vrijlder JJ. Two Decades of Screening for Congenital Hypothyroidism in The Netherlands: TPO Gene Mutations in Total Iodide Organification Defects (An Update). *J Clin Endocrinol Metab* (2000) 85:3708–12. doi: 10.1210/jcem.85.10.6878
- Targovnik HM. Importance of Molecular Genetic Analysis in the Diagnosis and Classification of Congenital Hypothyroidism. *Endocrine* (2014) 45:163–4. doi: 10.1007/s12020-013-0075-z
- Persani L, Calebiro D, Cordella D, Weber G, Gelmini G, de Filippis T, et al. Genetics and Phenomics of Hypothyroidism Due to TSH Resistance. *Mol Cell Endocrinol* (2010) 322:72–82. doi: 10.1016/j.mce.2010.01.008
- Jiang H, Wu J, Ke S, Hu Y, Fei A, Zhen Y, et al. High Prevalence of DUOX2 Gene Mutations Among Children With Congenital Hypothyroidism in Central China. *Eur J Med Genet* (2016) 59:526–31. doi: 10.1016/j.jmg.2016.07.004

25. De Deken X, Miot F. Duox2 Defects and Their Roles in Congenital Hypothyroidism. *Methods Mol Biol* (2019) 1982:667–93. doi: 10.1007/978-1-4939-9424-3_37
26. Srichomkwan P, Takamatsu J, Nickerson DA, Bamshad MJ, Chong JX, Refetoff S. Duox2 Gene Mutation Manifesting as Resistance to Thyrotropin Phenotype. *Thyroid* (2017) 27:129–31. doi: 10.1089/thy.2016.0469
27. Vockley J. Metabolism as a Complex Genetic Trait, a Systems Biology Approach: Implications for Inborn Errors of Metabolism and Clinical Diseases. *J Inher Metab Dis* (2008) 31:619–29. doi: 10.1007/s10545-008-1005-8
28. Sriprapradang C, Tenenbaum-Rakover Y, Weiss M, Barkoff MS, Admoni O, Kawthar D, et al. The Coexistence of a Novel Inactivating Mutant Thyrotropin Receptor Allele With Two Thyroid Peroxidase Mutations: A Genotype-Phenotype Correlation. *J Clin Endocrinol Metab* (2011) 96:E1001–6. doi: 10.1210/jc.2011-0127
29. Targovnik HM, Citterio CE, Rivolta CM. Thyroglobulin Gene Mutations in Congenital Hypothyroidism. *Horm Res Paediatr* (2011) 75:311–21. doi: 10.1159/000324882
30. Fugazzola L, Cerutti N, Mannavola D, Vanmucchi G, Fallini C, Persani L, et al. Monoallelic Expression of Mutant Thyroid Peroxidase Allele Causing Total Iodide Organification Defect. *J Clin Endocrinol Metab* (2003) 88:3264–71. doi: 10.1210/jc.2002-021377

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Oliver-Petit, Edouard, Jacques, Bournez, Cartault, Grunewald and Sauvageur. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Titre : Interaction épigénétique et régulation métabolique dans les modèles des populations stromales mésenchymateuses et des cellules tumorales circulantes

Mots clés : épigénétique, métabolisme, cellules stromales mésenchymateuses, cellules tumorales, TNE

Résumé : Le métabolisme énergétique et l'épigénétique sont hautement interconnectés, le métabolisme fournissant les composés nécessaires pour les réactions épigénétiques, et ces modifications épigénétiques régulant à leur tour l'expression des gènes en fonction des besoins énergétiques de la cellule. Cette interaction est cruciale pour le fonctionnement normal des cellules et peut également jouer un rôle dans le développement de maladies lorsque ces mécanismes sont perturbés. Nous avons exploré deux modèles de pathologies pour préciser ces interconnexions, le modèle des thérapies cellulaires dans l'insuffisance cardiaque et le modèle des thérapies métaboliques dans le cadre des tumeurs neuroendocrines digestives. Dans le tissu cardiaque, les cellules progénitrices mésenchymateuses stromales (MSCs) jouent un rôle clé dans l'homéostasie et la réparation du tissu cardiaque. Les fonctions cellulaires et le potentiel de différenciation de ces cellules sont fortement dépendants du métabolisme énergétique. Au cours du vieillissement, le nombre et la potentialité de ces MSCs varient en lien avec l'apparition de désordres métaboliques jouant un rôle clé dans la lignée et l'issue fonctionnelle de ces cellules. Toutes modifications du métabolisme énergétique et de la dynamique mitochondriale sont ainsi associées au risque de vieillissement cardiaque accéléré et à l'infarctus. Parmi les moyens thérapeutiques de l'insuffisance cardiaque les cellules souches mésenchymateuse de la moelle osseuse (bmMSC) présentent un faible risque de rejet, un fort pouvoir d'expansion in vitro et ayant des capacités à migrer vers les sites lésés de l'organisme pour participer à l'homéostasie et à la régénération tissulaire. En revanche, elles présentent une faible différenciation in vivo et une survie limitée dans l'environnement hypoxique cardiaque après transplantation. Notre objectif a été d'améliorer la survie des bmMSC au sein du tissu cardiaque en les orientant vers un métabolisme glycolytique à l'aide d'un conditionnement épigénétique ou en réalisant un tri métabolique. L'analyse comparative de ces deux approches nous a permis de confirmer l'intérêt métabolique des bmMSC glycolytique in vitro et in vivo dans un modèle de souris présentant une insuffisance cardiaque aigue. Dans le modèle des tumeurs neuroendocrines digestives nous avons exploré les marqueurs de toxicité de la radiothérapie interne vectorisée ou PRRT. Ce traitement utilise des isotopes radioactifs qui se lient spécifiquement aux récepteurs de surface des cellules tumorales neuroendocrines afin de les détruire. Les modifications épigénétiques et métaboliques jouent un rôle important dans la sensibilité des cellules tumorales à la PRRT. Comprendre ces interactions métaboliques est une piste pour optimiser les protocoles de PRRT pour un traitement efficace tout en limitant leur toxicité hématologique. Nous avons développé des marqueurs ARNm et miRNA ciblant notamment le métabolisme énergétique et son interaction avec les modificateurs d'histones afin de proposer une signature de réponse et de suivi de la PRRT pour des patients atteints de tumeurs neuroendocrines digestives progressives. La combinaison de marqueurs miRNA et ARNm est particulièrement pertinente dans les boucles de contrôles métaboliques et présentent une bonne sensibilité de réponse ceci dès la seconde ligne de traitement. Notre travail d'exploration des liens entre le métabolisme cellulaire et les modifications épigénétiques nous a permis de proposer un modèle thérapeutique pour l'insuffisance cardiaque et des biomarqueurs de sensibilité à une thérapie métabolique ciblée.

Title: Epigenetic interaction and metabolic regulation in models of mesenchymal stromal populations and circulating tumor cells

Key words: epigenetic, metabolism, MSC, tumoral cell, NET

Abstract: Energy metabolism and epigenetics are highly interconnected, with metabolism providing the necessary compounds for epigenetic reactions, and these epigenetic modifications in turn regulating gene expression according to the energy needs of the cell. This interaction is crucial for the normal functioning of cells and can also play a role in the development of diseases when these mechanisms are disrupted. We explored two pathology models to clarify these interconnections, the model of cellular therapies in heart failure and the model of metabolic therapies in the context of digestive neuroendocrine tumors. In cardiac tissue, mesenchymal stromal progenitor cells (MSCs) play a key role in cardiac tissue homeostasis and repair. Cellular functions and the differentiation potential of these cells are strongly dependent on energy metabolism. During aging, the number and potential of these MSCs vary in relation to the appearance of metabolic disorders playing a key role in the lineage and functional outcome of these cells. All changes in energy metabolism and mitochondrial dynamics are thus associated with the risk of accelerated cardiac aging and infarction. Among the therapeutic means of heart failure, bone marrow mesenchymal stem cells (bmMSC) present a low risk of rejection, a strong capacity for expansion in vitro and having the capacity to migrate towards damaged sites in the body to participate in homeostasis and tissue regeneration. On the other hand, they exhibit poor differentiation in vivo and limited survival in the cardiac hypoxic environment after transplantation. Our objective was to improve the survival of bmMSCs within cardiac tissue by directing them towards glycolytic metabolism using epigenetic conditioning or by performing metabolic sorting. The comparative analysis of these two approaches allowed us to confirm the metabolic interest of glycolytic bmMSCs in vitro and in vivo in a mouse model presenting acute heart failure. In the model of digestive neuroendocrine tumors we explored the toxicity markers of vectorized internal radiotherapy or PRRT. This treatment uses radioactive isotopes that bind specifically to the surface receptors of neuroendocrine tumor cells in order to destroy them. Epigenetic and metabolic modifications play an important role in the sensitivity of tumor cells to PRRT. Understanding these metabolic interactions is an avenue for optimizing PRRT protocols for effective treatment while limiting their hematological toxicity. We have developed mRNA and miRNA markers targeting energy metabolism and its interaction with histone modifiers in order to provide a response and monitoring signature for PRRT for patients with progressive digestive neuroendocrine tumors. The combination of miRNA and mRNA markers is particularly relevant in metabolic control loops and presents good response sensitivity from the second line of treatment. Our work exploring the links between cellular metabolism and epigenetic modifications has allowed us to propose a therapeutic model for heart failure and biomarkers of sensitivity to targeted metabolic therapy.