amU
Aix Marseille Université

NNT : 0000AIXM0000

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
le 11 mars 2025 par

Samantha CONTE

Modélisation de la myocardite immuno-médiée dans des cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSC) : étude de la signalisation inflammatoire et rôle des cellules endothéliales

Discipline
Biologie Santé

Spécialité
Génomique et Bioinformatique

École doctorale
ED62 – Sciences de la vie et de la Santé

Laboratoire/Partenaires de recherche
C2VN – U1263 / TAGC – U1090

Composition du jury

Eric MOREL **Rapporteur**
Université Paris-Saclay, SPC

Jérôme THIREAU **Rapporteur**
Université de Montpellier, PhyMedExp

Claire CROLA DA SILVA **Examinatrice**
Université Lyon 1, CarMeN

Florence SABATIER **Présidente du jury**
Aix-Marseille Université, C2VN

Nathalie LALEVEE **Directrice de thèse**
Aix-Marseille Université, C2VN

Denis PUTHIER **Co-directeur de thèse**
Aix-Marseille Université, TAGC

C2VN
Centre de Recherche en CardioVasculaire et Nutrition

umr U 1090
TAGC
theories and approaches of genomic complexity

Affidavit

Je soussignée, Samantha Conte, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Nathalie Lalevée et Denis Puthier, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille, le 6 janvier 2025



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International.

Liste de publications et participation aux conférences

Liste des publications réalisées dans le cadre du projet de thèse :

Predominant Role of hiPSC-Derived Endothelial Cells in ICI-induced Myocarditis – *In progress*

S. Conte, I. Firoaguer, S. Lledo, T.T. Tran, R. Guieu, D. Puthier, E. Fenouillet, F. Thuny, J. Cautela and N. Lalevée

Participation aux conférences et écoles d'été au cours de la période de thèse :

Ecoles d'été

2nd ICI-CIVIS Summer School (Marseille, juillet 2023)
Organoid models in immuno-oncology

MarMaRa Summer School (Marseille, juillet 2022)
Rare Diseases at the Omics era: Current tools for frequent challenges

Conférences

Characterisation of inflammatory response associated with immune-related myocarditis in hiPSC-derived cardiomyocytes
Lledo S., **Conte S.**, Tran T.T., Vahdat J., Thuny F., Cautela J., Lalevée N.

- Symposium: PSC-BASED MODELS FOR CARDIAC BIOLOGY (Paris, ocotbre 2024)

Role of the NLRP3 inflammasome in myocarditis induced by immune checkpoint inhibitors cancer immunotherapy
Conte S., TT. Tran, Firoaguer I., Simoncini S., Robert S., El Yazidi C., Magdinier F., Puthier D., Thuny F., Cautela J., Lalevée N.

- MarMaRa Annual Symposium 2024 (Marseille, avril 2024) – Poster
- Printemps de la cardiologie 2024 (Lille, juillet 2024) – Poster
- 4ème journée des étudiants du C2VN (Marseille, septembre 2024) – Poster

Characterising the role of the NLRP3 inflammasome in ICI-induced myocarditis using hiPSC-derived endothelial cells from melanoma patients
Conte S., Tran TT., Rebaoui Z., Robert S., Cautela J., Puthier D., Thuny F., Lalevée N.

- The 4th annual scientific conference of the Institut Cancer et Immunologie (ICI) (Marseille, avril 2023) – Poster
- Printemps de la cardiologie (Marseille, mai 2023) – Poster FLASH (commenté)
- 30ème édition du colloque de l'école doctorale 62 (Marseille, mai 2023) – Poster

Cardiotoxicity is mediated by the NLRP3 inflammasome in hiPSC-derived endothelial cells from patients with immune checkpoint inhibitor-related myocarditis
Conte S., Tran T.T., Firoaguer I., Rebaoui Z., Robert S., Brotin E., Puthier D., Thuny F., Cautela J., Lalevée N.

- MarMaRa Annual Symposium (Marseille, juin 2023) – Communication orale
- 3ème journée des étudiants du C2VN (Marseille, septembre 2023) – Communication orale

Characterising the molecular and pathophysiological mechanisms of T cells associated with immune-related myocarditis.
Rebaoui Z., Tran TT., **Conte S.**, Robert S., Cautela J., Thuny F., Lalevee N.

- 2ème journée des étudiants du C2VN (Marseille, septembre 2022) – Poster
- 30ème édition du colloque de l'école doctorale 62 (Marseille, mai 2023) – Poster
- MarMaRa Annual Symposium (Marseille, juin 2023) – Poster
- 3ème journée des étudiants du C2VN (Marseille, septembre 2022) – Poster

Characterization of the inflammasome dependent IFN-γ in hiPSC-derived endothelial cells from ICIs-induced myocarditis patients
Conte S., Tran TT., Cautela J., Puthier D., Thuny F., Lalevée N.

- Printemps de la cardiologie 2022 (Tours, juin 2022) – Poster FLASH (commenté)
- 2ème journée des étudiants du C2VN (Marseille, septembre 2022) – Poster **Second Prix du Poster**

Etude des gènes et des voies de signalisation associés à la myocardite dans les PBMC de patients sous immunothérapie anti-PD-L1/anti-CTLA-4
Rebaoui Z., **Conte S.**, Cautela J., Torres M., Thuny F., Lalevée N

- 1ère Journée des étudiants du C2VN (Marseille, mai 2021)

Development of an *in vitro* model of immunotherapy-induced cardiotoxicity
Tran TT., **Conte S**., Cautela J., El Yazidi C., Magdinier F., Thuny F., Lalevée N

- MarMaRa Annual Symposium (Marseille, décembre 2020)

Adenosinergic System and Neurohumoral Syncope: What is the Link?
Guieu R., Fromonot J., Mottola G., Maille B., Marlinge M., Groppelli A., **Conte S**., Bechah Y., Lalevee N., Michelet P., Hamdan M., Brignole M., Deharo J.C.

Résumé

Les immunothérapies anticancéreuses de type inhibiteurs de points de contrôle immunitaire permettent de réactiver le système immunitaire pour combattre les cellules tumorales. Leur utilisation génère des effets indésirables immuno-médiés, dont des myocardites (MIM) létales dans 25-40 % des cas, et dont les mécanismes physiopathologiques demeurent mal compris.

L'objectif de ma thèse a été d'utiliser des cellules souches pluripotentes induites provenant de patients ayant ou non déclaré une MIM, différenciées en cellules endothéliales (hiPSC-EC) et en cardiomyocytes (hiPSC-CM), pour étudier la réponse immunitaire et inflammatoire associée à la MIM.

La comparaison des régulations transcriptomiques des hiPSC-EC et des hiPSC-CM a montré la très forte sensibilité des cellules endothéliales au traitement par les cytokines inflammatoires sécrétées au cours de la MIM, en particulier l'IFN-γ, comparé aux cardiomyocytes. Cette sensibilité se traduit par une plus forte mortalité des hiPSC-EC, associée à l'activation des caspases-1, -3 et -7, après stimulation. Une activation transcriptionnelle de la voie de l'inflammasome NLRP3, en réponse à l'IFN-γ, a été retrouvée dans les cellules cardiaques dérivées d'hiPSC, provenant de patients avec ou sans MIM. Ces cellules présentaient également des régulations spécifiques après stimulation.

En conclusion, ces travaux montrent l'intérêt du modèle de cellules hiPSC différenciées en cellules cardiaques pour mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques associés à la MIM. Ils mettent en avant le rôle important des cellules endothéliales dans cette cardiotoxicité, qui, par leur hypersensibilité aux cytokines inflammatoires, faciliteraient l'infiltration des cellules immunitaires dans le tissu myocardique. Enfin, on retrouve dans ce modèle cellulaire l'activation de l'inflammasome NLRP3, identifié dans les biopsies endomyocardiques des patients ayant déclaré une MIM.

Mots clés : Cardio-oncologie, Myocardite immuno-médiée, hiPSC-EC/CM, Interféron-γ, Inflammasome NLRP3, Régulation transcriptionnelle

Abstract

Immune checkpoint inhibitor cancer immunotherapies reactivate the immune system to fight tumor cells. Their use generates immuno-mediated adverse events, including myocarditis (IMM), which is lethal in 25-40% of cases, and for which the pathophysiological mechanisms remain poorly understood.

The aim of my thesis was to use induced pluripotent stem cells from patients with and without IMM, differentiated into endothelial cells (hiPSC-EC) and cardiomyocytes (hiPSC-CM), to study the immune and inflammatory response associated with IMM.

Comparison of the transcriptomic regulations in hiPSC-EC and hiPSC-CM showed the very high sensitivity of endothelial cells to treatment by inflammatory cytokines secreted during IMM, particularly IFN-γ, compared with cardiomyocytes. This sensitivity manifests in a higher mortality of hiPSC-ECs, associated with activation of caspases-1, -3 and -7, after stimulation. Transcriptional activation of the NLRP3 inflammasome pathway in response to IFN-γ was found in hiPSC-derived cardiac cells from patients with and without MIM. These cells also showed specific regulation after stimulation.

In conclusion, this work demonstrates the relevance of using hiPSC cells differentiated into cardiac cells to better understand the pathophysiological mechanisms associated with IMM. They highlight the important role played by endothelial cells in this cardiotoxicity, since their hypersensitivity to inflammatory cytokines facilitates the infiltration of immune cells into myocardial tissue. In addition, this cellular model shows activation of the NLRP3 inflammasome, identified in endomyocardial biopsies from patients with IMM.

Keywords: Cardio-oncology, Immuno-mediated myocarditis, hiSPC-EC/CM, Interferon-γ, NLRP3 inflammasome, Transcriptional regulation

Remerciements

À la fin de cette incroyable aventure qu'a été ma thèse, je prends un moment pour exprimer toute ma gratitude envers ceux qui ont joué un rôle clé dans ce parcours.

Tout d'abord, un grand merci à ma directrice de thèse, Nathalie Lalevée, de m'avoir donné l'opportunité de faire cette thèse sur ce beau (mais colossal) projet. Tes retours (parfois redoutés mais souvent constructifs) m'ont aidé à me surpasser depuis mon stage de master 1, je ne pensais pas être capable de tout cela. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir fait confiance. Ça n'aura pas été de tout repos : la Covid, les hiPSC, les déménagements, les travaux et les clims nous auront donné du fil à retordre, mais l'essentiel est là : nous nous en sommes sorties !

Merci également à Denis Puthier d'avoir accepté de co-diriger cette thèse, qui devait être bien plus bio-info qu'elle ne l'est vraiment. Les échantillons sont prêts au moment où je m'en vais, et pourtant, je n'ai fait que prolonger... ! Merci pour ton regard extérieur sur le projet et pour tes encouragements.

Je remercie grandement le Pr. Éric Morel et le Dr. Jérôme Thireau d'avoir accepté d'être mes rapporteurs de thèse et le docteur Claire Crola Da Silva d'avoir accepté d'examiner mes travaux. Je remercie aussi la Pr. Florence Sabatier d'avoir accepté d'être la présidente de ce jury de thèse.

A l'équipe 5 du C2VN :

Merci au Pr. Régis Guieu de nous demander, chaque jour, si « tutto bene », et à Giovanna d'être toujours de bonne humeur. A Christine, Nathalie, Giorgia, Claire et Nabil, cette fine équipe qui me fait beaucoup rire le midi, « la famille » comme dirait Nabil. Merci de m'avoir écoutée, conseillée et soutenue, notamment ces derniers mois. Camarade Farid, merci pour ta bonne humeur et de toujours avoir une blague à dire pour détendre l'atmosphère. A Jennifer, ta double casquette l'oblige, tu n'es pas souvent au labo, mais merci pour tes précieuses explications cliniques et tes conseils toujours bienveillants. Zohra, Isaure et Simon, je ne vous oublie pas : vous êtes juste un peu plus loin.

Un immense merci à Emmanuel d'avoir participé à toutes les réunions du mercredi, vous avez apporté un regard nouveau sur mes résultats, m'avez poussé dans mes retranchements et avez réussi à débloquer de nombreuses situations. Merci pour toute l'aide que vous m'avez apportée, jusqu'à la dernière minute.

Merci également à Stéphane Robert et Léa Plantureux, ainsi qu'à Stéphanie Simoncini, pour votre aide précieuse et votre gentillesse. Un grand merci aussi à Michel Pucéat de me permettre de finir ma thèse tout en mettant un pied dans le monde des cardioïdes.

Un très très grand merci à Emilie Brotin de m'avoir accueillie à Caen, pour ta gentillesse et ta bienveillance et pour toutes les adresses pour mes visites du week-end. Merci aussi pour ces trois semaines de manipes, et toutes les analyses, ça a été un vrai plaisir pour moi de travailler avec toi.

Aux membres du TAGC :

Un grand merci à Magali et Frédéric de m'avoir accueillie dans votre bureau pendant mon stage de M2, mais surtout pour vos conseils, votre gentillesse et votre bienveillance dès que je repassais vous faire un coucou. A Juliette, Katell, Mathieu et à tous les doctorants, toujours prêts à faire la fête aux beer sessions !

À ces collègues de labo et ces potes de fac qui sont finalement devenus mes amis :

À Thom, un immense merci pour tout ce que tu m'as enseigné, aussi bien scientifiquement que sur la vie en général. Même si ce n'a pas toujours été simple de se comprendre, tu m'as montré ce qu'était la recherche, en étant bienveillante, disponible et à l'écoute. Tu es une scientifique fascinante et une maman en or, je t'admire tellement !

À toi ma Zohra, de ton stage de M2 à nos soutenances de thèse, on revient de loin ! Merci d'avoir été là dans les moments les plus compliqués de ces 4 dernières années. Merci d'être restée si près de moi dans la tempête et d'avoir fait en sorte que mes journées soient ensoleillées. Merci d'être la femme que tu es, merci pour ces milliers de câlins, ta douceur, tes conseils et ta bienveillance. Je t'abandonne (physiquement) quelques mois avant la fin, mais je ne serai jamais bien loin de toi si tu en as besoin (et pas que pour faire des stats stp). Ne lâche rien, tu tiens le bon bout ! Hâte qu'on se retrouve dans 10, 20 ou 30 ans et qu'on se dise « Tu te souviens ? Ça n'aura pas été de tout repos, mais on y est arrivées ! ». Ton rire va tellement me manquer.

À Isaure, pour ton soutien et ces appels du matin au soir quand on en avait besoin. À ces soirées et ces fous rires. À ton plongeon, qui restera à jamais gravé dans nos mémoires. Sans toi, rien n'aurait été pareil ces deux dernières années. Merci pour la personne que tu es. N'oublie jamais à quel point tu es forte et courageuse ; tu nous l'as prouvé plus d'une fois.

À Simon (aussi couramment appelé Dr. ou Sim le bg, comme dans tous TES dossiers sur MES clés USB), merci de m'avoir fait comprendre tout un tas de choses qui te semblaient si normales et qui, pourtant, ne l'étaient pas pour moi. Merci pour ces milliers de répétitions en tout genre, ta patience quand j'en ai très peu, pour ta bonne humeur et ta bienveillance, au labo comme dans la vie. Merci pour ces tonnes de réels de pages douteuses partagés, ces bols de riz bien trop tard dans la nuit et ces parts de quiche bien trop tôt dans la journée. Merci d'avoir toujours été là quand j'en avais besoin ces derniers mois c'est beaucoup grâce à toi que j'ai tenu le coup. Bon courage pour les deux prochaines années :petite tape du bout des doigts sur l'épaule:, tu sais que je ne serais jamais très loin si tu as besoin de moi (pour la science mais dans la vie aussi), même si je sais que ça y est tu te débrouilles très bien sans moi, maintenant que tu connais tes protocoles (presque) par cœur. Tu le sais déjà, tu es brillant, juste : n'oublie pas de croire en toi.

À Julia (couramment appelée Dr., mais qui l'est vraiment pour le coup), tu as débarqué au 10ème en janvier dernier et pourtant on a déjà vécu tellement de péripéties ! Merci à Julio pour tous ces horoscopes et ces astro. À tes punchlines, la montagne de Kinder Surprises consommée, la compagnie dans le P2 et toutes ces centri lancées. Merci aussi pour toutes ces confidences et d'avoir été là pour me serrer dans tes bras quand ça n'allait pas fort. Gros bigup à ce ventrigliss dans le couloir du 10ème, au déplacement des -80° qui surchauffaient en été, et à ce tout tout petit ventilateur à notre disposition.

Merci à vous 4 d'avoir si souvent séché mes larmes, mais : « Ne vous inquiétez pas, ça va, je suis juste un peu fatiguée. » Vous avez égayé mes journées et mes nuits.

À Héloïse, mon petit soleil, toujours prête à rire, faire la fête et à me raconter tes aventures plus folles les unes que les autres. À Julie, merci pour les bases de cytométrie, mais surtout, merci de m'avoir écoutée, donné tant de conseils, et merci pour toutes ces soirées et ces moments de vie partagés. À Mathis, merci pour tous les moments de vie depuis le M1, malgré toutes les épreuves qu'on a traversées. Petite pensée à ces randos où je râlais bien trop, à mon vertige et à ta patience légendaire, à toutes ces avant-premières, ces pâtes carbos et MacDos bien entendus. Un merci tout particulier à Mathieu pour ces cours de stat partagés, petite pensée à mon pied cassé, ces fous rires et ces confessions par notes interposées.

And the last but not least: ma Ju! Certainement LA rencontre de ma vie. Merci pour ton soutien sans faille au quotidien depuis deux ans. Deux ans avec toi c'est finir tes plats au restau, deux jolis voyages, casser le dancefloor, regarder la Star Ac, ou encore écouter tes playlists interminables de 19h. Mais c'est aussi, et surtout, des câlins, des sourires, des fous rires, et des centaines de milliers de TikToks partagés. Merci de m'avoir laissée entrer dans ta bulle ; j'ai pu voir à quel point c'est joli à l'intérieur. Merci d'être la femme incroyable que tu es et de trouver les mots pour me remotiver, même quand c'est dur pour toi. Tu répares, chaque jour, des petits bouts de mon cœur. Je pars sans crainte à tes côtés découvrir l'Amérique du Sud. Je suis sûre et certaine que la vie nous réserve plein de jolies aventures. Et puis, quand on est toutes les deux, on est invincibles. Dans le pire des cas, si ce n'est pas une bonne idée, ça sera une bonne histoire à raconter !

<u>À ma famille et ces amis qui sont aussi la famille :</u>

À vous, Math, mamie, tonton, Nanie et Léo, merci pour ce cocon familial sur lequel je sais que je pourrai toujours compter. À Lydie, qui sait trouver les bons mots quand ça ne va pas fort, et à Kevin d'avoir toujours plein de questions à me poser sur ce que je fais au labo. Un grand merci aussi à mon père et à ma belle-mère de m'avoir écoutée et soutenue.

Mais le plus grand des mercis revient à la meilleure maman du monde. Merci pour tout ce que tu as fait pour nous, d'avoir été et de toujours être là, à n'importe quelle heure du jour ou de la nuit.

À cette bande de zozo qui survit aux années depuis le lycée, toujours prête à faire des folies folles : des milliers de mercis. Plus particulièrement, un merci à Zezette et à Amo de m'avoir écoutée remettre ma vie en question des nuits entières, mais aussi à Aubin pour ces acrobaties en tout genre. Merci à mon Piero pour tous les week-ends partagés et bien plus encore, ainsi qu'à Fanny, de m'avoir toujours accueillie à bras ouverts.

Merci à toutes les personnes qui m'ont soutenue pendant cette aventure. Merci à Flora, pour tes milliers de vocaux et ton soutien quotidien. Merci à Antho pour absolument tout : on se sait. À Valérie et Maxime, tout simplement, merci d'être vous. À ma Rosa qui, même depuis le Canada, a toujours su trouver les mots pour faire des câlins à mon cœur.

À toutes ces personnes que je ne vais pas citer (mais qui se reconnaîtront), qui ont fait un bout de chemin avec moi et sans qui rien n'aurait été pareil : merci.

Je vais finir par vous remercier, vous, d'avoir eu le courage de lire tous ces mots, et puis me remercier, moi, d'avoir survécu à tout ça.

À toutes les personnes qui ont cru en moi et m'ont fait confiance : MERCI !

Table des matières

Affidavit **3**
Liste de publications et participation aux conférences **4**
Résumé **7**
Abstract **8**
Remerciements **9**
Table des matières **14**
Liste des figures **18**
Liste des tableaux **20**
Liste des abréviations **21**
Avant-propos **27**
Introduction **29**
1. Le système cardiovasculaire **29**
1.1. Morphologie 29
1.2. Développement cardiaque 31
1.3. Les principaux types cellulaires cardiaques 33
1.3.1. Les cardiomyocytes, à l'origine du couplage excitation/contraction 33
1.3.2. Les cellules endothéliales 37
1.3.3. Les fibroblastes cardiaques 39
2. Utilisation des cellules humaines pluripotentes induites en recherche cardio-vasculaire **40**
2.1. Découverte des cellules souches pluripotentes induites 41
2.2. Différenciation des cellules souches pluripotentes induites 42
2.3. Avantages et limites des cellules souches pluripotentes induites 45
3. Le système immunitaire et l'inflammation dans les cardiopathies **46**
3.1. Rôle du système immunitaire et de la signalisation inflammatoire 46
3.1.1. Activation du système immunitaire 47
3.1.2. Activation du système immunitaire dans le tissu cardiaque 48
3.1.3. Régulation de l'inflammation *via* les points de contrôle immunitaire 50
3.1.4. La signalisation inflammatoire 52
3.2. Inflammasome et cardiopathies 61
3.2.1. Structure et rôle des inflammasomes 61
3.2.2. L'inflammasome NLRP3 63
3.2.3. Rôle de l'inflammasome NLRP3 dans les maladies cardiovasculaires 69
3.3. Inflammasome NLRP3 et Interféron-γ 76
4. La myocardite immuno-médiée par les inhibiteurs de points de contrôle immunitaire **77**
4.1. Les cancers et les maladies cardiovasculaires 77
4.1.1. Les cancers : réalité moléculaire, cellulaire et tissulaire 77

4.1.2. Facteurs de risques communs aux cancers et aux maladies cardiovasculaires 78
4.1.3. Système immunitaire et échappement tumoral 81
4.2. Les traitements anticancéreux 83
4.2.1. Les virus oncolytiques 84
4.2.2. Les vaccins anti-tumoraux 84
4.2.3. La thérapie cellulaire par transfert adoptif 85
4.2.4. Les thérapies ciblées 85
4.3. La toxicité des traitements anticancéreux 88
4.4. Physiopathologie de la myocardite immuno-médiée 89
4.4.1. Présentation clinique de la myocardite immuno-médiée post-ICI 90
4.4.2. Populations immunitaires infiltrant le tissu cardiaque lors de la myocardite immuno-médiée 92
4.4.3. Implication de l'inflammasome NLRP3 dans la myocardite immuno-médiée 93
4.5. Stratégies d'étude de la myocardite immuno-médiée 94
4.5.1. Modèles animaux 94
4.5.2. Modèles cellulaires 96
4.6. Utilisation des cellules souches pluripotentes induites en cardio-oncologie 97
5. Objectifs de l'étude 98
Méthodes 101
1. Culture cellulaire 101
1.1. Obtention et génération des hiSPC 101
1.2. Différenciation des hiPSC en cardiomyocytes (hiPSC-CM) 102
1.3. Différenciation des hiPSC en cellules endothéliales (hiPSC-EC) 103
1.4. Stimulation des hiPSC-CM et hiPSC-EC 104
2. Caractérisation moléculaire 105
2.1. Étude de l'expression des transcrits 105
2.1.1. Extraction des ARN totaux 105
2.1.2. PCR quantitative 105
2.1.3. Puces à ADN 106
2.2. Étude de l'expression protéique 109
2.2.1. Caractérisation des hiPSC-CM 109
2.2.2. Caractérisation des hiPSC-EC 111
2.2.3. Caractérisation de récepteurs associés à l'inflammation 112
2.3. Analyse statistique 113
Résultats 114
1. Établissement et caractérisation des modèles cellulaires, cardiomyocytaire et endothélial, différenciés de cellules souches humaines pluripotentes induites 115
1.1. Origine et nature des clones 115
1.2. Caractérisation morphologique et moléculaire des hiPSC-CM 118
1.3. Caractéristique morphologique et moléculaire des hiPSC-EC 124

1.4. Conclusions sur l'établissement des modèles cellulaires 129
2. Analyse transcriptomique de la réponse à l'IFN-γ des cardiomyocytes et des cellules endothéliales, provenant d'un clone hiPSC généré chez une patiente ayant déclaré une myocardite immuno-médiée 130
2.1. Échantillons 131
2.2. Effet du traitement par l'IFN-γ dans les hiPSC-CM 133
2.2.1. Gènes différentiellement exprimés 133
2.2.2. Enrichissement fonctionnel 133
2.3. Effet du traitement par l'IFN-γ dans les hiPSC-EC 134
2.3.1. Gènes différentiellement exprimés 134
2.3.2. Enrichissement fonctionnel 135
2.4. Identification des processus biologiques spécifiques ou communs aux hiPSC-CM et aux hiPSC-EC 140
2.4.1. Effet du traitement par l'IFN-γ 140
2.4.2. Effet du critère de cardiotoxicité 143
2.5. Conclusion de l'étude transcriptomique 145
3. Article : Demonstration of Predominant Role of hiPSC-Derived Endothelial Cells in ICI-induced Myocarditis 147
4. Réponse des hiPSC-CM et des hiPSC-EC à l'IFN-γ : comparaison des clones hiPSC provenant de patients ayant ou non déclaré une myocardite immuno-médiée post-ICI 194
4.1. Effet de l'IFN-γ sur l'expression de transcrits impliqués dans la réponse inflammatoire 195
4.1.1. Effet de l'IFN-γ sur les hiPSC-CM 196
4.1.2. Effet du traitement par l'IFN- γ sur les hiPSC-EC 198
4.1.1. Conclusion concernant la modification de l'expression des transcrits 201
4.2. Effet du traitement par l'IFN-γ sur l'expression protéique des récepteurs impliqués dans la réponse immunitaire 203
4.2.1. Effet du traitement par l'IFN-γ sur les hiPSC-CM 203
4.2.2. Effet du traitement par l'IFN-γ sur les hiPSC-EC 205
4.2.3. Conclusion concernant la modification de l'expression protéique 207
4.3. Conclusion de l'étude de l'effet du traitement par l'IFN-γ dans les hiPSC de patients différenciés en cellules cardiaques 208
Discussion 210
1. Variabilité des clones hiPSC : description et causes possibles 210
1.1. Reprogrammation 210
1.2. Différenciation 210
1.3. Traitement par l'IFN-γ 212
2. Comparaison des effets sur les hiPSC-CM et sur les hiPSC-EC d'un traitement par l'IFN-γ dans le contexte de la myocardite immuno-médiée 213
2.1. Effets des cytokines inflammatoires 213
2.2. Réponses spécifiques des hiPSC-EC et des hiPSC-CM 215

2.3. Effet du critère de cardiotoxicité 218
3. Conclusion 220
4. Limites et perspectives 223
Bibliographie 225

Liste des figures

Figure 1 : Structure des parois cardiaques et des enveloppes péricardiques 30
Figure 2 : Source des différents types cellulaires cardiaques au cours du développement 32
Figure 3 : Composition du système de conduction cardiaque 34
Figure 4 : Étapes de la contraction des cardiomyocytes 35
Figure 5 : Organisation du muscle cardiaque 36
Figure 6 : Effet paracrine entre les cellules endothéliales et les cardiomyocytes 39
Figure 7 : Différenciation de cellules hiPSC en cellules cardiaques 44
Figure 8 : Activation du système immunitaire dans le tissu cardiaque 49
Figure 9 : Mécanismes de tolérance des cellules T aux antigènes cardiaques et régulation de leur activation 51
Figure 10 : Activation de l'apoptose par le granzyme B 56
Figure 11 : Implication des différentes voies de signalisation des MAP kinases 57
Figure 12 : Activation et régulation de la voie JAK-STAT 58
Figure 13 : Activation de la voie NF-κB par une stimulation du Toll-Like Receptor (TLR) 60
Figure 14 : Inflammasome et pathologies 62
Figure 15 : Structure et mise en place de l'inflammasome NLRP3 64
Figure 16: Activation de l'inflammasome NLRP3 68
Figure 17 : Pyroptose et maladies cardiovasculaires 71
Figure 18 : Inflammasome NLRP3 et fibrose cardiaque. 73
Figure 19 : Rôle de l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans la dysfonction endothéliale. 75
Figure 20 : Mécanismes communs entre les maladies cardiovasculaires et le cancer 81
Figure 21 : Représentation du cycle immunitaire dans la réponse anti-cancéreuse 83
Figure 22 : Mécanismes de l'immuno-surveillance et de l'immunothérapie dans le contexte du cancer 87
Figure 23 : Rôle de la signalisation PD-1/PD-L1 dans la réponse immunitaire cardiaque et son implication dans la myocardite immuno-médiée 90
Figure 24 : Protocole de différenciation des hiPSC en cardiomyocytes 103
Figure 25 : Protocole de différenciation des hiPSC en cellules endothéliales 104
Figure 26 : Caractérisation des hiPSC différenciées en cardiomyocytes 122
Figure 27 : Évaluation de la qualité de la différenciation d'hiPSC en cardiomyocyte 123
Figure 28 : Caractérisation des hiPSC différenciées en cellules endothéliales. 128
Figure 29 : Protocole expérimental de l'étude transcriptomique. 131
Figure 30 : Profils d'expression génique dans les hiPSC-CM et hiPSC-EC traités par l'IFN-γ. 136
Figure 31 : Gènes dérégulés et annotations fonctionnelles communes ou spécifiques des hiPSC-CM et hiPSC-EC en réponse au traitement par l'IFN-γ 142
Figure 32 : Gènes dérégulés et annotations fonctionnelles communes ou spécifiques des hiPSC-CM et hiPSC-EC associés au critère de cardiotoxicité 144
Figure 33 : Induction et activation de l'inflammasome NLRP3 195

Figure 34 : Expression des transcrits des composants du complexe inflammasome après traitement des hiPSC-CM par l'IFN-γ 196
Figure 35 : Expression des transcrits de régulateurs du complexe inflammasome après traitement des hiPSC-CM par l'IFN-γ 197
Figure 36 : Expression des transcrits des composants du complexe inflammasome après traitement des hiPSC-EC par l'IFN-γ 199
Figure 37 : Expression des transcrits de régulateurs du complexe inflammasome après traitement des hiPSC-EC par l'IFN-γ 200
Figure 38 : Représentation schématique d'effet de l'IFN-γ sur l'expression des transcrits de la voie de l'inflammasome NLRP3 dans les hiPSC-CM et les hiPSC-EC 202
Figure 39 : Effet du traitement par l'IFN-γ sur l'expression des récepteurs impliqués dans la réponse immunitaire des hiPSC-CM 204
Figure 40 : Effet du traitement par l'IFN-γ sur l'expression des récepteurs impliqués dans la réponse immunitaire des hiPSC-EC 206
Figure 41 : Schématisation synthétique des résultats obtenus illustrant les réponses des EC et des CM dérivés d'hiPSC à un environnement inflammatoire mimant celui de la MIM post-ICI 222

Liste des tableaux

Tableau 1 : Doses et références utilisées pour les différentes molécules pro-inflammatoires 104
Tableau 2 : Séquences des primers utilisés en qPCR 106
Tableau 3 : Anticorps utilisés pour la caractérisation des hiPSC-CM par cytométrie en flux 109
Tableau 4 : Anticorps primaires utilisés pour la caractérisation des hiPSC-CM par immunomarquage 110
Tableau 5 : Anticorps secondaires utilisés pour l'immunomarquage. 110
Tableau 6 : Anticorps utilisés pour la caractérisation des hiPSC-EC par cytométrie en flux . 111
Tableau 7 : Anticorps primaires utilisés pour la caractérisation des hiPSC-EC par immunomarquage 112
Tableau 8 : Anticorps utilisés pour la caractérisation de récepteurs associés à l'inflammation dans les hiPSC-CM et hiPSC-EC par cytométrie en flux 112
Tableau 9 : Description des donneurs à l'origine des clones hiPSC 117
Tableau 10 : Contrôle qualité des clones hiPSC dérivés à partir des échantillons de patients de la cohorte gMEDICO 118
Tableau 11 : Nombre de sondes et gènes différentiellement exprimés identifiés par les analyses SAM multi-classes, dans les cardiomyocytes (hiPSC-CM) et dans les cellules endothéliales (hiPSC-EC) avec un FDR à 0 %, 1 % et 5 %. 132
Tableau 12 : Annotations fonctionnelles des gènes surexprimés par l'IFN-γ dans les hiPSC-CM et les hiPSC-EC 138
Tableau 13 : Annotation fonctionnelle pour les gènes surexprimés par la cardiotoxicité dans les hiPSC-CM et les hiPSC-EC 139
Tableau 14 : Variation du niveau d'expression induite après traitement par l'IFN-γ dans les hiPSC-CM 204
Tableau 15 : Variation du niveau d'expression induite après traitement par l'IFN-γ dans les hiPSC-EC 206

Liste des abréviations

A

ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
AIM2 : Absent in melanoma 2
AIRE : AutoImmune REgulator
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
Ang-II : Angiotensin-II
ANG1 : Angiopoïétine-1
ANP : Peptide Natriurétique A
Apaf-1 : Apoptotic peptidase activating factor 1
APC : Cellule Présentatrice d'Antigène
APLN : Apeline
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : Acide ribonucléique messager
ARNc : Acide ribonucléique complémentaire
ASC : Apoptosis-associated Speck-like proteins
ASXL1 : Additional sex combs like 1
ATP : Adénosine Triphosphate
AV : Noeud auriculo-ventriculaire
AVC : Accident Vasculaire Cérébral

B

BAK : BCL-2 Antagonist/Killer 1
BAX : BCL-2 Associated X
BAG3 : BAG Cochaperone 3
BCL-2 : BCL2 Apoptotic Regulator
BCR : B Cell Receptor
BID : BH3 Interacting Domain Death Agonist
BMP4 : Bone morphogenetic protein 4
BNP : Peptide Natriurétique B
BTK : Burton Tyrosine Kinase

C

c-Myc : Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog
Ca^{2+} : Ion calcium
CAD : Caspase-Activated DNase
CaMKIIδ : Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase II delta
CARD : Caspase Recruitment Domain-Containing
CCL5 : C-C Motif Chemokine Ligand 5
CCR1/3/4/5 : Chemokine (C-C Motif) Receptor

CD105 : Endogline
CEACAM1 : Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule-1
Cl^- : Ion chlorure
CLP : Ligature et Ponction Caecale
CM : Cardiomyocyte
CTLA-4 : Cytotoxic T lymphocyte-associated protein-4
CXCL2/9/10/11 : C-X-C Motif Chemokine

D

DAMPs : Danger-Associated molecular Pattern
DC : Cellule Dendritique
DEG : Gènes différentiellement exprimés
DNMT3α : DNA methyltransferase 3 alpha
DSP : Desmoplakin

E

EC : Cellule endothéliale
EDN1 : Endothéline-1
ERK1/2 : Extracellular signal-regulated kinases

F

FAS-L : FAS ligand
FBS : Fetal Bovine Serum
FDR : False Discovery Rate
FGF : Fibroblast Growth Factor

G

GAS : Gamma-Activated Sequence
GBP : Guanylate Binding Protein
GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
GNLY : Granulysin
GO : Gene Ontology
GSDMD : Gasdermine D
GSDME : Gasdermine E
GSK-3 : Glycogen synthase kinase-3
GZMB : Granzyme B

H

HCAEC : Human Coronary Artery Endothelial Cell
HCMEC : Human Cardiac Microvascular Endothelial Cell
HER2 : Human Epidermal growth factor Receptor 2
hiPSC : human induced Pluripotent Stem Cell
HipSci : Human Induced Pluripotent Stem Cells Initiative
HMGB1 : High Mobility Group Box 1
HNP : Human Neutrophil Peptide
HUVEC : Cellules Endothéliales de Veine Ombilicale Humaine

I

ICAD : Inhibitor of Caspase-Activated DNase
ICAM-1 : Intracellular Adhesion Molecule 1
ICI : Immune Checkpoint Inhibitor
IFN-γ : Interféron-gamma
IFNGR1/2 : Récepteur à l'IFN-γ 1 et 2
IL : Interleukine
IL-1R : Récepteur à l'interleukine-1
IκB : inhibiteurs de NF-κB
IKK : I-kappaB kinase
IRF : Interferon Regulatory Factor
ITGA9 : Intégrine-α9

J

JAK : Janus Kinase
JNK1/2/3 : C-Jun N-terminal Kinase

K

K^+ : Ion potassium
KEGG : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
Klf4 : Kruppel-Like Factor 4
KO : Knock-Out

L

LAG-3 : Lymphocyte Activation gene-3
LB : Lymphocyte B
LMNA : Laminine A/C
LPS : LipoPolySaccharide
LT : Lymphocyte T
LRR : Leucine-riche repeat

M

MCP-1 : Monocyte Chemotacitc Protein 1 ou CCL2
M6P : Mannose-6-Phosphate
MAPK : Mitogen-activated protein kinase
MAPKK : MAPK kinase
MAPKKK : MAPKK kinase
MAC : Complexe d'attaque membranaire
MFI : Mean Fluorescence Intensity
MHC : Major Histocompatibility Complex
MIM : Myocardite Immuno-Médiée
MLC2a/v : Chaîne légère de la myosine atriale / ventriculaire
MTEC : Cellules épithéliales médullaires thymiques
MVEC : Cellules Endothéliales Vasculaires Murines
MYH : Chaîne lourde de la myosine

N

NANOG : Nanog Homeobox
NEK7 : Serine/Threonine-protein kinase
NEMO : NF-κB Essential Modulator
NF-κB : Nuclear Factor-kappa B
N-GSDMD : N-terminal Gasdermin D
NIK : NF-κB inducing kinase
NK : Natural Killer
NLR : NOD-Like Receptor
NLRC : NOD-Like Receptor and CARD domain
NLRP : NOD-Like Receptor and Pyrin domain
NO : Oxyde nitrique
NPR3 : Natriuretic Peptide Receptor 3
NRG1 : Neuregulin 1

O

OFT : OutFlow Tract
Oct3/4 : Octamer-binding transcription factor 3/4

P

PAP : Phosphatase Acide Prostatique
P2X7 : Purinergic Receptor P2X 7
PAMPs : Pathogen-Associated molecular Pattern
PMBC : Peripheral Mononuclear Blood Cell
PECAM 1 : Platelet and Endothelial Cell Adhesion Molecule 1

PD-1 : Programmed Cell Death 1
PD-L1 : Programmed Cell Death-Ligand-1
PD-L2 : Programmed Cell Death-Ligand-2
PI3K/AKT : Phosphatidylinositol-3 kinases/protein kinase B
PIAS : Protein Inhibitor of Activated STAT
PKA : Protéine Kinase A
PRR : Pattern-Recognition Receptor
PS : Personne saine
PYD : Pyrin-domain

R

ROS : Reactive Oxygene Species
RyR2 : Récepteur à la Ryanodine 2

S

SA : Noeud Sinusal
SASP : Phénotype Sécrétoire Associé à la Sénescence
SERCA : Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium
sIL-1R : Récepteur soluble à IL-1
siRNA : small interfering ARN
SOCS : Suppressor of Cytokine Signalling
Sox2 : Sex Determining Region Y-Box 2
SMAD : Suppressor of mothers against decapentaplegic
SNC5A : Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit 5
STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription
SR : Réticulum Sarcoplasmique
SV : Sinus Veineux

T

TCGA : The Cancer Genome Atlas
TCAP : Titin-cap
TCR : T Cell Receptor
TET2 : Ten-eleven translocation-2
TGF-β : Transforming Growth Factor-beta
Th : Lymphocyte T helper
THBSP : Thrombospondine
TIGIT : T Cell Immunoreceptor With Ig And ITIM Domains
TIM-3 : T cell immunoglobulin-3
TLR : Toll-like Receptor
TNC : Tenascine-C
TNF-α : Tumor Necrosis Factor-alpha
TNFR : Tumor Necrosis Factor Receptor
TNNC1 : Troponine C1

TNNT2 : Troponine T2
Treg : Lymphocyte T régulateur
TRAF : Facteur associé au récepteur du TNF
TRIM : Triplicate motif-containing proteins
TTN : Titin
TP53 : Tumor Protein 53
TXNIP : Thioredoxin Interacting Protein

U

Ub : Ubiquitine

V

VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
vWF : Von Willebrand Factor

W

Wnt : Wingless integrated
WT : Wild Type

Avant-propos

Ce travail de thèse porte sur l'étude des mécanismes physiopathologiques de la myocardite immuno-médiée (MIM) après immunothérapie. Il s'agit d'une cardiopathie peu fréquente, moins de 2% des patients traités par inhibiteurs de points de contrôle immunitaire (ICI), mais dont le taux de mortalité reste très élevé (25-40% des patients). Le principe des ICI n'est pas de détruire les cellules cancéreuses mais d'exploiter le mécanisme naturel du système immunitaire pour cibler et détruire les cellules cancéreuses. Cependant, comme tout traitement, les ICI peuvent conduire à des effets indésirables, que l'on appelle immuno-médiés. En 2016, une publication de Johson *et al.* dans *The New England Journal of Medicine* révélait deux cas de myocardites fulminantes après traitement par ICI. Le décès de ces deux patients est survenu en quelques jours, par troubles conductifs de haut degré ou troubles du rythme ventriculaires, alors même que la fraction d'éjection ventriculaire gauche restait normale. Dès ces premiers cas rapportés, on comprenait que la myocardite immuno-médiée diffèrait de la myocardite classique virale. L'équipe de recherche dirigée par Nathalie Lalevée, que j'ai intégrée pour réaliser ce travail de thèse, a démarré un projet de recherche translationnelle avec le Pr. Franck Thuny et le Dr. Jennifer Cautela, qui ont créé le centre de cardiologie-oncologique de l'hôpital Nord de Marseille (Centre MediCO). Les autorisations légales (convention et contrats de recherche) pour pouvoir travailler sur les échantillons de patients ont été obtenues en 2019 et ce travail de thèse s'inscrit dans la continuité des travaux réalisés par Thi Thom Tran, qui a obtenu son doctorat en 2022, en partie sur le développement du modèle hiPSC dans le cadre de la MIM post-ICI.

J'ai intégré l'équipe de recherche en janvier 2020, lors de mon stage de Master 2, alors qu'elle était installée au sein du TAGC (Theories and Approaches of Genomic Complexity). A ce moment là, les connaissances sur les mécanismes physiopathologiques de la MIM post-ICI étaient très limitées et il n'existait pas ou peu de modèles d'étude que ce soit *in vivo* ou *in vitro*. L'équipe avait démarré la génération de clones hiPSC sur le premier patient inclu et mon stage de M2 a porté sur l'étude des régulations transcriptionnelles des cellules cardiaques dérivées de ce premier clone hiPSC, après stimulation par l'interféron-gamma. Cependant, mon stage a débuté peu avant le premier confinement dû à la pandémie de Covid-19. Durant cette période de confinement, j'ai pu analyser les données de microarray, ce qui a constitué une base solide pour la suite de mes travaux et m'a permis d'obtenir une allocation MESRI, et un poste de monitrice, pour démarrer ma thèse en octobre 2020. Mais la crise sanitaire sur l'année 2020-2021 a rapidement impacté plus largement le projet. Les fermetures de laboratoires, dont la plateforme de reprogrammation des clones hiPSC (MaSC), ont interompu les reprogrammations et entraîné la perte de plusieurs clones hiPSC. Les cultures cellulaires sur ce modèle complexe ont été très compliquées à réaliser dans ces conditions. De plus, cette période a été un véritable tsunami dans les hôpitaux, retardant le recrutement de nouveaux patients. A cela, s'ajoute la difficulté à recruter des patients du fait de la rareté de la pathologie

et parce que certains patients refusent de signer le consentement. Sachant que la génération et la caractérisation des clones hiPSC nécessitent environ 6 mois, il a donc été très compliqué d'obtenir de nouveaux clones hiPSC durant les deux premières années de ma thèse.

Le contexte dans lequel ma thèse s'est déroulée est important à préciser car, après ce début difficile lié aux conditions sanitaires de la période Covid-19, l'équipe a quitté le TAGC fin 2021 pour intégrer le C2VN (Centre de Recherche en CardioVasculaire et Nutrition) et se rapprocher de l'équipe clinique du centre Medi-CO au moment de l'évaluation HCERES pour le renouvellement des unités. Cette réinstallation complète des infrastructures de culture cellulaire a nécessité de lourds ajustements. Puis, le bâtiment de la faculté de Pharmacie, où notre équipe est installée, a bénéficié d'une rénovation énergétique de grande ampleur dont nous n'avions pas connaissance au moment de l'intégration au C2VN. Malheureusement pour le projet, cela voulait dire un second déménagement en mai 2023 et un troisième fin 2023, impliquant une nouvelle réorganisation des cultures à chaque fois, avec des difficultés énormes pour maintenir le modèle hiPSC. La conjoncture exceptionnellement complexe autour de cette thèse, à laquelle s'ajoute une pathologie et un modèle cellulaire où tout était à découvrir, explique le prolongement de plus d'un an qui a été nécessaire pour arriver au bout de ces travaux et à l'écriture du manuscrit.

Ceci dit, au-delà des avancées scientifiques, cette thèse a été pour moi un véritable apprentissage humain et professionnel. J'ai eu la chance d'encadrer plusieurs étudiants au cours de ces années, et de donner des cours dans le cadre du monitorat, une expérience enrichissante qui m'a permis de transmettre mes connaissances et d'échanger avec des profils variés. Ce travail m'a également appris à m'adapter aux contraintes imprévues et à persévérer face aux défis. J'espère que les résultats obtenus dans le cadre de cette recherche contribueront à une meilleure compréhension des mécanismes pathologiques des myocardites immuno-médiées et, à terme, à des avancées dans leur prise en charge.

Introduction

1. Le système cardiovasculaire

1.1. Morphologie

Le système cardiovasculaire est composé du cœur et des vaisseaux. Le cœur fonctionne comme une pompe permettant la circulation du sang. Dans la circulation systémique, les artères transportent le sang riche en oxygène et en nutriments vers les organes, tandis que les veines ramènent au cœur un sang chargé en dioxyde de carbone et en déchets métaboliques. À l'inverse, dans la circulation pulmonaire, l'artère pulmonaire véhicule un sang pauvre en oxygène vers les poumons, où il se recharge en oxygène avant de revenir au cœur par les veines pulmonaires (Betts et al., 2022). En plus de sa fonction de pompe, le cœur est également un organe endocrinien. Les cellules qui composent le tissu cardiaque, dont les cardiomyocytes, les cellules endothéliales et les fibroblastes, sont capables de sécréter des peptides qui participent de manière indirecte à la régulation de la pression sanguine (Chiba et *al.*, 2017).

Le cœur est constitué de quatre cavités : deux oreillettes et deux ventricules. Chaque oreillette est couplée à un ventricule avec lequel elle communique par une valve cardiaque. Le cœur possède une capacité intrinsèque d'autorégulation et de contraction grâce au système de conduction cardiaque lui permettant de générer ses propres battements. Toutefois, son activité est modulée par le système nerveux autonome, *via* des barorécepteurs et des chimiorécepteurs, en réponse à divers stimuli tels que les émotions ou l'effort physique. Le système de conduction cardiaque comprend le nœud sino-atrial, le nœud atrio-ventriculaire, le faisceau de His et les fibres de Purkinje. La régulation de l'activité cardiaque passe également par la communication paracrine entre tous les types cellulaires qui composent le cœur, dont les vésicules extracellulaires sont un élément majeur (Chistiakov et *al.*, 2016). Le tissu cardiaque est constitué de trois feuillets de l'extérieur vers l'intérieur : le péricarde, le myocarde et l'endocarde (Figure 1) (Betts et al., 2022).

Le péricarde, ou sac péricardique, est composé du péricarde fibreux, l'enveloppe la plus externe du cœur qui permet de le protéger, et du péricarde séreux, composé de la lame pariétale, de la cavité péricardique et de l'épicarde. Cette structure donne la liberté nécessaire aux mouvements cardiaques provoqués lors de la contraction du myocarde grâce au liquide, produit par les vaisseaux sanguins, présent dans la cavité péricardique (Figure 1) (Betts et al., 2022).

Le myocarde est la partie contractile du tissu cardiaque, dont l'épaisseur est variable dans les différentes cavités (Figure 1). Les cellules musculaires cardiaques, ou cardiomyocytes contractiles, composent majoritairement le myocarde. Ces cellules sont ancrées dans une matrice extracellulaire principalement composée de fibres de collagène. C'est la contraction du myocarde qui permet de pomper le sang et de le distribuer grâce aux artères à l'ensemble de l'organisme (Betts et al., 2022).

Enfin, l'endocarde, qui tapisse l'ensemble des cavités et valves cardiaques, est composé d'un endothélium pavimenteux simple recouvrant le tissu conjonctif. L'endothélium est composé d'une fine couche de cellules endothéliales, en continuité avec celles qui recouvrent l'ensemble des vaisseaux sanguins, formant une barrière entre le sang et le myocarde. Le tissu conjonctif est quant à lui composé de fibroblastes cardiaques, de cellules musculaires lisses et abrite le système de conduction (Figure 1). (Betts et al., 2022)

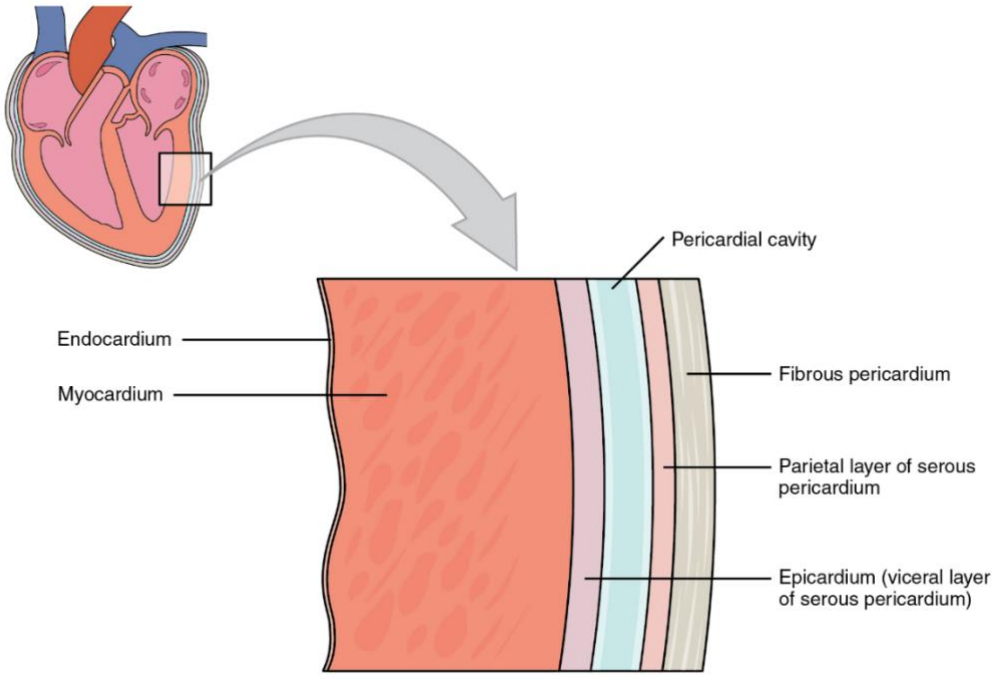


Figure 1 : Structure des parois cardiaques et des enveloppes péricardiques
Endocarde : couche interne du cœur formée de l'endothélium et du tissu conjonctif, tapissant les cavités cardiaques. Myocarde : couche musculaire responsable des contractions cardiaques. Epicarde : feuillet viscéral du péricarde séreux, recouvrant la surface externe du cœur. Cavité péricardique : espace contenant un liquide séreux réduisant les frottements. Péricarde séreux (pariétal) : feuillet externe du péricarde séreux, adhérent au péricarde fibreux. Péricarde fibreux : couche externe rigide maintenant le cœur dans le médiastin. (Source : (Betts et al., 2022); **https://tinyurl.com/3ux5z4vw**)

1.2. Développement cardiaque

Le cœur est l'un des premiers organes à se former lors de l'embryogénèse, et plus précisément, lors de la gastrulation au jour embryonnaire (E) 6.5 chez la souris et dès la troisième semaine de gestation chez l'Homme. De nombreuses études dans des modèles animaux, comme la souris ou le poulet, ont permis de définir les différentes étapes de la cardiogenèse.

Les cellules progénitrices cardiaques sont formées à partir de cellules multipotentes mésodermiques et la plupart expriment le facteur de transcription *Mesp1*. À E7 chez la souris, et au 16ème jour après la fécondation chez l'Homme, les cellules migrent et se regroupent afin de former le mésoderme cardiogénique (Figure 2) (Meilhac & Buckingham, 2018).

Au niveau anatomique, les cellules progénitrices cardiaques, qui correspondent au premier champ cardiaque, s'organisent et forment le croissant cardiaque à E7.5 chez la souris, et entre le 16ème et le 19ème jour chez l'Homme (Figure 2). En embryologie, un champ fait référence à une population de cellules très localisée et qui donne naissance à un tissu ou un organe (Meilhac & Buckingham, 2018). Les cellules progénitrices composant le croissant cardiaque expriment des facteurs de transcription comme Nkx2.5, Gata4/5, Tbx5 ou Hand1 (Meilhac & Buckingham, 2018). Dès E8 chez la souris, et entre le 19ème et le 21ème jour chez l'Homme, ces cellules se différencient en cardiomyocytes et forment le tube cardiaque primitif linéaire qui est suspendu à la paroi péricardique (Rochais et al., 2019).

Le tube cardiaque est formé de deux couches cellulaires distinctes : à l'intérieur l'endocarde, composé de cellules endothéliales et à l'extérieur, le myocarde composé de cardiomyocytes. Des études de lignage cellulaire ont montré que les cardiomyocytes qui composent cette structure forment principalement *in fine* le ventricule gauche. Quelques-uns sont également retrouvés dans les oreillettes (Meilhac & Buckingham, 2018). On distingue aux extrémités du tube un pôle veineux, par lequel pénètre le sang (la voie afférente), et un pôle artériel, qui distribue le sang dans l'embryon (voie efférente) (Buckingham et *al.*, 2005). Le tube cardiaque primitif s'allonge grâce à la migration de cellules progénitrices provenant du second champ cardiaque, d'abord en partie dorsale, puis aux différents pôles. Ces cellules expriment spécifiquement les facteurs de transcription Isl1 et Tbx1. Les cellules du second champ cardiaque contribuent à la formation du ventricule droit et des deux oreillettes (Meilhac & Buckingham, 2018). Ces cellules sont également des progéniteurs de cellules endocardiques et musculaires lisses, mais également des fibroblastes cardiaques (Rochais et al., 2019).

A partir de E8.5 chez la souris, et entre le 22ème et le 23ème jour chez l'Homme, le tube cardiaque jusque-là linéaire va subir une rotation, communément appelée *looping*, afin de former une boucle réunissant pôle veineux et pôle artériel. Les ventricules et les oreillettes se développent à partir de cette structure grâce à la prolifération de cardiomyocytes déjà différenciés dès E10 chez la souris. Cette prolifération diminue progressivement et laisse place à l'augmentation du volume cellulaire des cardiomyocytes (Rochais et al., 2019).

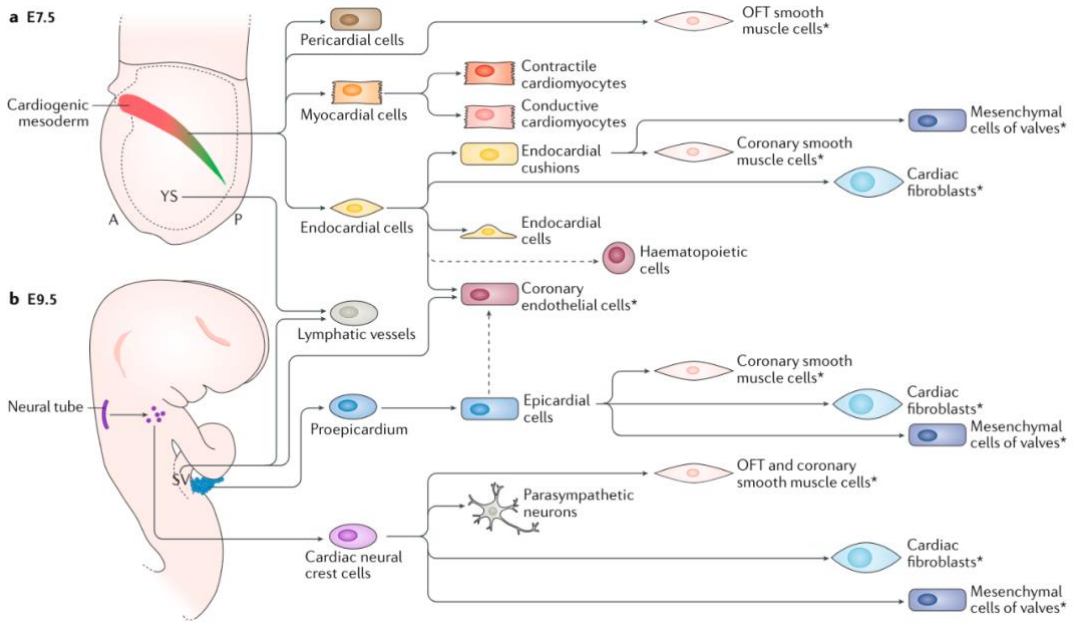


Figure 2 : Source des différents types cellulaires cardiaques au cours du développement
(a) Dès E7.5 les cellules du mésoderme cardiogénique se différencient en cellules péricardiques, en cellules musculaires lisses pour composant les voies d'éjections (OFT : OutFlow Tract), en cardiomyocytes contractiles ou conducteurs, et en cellules endothéliales donnant des cellules endocardiques, en fibroblastes cardiaques, en cellules musculaires lisses composant les artères coronaires, ou encore des cellules mésenchymateuses composant les valves cardiaques. **(b)** Après E9.5, les cellules cardiaques se différencient à partir du sinus veineux (SV) et du proépicarde (en bleu) et donnent des cellules endothéliales coronaires et des cellules épicardiques. Les cellules des crêtes neurales cardiaques, qui prennent leur origine dans le tube neural (en violet), donnent des cellules musculaires lisses composant les voies d'éjections, des neurones parasympathiques ainsi que des fibroblastes cardiaques ou des cellules mésenchymateuses. Les cellules qui proviennent de différents progéniteurs sont marquées d'un astérisque. Les contributions mineures sont indiquées par une ligne pointillée. Source : (Meilhac & Buckingham, 2018).

Entre E10.5 et E13.5, et entre le 28ème et le 35ème jour chez l'Homme, les différentes cavités se séparent par septation (cloisonnement) et les valves se développent afin d'établir une double circulation sanguine à la naissance : la circulation pulmonaire et la circulation systémique. La séparation des deux ventricules est complète à E13.5 chez la souris et à la fin du deuxième mois chez l'Homme (Rochais et al., 2019). Finalement, afin de coordonner la contraction des oreillettes et des ventricules, le système de conduction se met en place (Meilhac & Buckingham, 2018).

Pour que toutes les cellules du myocarde aient accès aux nutriments et à l'oxygène, des structures appelées trabécules se développent à partir de l'endocarde à l'intérieur des cavités. Suite à la compaction des trabécules qui a lieu entre E13 et 15, l'endocarde complète le système vasculaire coronaire afin d'irriguer le myocarde. Les artères et les veines coronaires sont hébergées dans l'épicarde, qui se développe dès E9.5 chez la souris et entre le 23ème et le 26ème jour chez l'Homme, à partir d'une population de cellules pro-épicardiques (Meilhac & Buckingham, 2018).

1.3. Les principaux types cellulaires cardiaques

Le cœur humain est composé de divers types cellulaires, chacun jouant un rôle essentiel dans sa fonction globale. Les cardiomyocytes (CM) représentent 30 à 40 % du tissu cardiaque dont les cellules cardionectrices et les cardiomyocytes contractiles qui occupent près de 75 % du volume myocardique. Les fibroblastes, quant à eux, constituent une proportion significative des cellules cardiaques et sont essentiels au maintien de la matrice extracellulaire et à la structure tissulaire. Les cellules endothéliales (EC) tapissent les vaisseaux sanguins du cœur, jouant un rôle crucial dans la régulation vasculaire et l'homéostasie. (Camelliti et *al.*, 2005)

1.3.1. Les cardiomyocytes, à l'origine du couplage excitation/contraction

Le myocarde est constitué de différents types de cardiomyocytes qui ont des rôles différents en fonction de leur localisation : les cellules cardionectrices et les cardiomyocytes contractiles.

Le système de conduction cardiaque est composé de cardiomyocytes spécialisés, les cellules cardionectrices, qui permettent de transmettre le signal électrique, appelé onde de dépolarisation, dans l'ensemble du cœur. Toutes les cellules cardionectrices peuvent générer des potentiels d'action de manière spontanée. Un potentiel d'action correspond à un changement transitoire de la polarité membranaire provoqué par le passage d'ions au travers de canaux et échangeurs ioniques présents dans la membrane des cardiomyocytes. De manière générale, les cellules cardionectrices du nœud sino-atrial ou pacemaker génèrent des potentiels d'action qui se propagent dans les oreillettes, qui se contractent de manière synchrone. L'onde de dépolarisation atteint le nœud auriculo-ventriculaire puis le système de conduction ventriculaire composé du faisceau de His et des fibres de Purkinje. Le faisceau de His se divise en deux branches, une dans chaque ventricule, et propage l'onde de dépolarisation aux fibres de Purkinje situées le long des parois ventriculaires dans l'espace sous-endocardique. Les fibres de Purkinje induisent la dépolarisation des cardiomyocytes contractiles ce qui génère la contraction des deux ventricules (Figure 3) (Boulgakoff et *al.*, 2024).

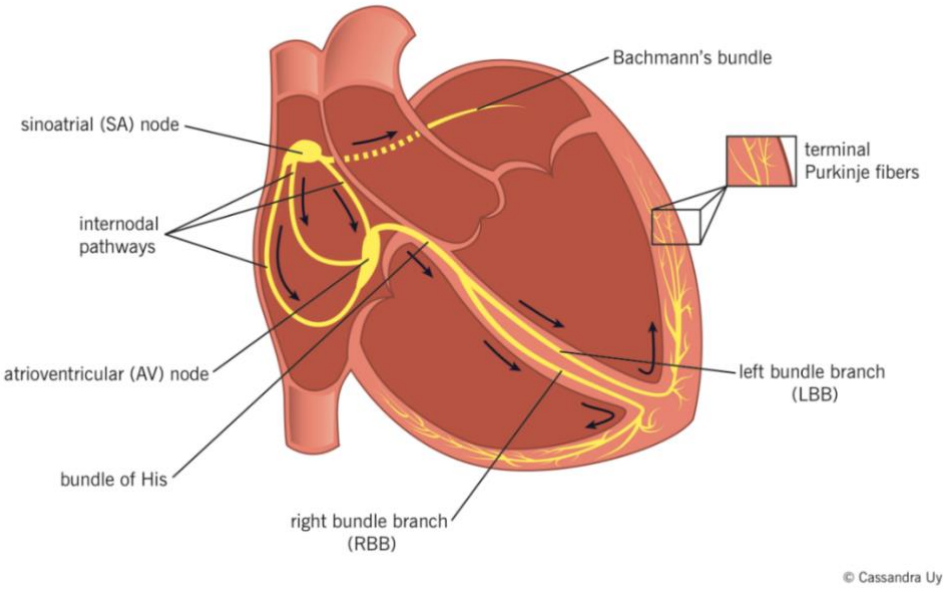


Figure 3 : Composition du système de conduction cardiaque
Schéma illustrant les structures clés du système de conduction électrique du cœur. Il comprend le nœud sino-atrial (SA), les voies internodales, le nœud auriculo-ventriculaire (AV), le faisceau de His composé des branches droite et gauche et les fibres de Purkinje. Ces structures permettent la propagation des impulsions électriques, assurant la contraction coordonnée des cavités électriques. Source : https://tinyurl.com/yxw8ujr7

Les cardiomyocytes contractiles sont des cellules musculaires striées qui possèdent des fibres musculaires allongées, les myofibrilles. Ce sont des structures composées de filaments épais, principalement de la myosine, qui interagissent avec des filaments fins, principalement de l'actine. La tropomyosine, la troponine et la titine interagissent avec ces protéines pour structurer ces filaments. Ensemble, ces protéines forment le cytosquelette sarcomérique, et en présence de calcium, la formation du pont actine-myosine démarre un cycle de contraction. L'ATP (adénosine triphosphate) est nécessaire pour rompre ce pont et son hydrolyse permet le relâchement des myofibrilles dès que le taux de calcium intracellulaire diminue (Caporizzo et *al.*, 2019).

Le couplage excitation-contraction permet la transduction d'un signal électrochimique, le potentiel d'action, en action mécanique, la contraction. Le médiateur essentiel de cette conversion est le calcium (Ca^{2+}). Au niveau de la membrane des cardiomyocytes, il y a des invaginations appelées tubules T qui permettent la transmission des potentiels d'action directement au niveau du sarcomère (Figure 4). Lors de la dépolarisation de la membrane des cardiomyocytes au cours du potentiel d'action, les canaux de type-L s'ouvrent et laissent entrer du Ca^{2+} dans le cytoplasme. Cette entrée de Ca^{2+} est insuffisante pour déclencher le raccourcissement des myofibrilles, mais suffisante pour activer le récepteur de la ryanodine (RyR2), qui change de conformation et permet une sortie massive du Ca^{2+} du réticulum

sarcoplasmique. Ce Ca^{2+} se fixe alors sur la troponine, ce qui déplace la tropomyosine et permet la création de ponts entre actine et myosine, permettant ainsi la contraction des myofibrilles. À la fin de la contraction, la concentration calcique est rétablie principalement par repompage du Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique grâce à la pompe SERCA (Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+}) (Bers, 2002).

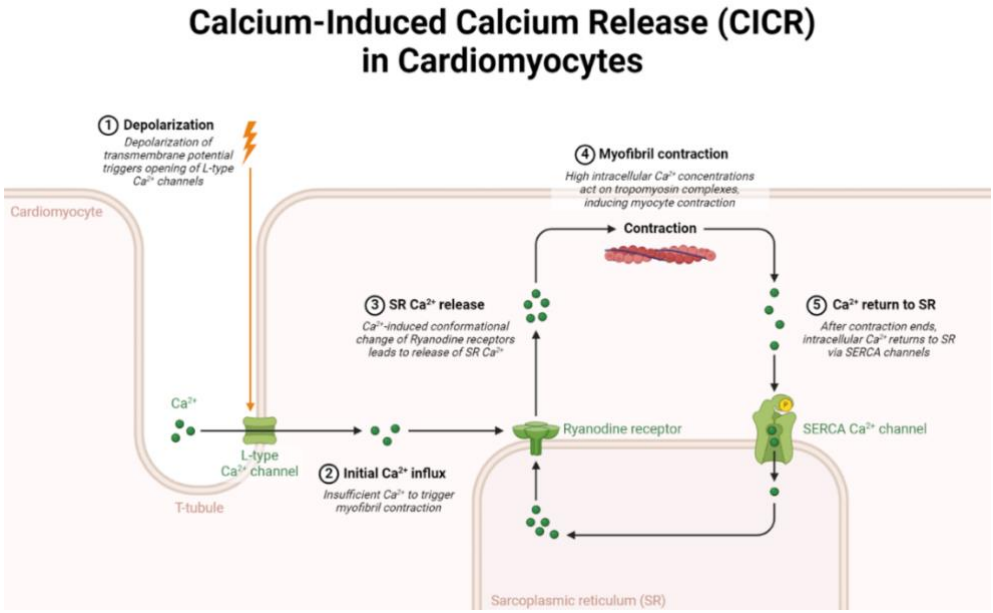


Figure 4 : Étapes de la contraction des cardiomyocytes

(1) Dépolarisation : L'arrivée d'une onde de dépolarisation entraîne l'ouverture des canaux calciques de type-L situés sur la membrane des tubules T. **(2)** Influx initial de Ca^{2+} : Une faible quantité de Ca^{2+} entre dans la cellule via les canaux de type L, mais cet influx initial de Ca^{2+} n'est pas suffisant pour induire une contraction musculaire directement. **(3)** Libération de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique (SR) : Le Ca^{2+} entrant se fixe au niveau des RyR2 situés sur la membrane du réticulum sarcoplasmique, induit un changement de conformation et permet une libération massive de Ca^{2+}. **(4)** Raccourcissement des myofibrilles : L'augmentation de la concentration cytoplasmique en calcium active les complexes troponine-tropomyosine, ce qui permet l'interaction des filaments d'actine et de myosine dans les myofibrilles et on conduit à la contraction des cardiomyocytes, permettant au cœur de pomper le sang. **(5)** Retour du Ca^{2+} au réticulum sarcoplasmique : Après la contraction, la majeure partie des ions Ca^{2+} sont recapturés dans le réticulum sarcoplasmique *via* la pompe SERCA. Ce processus rétablit la concentration de Ca^{2+} intracellulaire au repos, permettant à la cellule de se préparer pour le prochain cycle de contraction (Source : BioRender).

La contraction synchronisée des cardiomyocytes au sein du myocarde est assurée par l'existence de disques intercalaires. Ces structures sont composées de trois principaux complexes qui permettent les jonctions entre les cardiomyocytes et favorisent la communication intercellulaire : les jonctions communicantes (gap), les jonctions adhérentes et les jonctions desmosomales (Figure 5). Les jonctions gap forment des pores, grâce aux connexines présentes au niveau de la membrane des deux cardiomyocytes, et permettent de relier directement les cytoplasmes des deux cellules afin de faciliter la propagation des ions et donc du potentiel d'action. Les jonctions adhérentes, composées de cadhérines (protéines transmembranaires) et de caténines (protéines cytoplasmiques), permettent de coupler les appareils contractiles de deux cardiomyocytes afin de faciliter la transmission de la force de contraction. Enfin, les jonctions desmosomales, composées de cadhérines desmosomales, permettent de relier les cardiomyocytes entre eux grâce à la formation d'hétérodimères afin de résister au stress contractile des ventricules (Manring et *al.*, 2018).

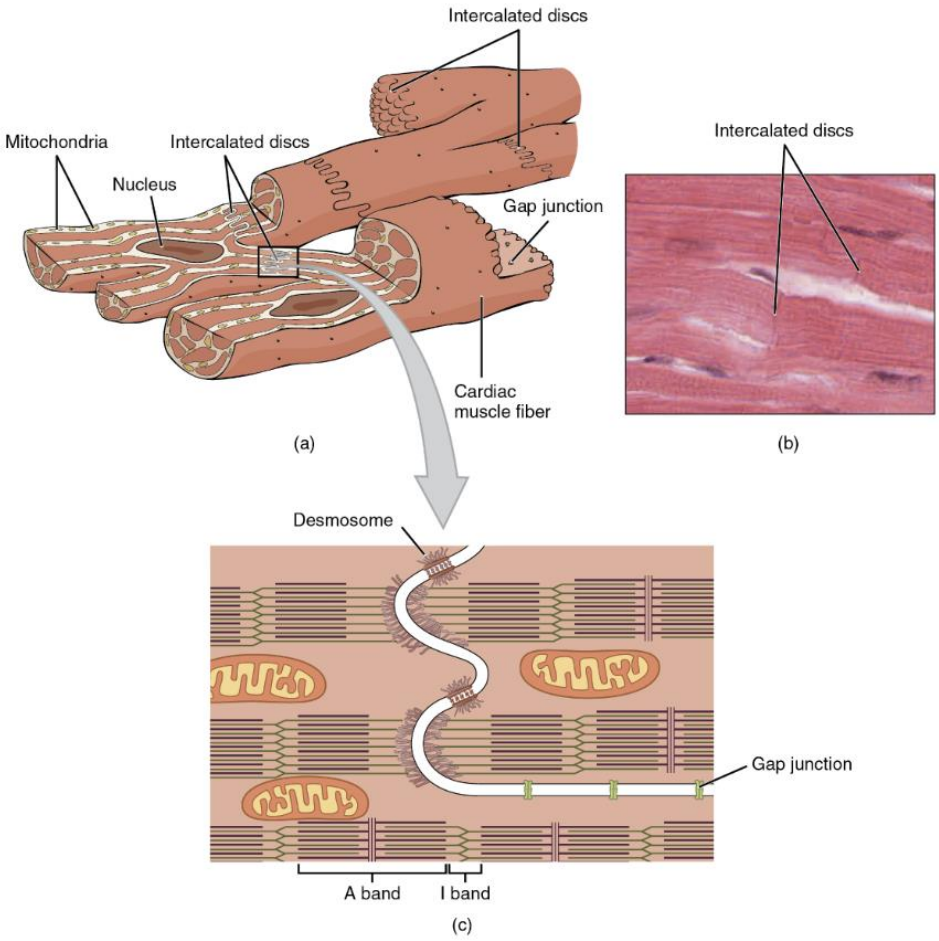


Figure 5 : Organisation du muscle cardiaque
(a) Schématisation de fibres musculaires cardiaques connectés par des disques intercalaires, structures spécialisées présentes uniquement dans le muscle cardiaque. **(b)** Image histologique d'une coupe de tissu cardiaque montrant les disques intercalaires. **(c)** Schématisation de l'organisation des disques intercalaires composés principalement de desmosomes, qui assurent l'adhérence mécanique entre les cardiomyocytes, et les jonctions communicantes (gap junction), qui permet la diffusion rapide des ions et des signaux électriques entre les cellules (Source: https://tinyurl.com/4das6y8k)

Les cardiomyocytes peuvent aussi interagir avec d'autres types cellulaires qui composent le tissu cardiaque comme les cellules endothéliales, les fibroblastes ou encore les cellules immunitaires. En plus des interactions directes, les cardiomyocytes peuvent sécréter différentes molécules, dont l'endothéline-1 (EDN1), les facteurs de croissances des fibroblastes (FGF) ou encore l'adénosine, et avoir un effet juxtacrine, ou paracrine, sur les cellules endothéliales afin de réguler le tonus vasculaire (Figure 6) (Leucker & Jones, 2014). Certains cardiomyocytes, principalement situés dans les oreillettes, sont également capables de sécréter des peptides dont les peptides natriurétique auriculaire (ANP) et natriurétique cérébral (BNP). En plus de ces peptides, ils peuvent sécréter d'autres cardiomyokines, qui ont aussi bien des effets autocrines que paracrines. Ces cardiomyokines sont sécrétées par les cardiomyocytes lors d'un stress qui peut être une augmentation de la pression sanguine ou un événement ischémique (Chiba et al., 2017; Perrone et al., 2023).

1.3.2. Les cellules endothéliales

Comme mentionné précédemment, les cellules endothéliales tapissent l'ensemble des cavités cardiaques et des vaisseaux. Ce sont des cellules polarisées dont la membrane apicale est exposée à la circulation sanguine, et la membrane basolatérale est fixée sur une membrane basale glycoprotéique, sécrétée directement par les cellules endothéliales, et qui sépare l'endothélium des organes. La membrane apicale est principalement impliquée dans la régulation des échanges entre le sang et les tissus, tandis que la membrane basale est impliquée dans l'adhésion cellulaires et la communication avec les cellules du tissu sous-jacent, comme les cardiomyocytes. La morphologie des cellules endothéliales varie, mais elles sont généralement minces et allongées. En plus d'être polarisées, elles sont orientées de manière parallèle au flux sanguin afin de réduire les phénomènes de résistance (Krüger-Genge et *al.*, 2019).

Les cellules endothéliales vasculaires et endocardiques ont de nombreuses fonctions communes telles que la formation d'une barrière sélective, la modulation des tissus sous-jacents et la réponse aux stimuli mécaniques. Il existe néanmoins des spécificités. En effet, les cellules endothéliales vasculaires sont impliquées dans la régulation du flux sanguin, la perméabilité vasculaire ou encore l'angiogenèse. Les cellules endothéliales endocardiques sont quant à elles impliquées dans le développement cardiaque et la contraction du myocarde. Il existe donc des signatures spécifiques des différents types cellulaires.

Des analyses transcriptomiques en cellules uniques de cœurs humains adultes ont permis de mettre en avant que Intracellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1, ou CD54) semble être spécifique des cellules endothéliales vasculaires, et plus précisément des capillaires sanguins. Le récepteur du peptide natriuretic 3 (NPR3) est lui spécifique des cellules endothéliales endocardiques (Litviňuková et *al.*, 2020). Par ailleurs, CD105 (endoglin) est un marqueur

caractéristique des cellules endothéliales vasculaires, où il joue un rôle clé dans la signalisation du TGF-β, particulièrement dans le contexte de l'angiogenèse tumorale (Kopczyńska & Makarewicz, 2012).

Une étude protéomique sur des cœurs de porc a permis de mettre en avant quelques différences entre les cellules endothéliales endocardiques et les cellules endothéliales qui composent la valve aortique. La majorité des protéines étudiées sont exprimées dans les deux types cellulaires et en proportion similaire. Néanmoins, l'analyse d'enrichissement a permis de mettre en avant une surexpression significative de CD44 (protéine transmembranaire qui joue un rôle dans l'adhésion et la migration cellulaire) dans les cellules endothéliales de valve aortique par rapport aux cellules endocardiques (Kumar et *al.*, 2021). Concernant les marqueurs spécifiques des cellules endothéliales endocardiques, différentes études transcriptomiques ont permis de mettre en avant différents gènes signature dont l'intégine-α-9 (ITGA9) (Capon et *al.*, 2022).

Comme les cardiomyocytes, les cellules endothéliales peuvent réguler les différents types cellulaires cardiaques grâce à un effet paracrine. Par exemple, les cellules endothéliales endocardiques jouent un rôle de régulateur des cardiomyocytes notamment grâce à la sécrétion de molécules telles que l'angiotensine-II (Ang-II), l'EDN1 ou encore des prostaglandines (Colliva et *al.*, 2020; Kumar et *al.*, 2021). D'autres molécules sont sécrétées par les cellules endothéliales : l'oxyde nitrique (NO) qui semble avoir un effet cardioprotecteur, ou la neuréguline 1 (NRG1) qui joue un rôle physiologique, en permettant aux cardiomyocytes de s'adapter en fonction des forces de cisaillement, et un rôle pathologique, en favorisant l'hypertrophie (Figure 6) (Colliva et *al.*, 2020; Kamo et *al.*, 2015; Leucker & Jones, 2014). Les vésicules extracellulaires sont également décrites dans les communications intercellulaires entre les cardiomyocytes et les cellules endothéliales (Colliva et *al.*, 2020). En plus de leurs sécrétions, les cellules endothéliales peuvent interagir avec les cardiomyocytes directement *via* des jonctions communicantes, grâce aux connexines présentes sur les deux types cellulaires. Les cellules endothéliales jouent alors un rôle de mécano-senseur et influencent la contraction myocardique. Ces liaisons hétérocellulaires sont associées à une amélioration de l'organisation structurelle et de la survie des cardiomyocytes (Colliva et *al.*, 2020).

La communication entre les deux types cellulaires semble être impliquée dans différentes pathologies cardiovasculaires comme les cardiomyopathies génétiques, les maladies valvulaires ou encore lors de transplantations cardiaques (Colliva et *al.*, 2020).

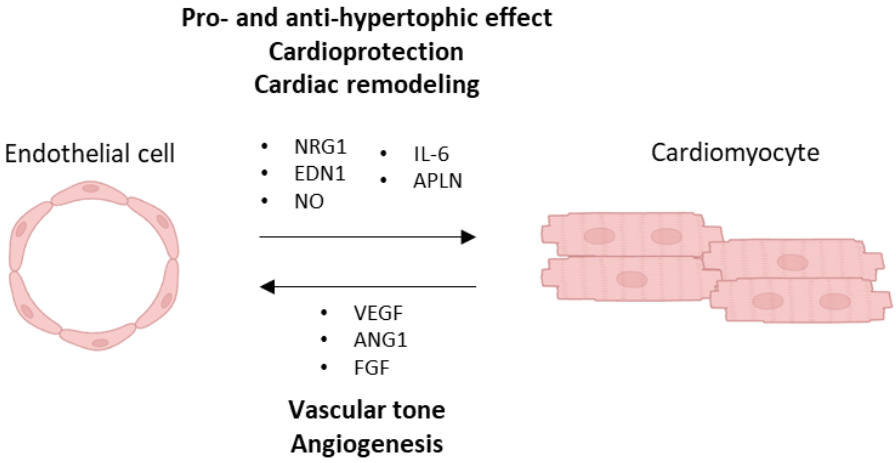


Figure 6 : Effet paracrine entre les cellules endothéliales et les cardiomyocytes
Les cellules endothéliales sécrètent des médiateurs tels que le NRG1 (neureguline-1), l'EDN1 (endothéline-1) et le NO (oxyde nitrique), qui exercent des effets pro- et anti-hypertrophiques, ainsi que des propriétés cardioprotectrices. Elles produisent également l'IL-6 (interleukine-6) et l'APLN (apeline), contribuant à la régulation du remodelage cardiaque. En retour, les cardiomyocytes influencent les cellules endothéliales par la sécrétion de VEGF (facteur de croissance vasculaire endothélial), ANG1 (angiopoïétine-1) et FGF (facteur de croissance des fibroblastes), favorisant la modulation du tonus vasculaire et l'angiogenèse. Ces échanges complexes jouent un rôle central dans l'homéostasie cardiovasculaire et les réponses aux stress pathologiques. Réalisé avec BioRender.

En réponse à un signal de danger, les cellules endothéliales sont capables de modifier leur profil d'expression favorisant la sécrétion de molécule pro-inflammatoires pour recruter des cellules immunitaires spécialisées, et d'augmenter la perméabilité vasculaire facilitant ainsi le passage des cellules immunitaires vers les tissus lésés (Mai et al., 2013). Le rôle des cellules endothéliales dans la réponse immunitaire sera détaillé dans le Chapitre 3.2.1.

1.3.3. Les fibroblastes cardiaques

Les fibroblastes cardiaques sont une des populations cellulaires les plus représentées dans le tissu cardiaque. Ils forment un réseau tridimensionnel dans le tissu conjonctif, et permettent de conserver la structure du myocarde en soutenant les cardiomyocytes mais aussi les vaisseaux sanguins (Camelliti et *al.*, 2005; Perez-Shibayama et *al.*, 2022). Les fibroblastes produisent les différentes protéines qui composent la matrice extracellulaire : collagène, fibronectine, laminine et protéoglycanes (Kamo et *al.*, 2015).

Dans le tissu cardiaque sain, les fibroblastes sont quiescents et forment un réseau en étroite liaison avec les cardiomyocytes grâce à des jonctions communicantes, notamment grâce aux connexines. Bien que les fibroblastes ne soient pas des cellules excitables, ils peuvent jouer un rôle de mécano-transducteurs et permettent la synchronisation de la contraction des cardiomyocytes interconnectés (Camelliti et *al.*, 2005).

Lors d'une inflammation du tissu cardiaque, les fibroblastes sont largement impliqués dans les processus de remodelage cardiaque. Cela repose sur leur prolifération et la modification de la composition de la matrice extracellulaire, conduisant à de la fibrose et à l'hypertrophie des cardiomyocytes. Ces mécanismes sont déclenchés par différents facteurs humoraux sécrétés par les différentes cellules cardiaques tels que l'Ang-II, l'EDN1 ou encore le Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α) (Camelliti et *al.*, 2005). Des études ont mis en avant l'implication de différentes protéines sécrétées par les fibroblastes dans l'hypertrophie des cardiomyocytes dont le Transforming Growth Factor-β (TGF-β) et le Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) (Kamo et *al.*, 2015).

2. Utilisation des cellules humaines pluripotentes induites en recherche cardio-vasculaire

En recherche cardiovasculaire, les modèles animaux et cellulaires traditionnels ont apporté des connaissances précieuses sur les mécanismes physiopathologiques. Cependant, les modèles animaux ne permettent pas de tenir compte des spécificités humaines et les travaux sur lignées cellulaires ne considèrent pas le rôle du contexte généré par l'organisme ou la maladie. Pour étudier avec précision les pathologies cardiaques humaines, il est crucial de travailler avec des modèles reflétant à la fois les propriétés humaines et la maladie, donc avec du matériel provenant directement des patients. Cela permet aussi d'étudier la composante génétique des maladies.

Si ces limites, liées à l'utilisation de modèles animaux et de modèles cellulaires concernent de nombreux domaines de la recherche médicale, elles prennent une dimension particulière dans le cas des maladies cardiovasculaires car le tissu cardiaque est presque inaccessible pour des prélèvements à des fins de recherche. De plus, les cellules cardiaques matures humaines sont extrêmement difficiles, voire impossibles, à utiliser pour des modèles *in cellulo* en raison de la nature non régénérative des cardiomyocytes et des défis liés à leur isolement et leur culture *in vitro*. C'est dans ce contexte que les cellules souches pluripotentes induites humaines constituent une voie d'avenir grâce à leurs caractéristiques uniques. Ces cellules, reprogrammées à partir de cellules somatiques de patient, constituent ainsi un reflet plutôt fidèle de la maladie cardiovasculaire chez un individu.

2.1. Découverte des cellules souches pluripotentes induites

En 2006, Takashi et Yamanaka ont fait une découverte révolutionnaire en reprogrammant des cellules de souris en cellules souches pluripotentes induites (hiPSC) *via* la transduction de cellules somatiques avec des vecteurs rétroviraux codant pour quatre facteurs de transcription connus sous le nom de facteurs de Yamanaka : Oct3/4 (Octamer-binding transcription factor 3/4), Sox2 (Sex Determining Region Y-Box 2), Klf4 (Kruppel-Like Factor 4) et c-Myc (Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog). Ces facteurs de transcription activent les gènes associés à la pluripotence, et inhibent ceux impliqués dans la différenciation cellulaire. Oct3/4, Sox2 et NANOG (Nanog Homeobox) sont des régulateurs essentiels du maintien de la pluripotence dans les cellules souches. En plus de son rôle dans la pluripotence, Klf4 influence la prolifération cellulaire en réprimant l'expression du gène *p53* (*T*umor protein P53), un suppresseur de tumeurs qui peut activer des mécanismes de sénescence ou d'apoptose, empêchant ainsi la prolifération incontrôlée des cellules endommagées. Enfin, c-Myc est un facteur de transcription majeur impliqué dans la prolifération cellulaire et l'oncogenèse. La balance entre c-Myc et Klf4 est donc cruciale pour réguler à la fois la prolifération et la survie des hiPSC, un déséquilibre pouvant entraîner des effets indésirables comme la tumorigenèse. Au cours de la différenciation cellulaire, l'expression des protéines Oct3/4 et Sox2 diminue progressivement, marquant la sortie de l'état pluripotent (Takahashi & Yamanaka, 2006). En 2007, Yamanaka a démontré que cette technique de manipulation du destin cellulaire chez la souris pouvait être étendue aux cellules humaines : la reprogrammaiton des fibroblastes humains en cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSC), ouvrait ainsi la voie à des applications thérapeutiques prometteuses (Takahashi et *al.*, 2007).

Cette approche a toutefois un défaut majeur puisque les vecteurs rétroviraux utilisés intègrent aléatoirement des facteurs de Yamanaka dans le génome de la cellule hôte. Cette intégration permanente augmente le risque de mutations insertionnelles et d'oncogénèse, rendant l'utilisation de ces rétrovirus inadaptée aux applications cliniques. Pour répondre à ce problème, Fusaki *et al.* ont développé en 2009 une méthode de reprogrammation alternative utilisant le virus Sendai, un virus à ARN qui, contrairement aux rétrovirus, n'intègre pas son matériel génétique dans le génome de la cellule hôte. Le virus de Sendai permet donc l'introduction transitoire de facteurs de reprogrammation sans intégration, réduisant ainsi le risque d'instabilité génomique ouvrant la voie aux applications thérapeutiques (Fusaki et *al.*, 2009).

D'autres méthodes de reprogrammation non intégratives ont depuis vu le jour, dont les vecteurs épisomaux et la transfection par ARN messager (Menon et *al.*, 2016). Bien que la méthode de transfection par mRNA se soit révélée la plus efficace, elle est plus complexe à

mettre en œuvre car elle nécessite des manipulations quotidiennes pour obtenir une expression suffisante des facteurs de pluripotence. La méthode de reprogrammation *via* le virus Sendai reste considérée : elle est simple et fiable, même si elle exige un suivi pour garantir l'élimination complète du virus après la reprogrammation (Schlaeger et *al.*, 2015).

2.2. Différenciation des cellules souches pluripotentes induites

Le principal atout des cellules hiPSC est leur capacité unique à se différencier en types cellulaires dérivés des trois feuillets embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme). Cette propriété est confirmée par la formation de tératomes *in vivo* et de corps embryoïdes *in vitro* (Takahashi et *al.*, 2007).

De nombreux protocoles existent pour différencier les cellules souches pluripotentes induites (hiPSC) en cellules cardiaques (Lyra-Leite et *al.*, 2022; Trillhaase et *al.*, 2021). La première étape de ces protocoles consiste à induire les cellules vers une lignée mésodermique (Figure 7.A). Cela nécessite d'activer la voie Wingless integrated (Wnt) canonique à l'aide de CHIR99021, un inhibiteur de la glycogen synthase kinase-3 (GSK-3). GSK-3 joue un rôle essentiel dans la dégradation de la β-caténine, une protéine centrale de la voie Wnt. En inhibant GSK-3, le CHIR99021 permet à la β-caténine de s'accumuler dans le cytoplasme, puis de migrer vers le noyau où elle active les gènes cibles de Wnt (Figure 7.B). Parallèlement, il est également nécessaire d'activer la voie des SMAD, en utilisant des protéines de la famille TGF-β : l'activine A est utilisée pour stimuler SMAD2 et SMAD3, tandis que le BMP4 active les SMAD1, SMAD5 et SMAD8 (Figure 7.B) (Jeziorowska et *al.*, 2015; Patsch et *al.*, 2015; Später et *al.*, 2014). Une fois le phénotype mésodermique obtenu, deux voies de différenciation sont possibles : la génération de cardiomyocytes ou de cellules endothéliales.

Pour orienter la différenciation vers des cardiomyocytes, il est essentiel d'inhiber la voie Wnt, avec par exemple la molécule IWR-1 (Figure 7.A) qui stabilise le complexe de dégradation de la β-caténine et diminue ainsi l'activité de cette voie (Figure 7.B). Suite à l'inhibition de Wnt, les cellules sont maintenues en culture pour favoriser leur organisation et leur maturation progressive, ce qui conduit à l'apparition de battements spontanés, signe d'un phénotype cardiaque fonctionnel (Jeziorowska et *al.*, 2015; Musunuru et *al.*, 2018; Später et *al.*, 2014). Des protocoles spécifiques permettent de cibler préférentiellement la différenciation vers différentes sous-populations de cardiomyocytes (ventriculaires, auriculaires ou nodaux). De plus, afin d'améliorer la maturation des cardiomyocytes et obtenir un phénotype plus proche des cardiomyocytes adultes différentes techniques sont utilisées comme la stimulation mécano-électrique, l'enrichissement des milieux en acides gras, la co-culture avec d'autres types cellulaires cardiaques (tels que les cellules endothéliales et les fibroblastes), ainsi que

l’emploi de micropatterns pour l’ingénierie tissulaire (supports permettant d’imposer une structure aux cellules en culture) (Lyra-Leite et *al.*, 2022).

Pour induire la différenciation en cellules endothéliales, l’ajout de facteurs spécifiques comme le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) et la forskoline (Figure 7.A). La forskoline active l’enzyme adénylate cyclase, augmentant ainsi les niveaux d’AMP cyclique, ce qui active la protéine kinase A (PKA). Cette activation entraîne à son tour la phosphorylation de différentes cibles, modulant l'expression génique et favorisant la différenciation endothéliale. La culture est ensuite poursuivie en présence exclusive de VEGF, pour maintenir le développement et la maturation des cellules endothéliales (Patsch et *al.*, 2015).

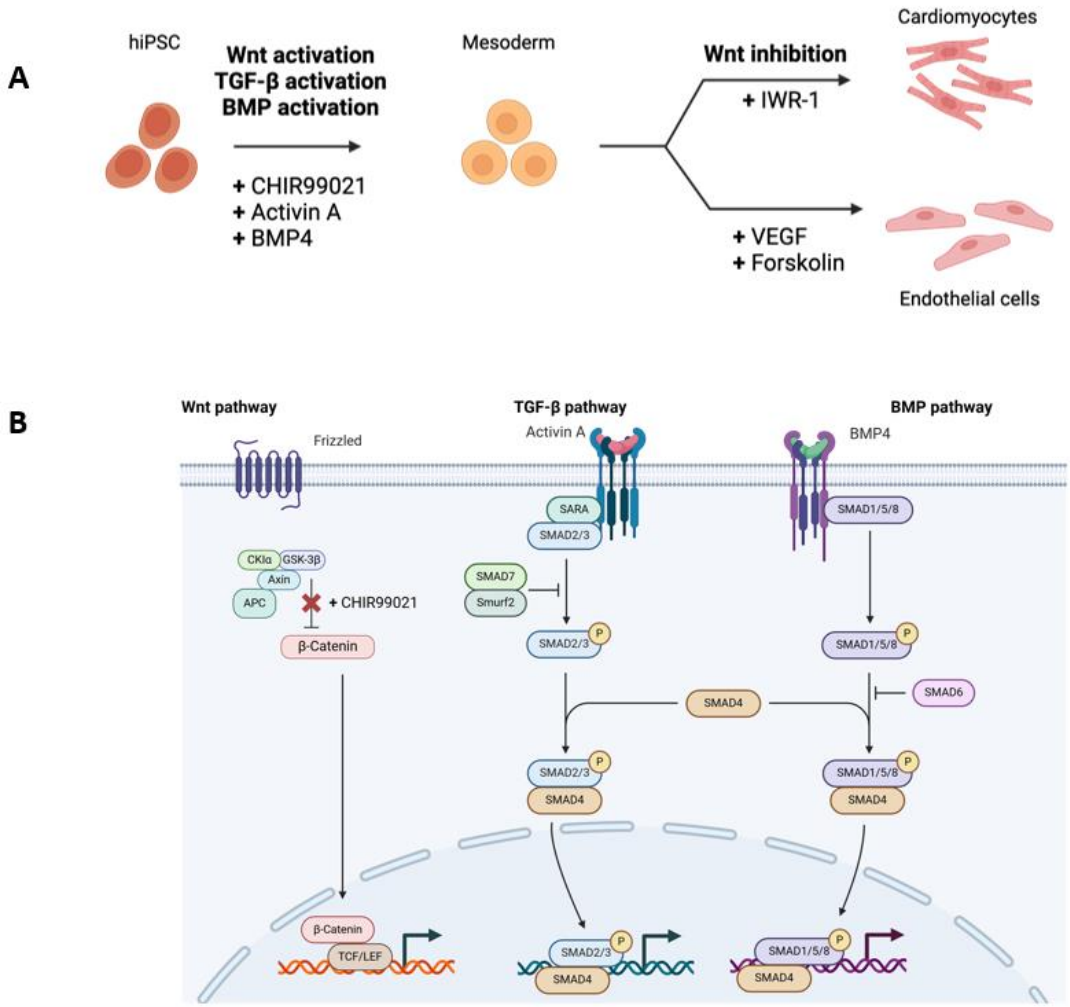


Figure 7 : Différenciation de cellules hiPSC en cellules cardiaques

(A) Différenciation des hiPSC en cellules mésodermiques : les hiPSC sont stimulées par des activateurs spécifiques, *i.e.* CHIR99021 (activation de Wnt), Activin A (activation de TGF-β) et BMP4 (activation de BMP) afin d'obtenir des cellules du mésoderme. Différenciation des cellules mésodermiques en cardiomyocytes : l'inhibition de la voie Wnt à l'aide d'IWR-1 oriente les cellules mésodermiques vers une différenciation en cardiomyocytes. Différenciation des cellules mésodermiques en cellules endothéliales : la combinaison de VEGF et Forskolin favorise la différenciation des cellules mésodermiques en cellules endothéliales. **(B)** Signalisation des voies Wnt, TGF-β et BMP. Voie Wnt : CHIR99021 inhibe GSK-3β, ce qui stabilise la β-caténine qui peut alors transloquer dans le noyau pour activer la transcription des gènes cibles nécessaires à la différenciation. Voie TGF-β : l'Activin A se lie au récepteur du TGF-β ce qui active SMAD2/3. Les SMAD2/3 phosphorylés forment un complexe avec SMAD4 et migrent dans le noyau pour réguler l'expression des gènes. Voie BMP : BMP4 se lie à son récepteur et phosphoryle SMAD1/5/9. Les SMAD phosphorylés s'associent à SMAD4 et participent à la régulation transcriptionnelle dans le noyau. Réalisé avec Biorender.

2.3. Avantages et limites des cellules souches pluripotentes induites

L'utilisation des hiPSC est en accord avec la règle des 3R : Remplacement, Réduction et Raffinement.

D'un point de vue éthique, l'utilisation de cellules hiPSC représente une alternative favorable aux cellules souches embryonnaires humaines dont l'obtention soulève des questions importantes comme le statut moral de l'embryon, la légitimité de sa destruction pour des avancées médicales, ou encore les risques de dérives éthiques telles que la commercialisation ou le clonage (Menon et *al.*, 2016). De plus, les hiPSC présentent un intérêt majeur en recherche biomédicale puisqu'elles conservent le patrimoine génétique du donneur. Cette caractéristique est particulièrement précieuse pour l'étude des maladies cardiovasculaires d'origine génétique, comme les cardiomyopathies dilatées (N. Sun et *al.*, 2012) qui requièrent des modèles cellulaires génétiquement fidèles pour comprendre leur développement et leurs mécanismes. Les hiPSC permettent également d'explorer les troubles du rythme cardiaque (Al Sayed et *al.*, 2024) et les pathologies vasculaires et valvulaires (Gu et *al.*, 2017). Les cellules cardiaques dérivées d'hiPSC trouvent aussi une application prometteuse en médecine personnalisée car elles permettent de tester divers médicaments pour adapter les traitements aux particularités génétiques du patient, facilitant ainsi l'identification des thérapeutiques les plus efficaces (Musunuru et *al.*, 2018).

Néanmoins, l'utilisation des hiPSC reste complexe en raison de la variabilité entre les lignées. Cette variabilité, due aux différences génétiques et épigénétiques propres aux clones, a été mise en lumière, en 2017, par l'initiative HipSci (Human Induced Pluripotent Stem Cells Initiative) qui a analysé 711 lignées de hiPSC provenant de 301 donneurs. Les variations génétiques individuelles influencent fortement les propriétés au niveau moléculaire des hiPSC, expliquant de 5 % à 46 % des différences phénotypiques observées. Ces variations affectent des aspects cruciaux comme la différenciation, la morphologie et l'expression génique, certaines lignées montrant des capacités de différenciation élevées ou réduites selon le profil génétique du donneur (Kilpinen et *al.*, 2017). De plus, la diversité des protocoles de culture et de différenciation ainsi que les conditions expérimentales influencent directement la qualité et la fonction des cellules (Volpato & Webber, 2020). La génération d'hiPSC en « bulk », c'est-à-dire sans sélection clonale, permettrait de minimiser la variabilité des différenciations due à la sélection des clones hiPSC lors de la reprogrammation, et de rendre ces différenciations plus efficaces (Rashid et al., 2023). Cette méthode consiste ainsi à moyenner la variabilité entre clones. Concernant les hiPSC générées pour modéliser les pathologies, il faut se poser la question de la conséquence de ce moyennage sur l'expression des gènes responsables du phénotype dans les cellules différenciées. Comme pour d'autres

technologies telles que le séquençage de l'ARN, les méthodes en « bulk » ou « single-cell » ont chacune leurs avantages et le choix dépend de la question posée et de son contexte.

Un autre moyen de minimiser cette variabilité est de mettre en place des protocoles standardisés de culture et de différenciation. L'adoption de méthodes rigoureuses pour caractériser et valider les hiPSC et les cellules différenciées, notamment à travers des tests de pluripotence et des analyses génomiques, est également essentielle. Par ailleurs, la description complète des méthodes expérimentales facilite la reproductibilité des résultats et la définition des caractéristiques cellulaires associées, ce qui est essentiel pour une application clinique fiable. Enfin, bien que les hiPSC soient un outil précieux, la standardisation des pratiques et la prise en compte de la variabilité sont indispensables pour maximiser leur impact dans la recherche sur les maladies humaines et dans le développement de thérapies personnalisées adaptées aux caractéristiques génétiques spécifiques de chaque patient (Volpato & Webber, 2020).

3. Le système immunitaire et l'inflammation dans les cardiopathies

3.1. Rôle du système immunitaire et de la signalisation inflammatoire

Les maladies cardiovasculaires constituent un ensemble de troubles affectant le cœur et les vaisseaux sanguins, comme l'athérosclérose, les troubles du rythme cardiaque, l'infarctus du myocarde, l'insuffisance cardiaque ou encore les accidents vasculaires cérébraux. Le système immunitaire et les processus inflammatoires jouent un rôle majeur dans le développement de ces pathologies, et de nombreuses études précliniques montrent que l'activation immunitaire peut avoir des effets à la fois bénéfiques et délétères. En particulier, le système immunitaire joue un rôle central dans la défense contre les pathogènes, responsables par exemple de la myocardite virale, ou dans le remodelage cardiovasculaire suite à un infarctus du myocarde. Les cellules immunitaires interagissent alors avec différents types cellulaires cardiaques dont les cardiomyocytes, les cellules endothéliales et les fibroblastes (Swirski & Nahrendorf, 2018).

3.1.1. Activation du système immunitaire

Les mécanismes d'activation du système immunitaire en réponse à une infection ou au développement d'une tumeur sont fortement régulés pour préserver la tolérance immunitaire. De manière générale, l'activation des lymphocytes T (LT) se fait en plusieurs étapes. Les cellules présentatrices d'antigènes (APC), telles que les cellules dendritiques, les monocytes, les macrophages et les lymphocytes B (LB), capturent des antigènes d'origine bactérienne ou tumorale grâce aux complexes majeurs d'histocompatibilité (MHC) de classe I et II. Ces APC migrent ensuite vers les ganglions lymphatiques pour rencontrer les LT naïfs. La reconnaissance du complexe antigène-MHC (de classe I ou II) par le récepteur des cellules T (TCR) permet d'initier l'activation des LT. Le signal intracellulaire émis par le TCR est nécessaire mais pas suffisant pour activer les LT, il doit être accompagné de signaux co-activateurs. Lorsqu'il y a une infection ou un tissu endommagé, les APC expriment à leur surface des protéines co-stimulatrices des LT : les protéines de la famille B7, CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2). Ces deux immunoglobulines sont principalement exprimées par les cellules dendritiques, les macrophages et les LB. Afin d'émettre un signal de co-activation, CD80 ou CD86 doivent se lier au récepteur CD28 présent sur les LT. Quand les deux signaux d'activation sont simultanés, les LT sont activés les LT $CD4^+$ se différencient en lymphocytes T helper (Th), tandis que les LT $CD8^+$ se différencient en lymphocytes T cytotoxiques (Grabie et *al.*, 2019; J.-R. Hu et *al.*, 2019; S. K. Kim & Cho, 2022).

Les lymphocytes Th $CD4^+$ reconnaissent des peptides présentés par les MHC de classe II et ont plusieurs fonctions : (i) activation des LB pour induire la production d'anticorps, (ii) activation des LT $CD8^+$ via la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dont l'interleukine-2 (IL-2) et l'interféron-gamma (IFN-γ) qui stimulent leur prolifération, et (iii) sécrétion de cytokines pro-inflammatoires qui permettent d'activer et de recruter d'autres cellules immunitaires comme les macrophages et les neutrophiles (Markousis-Mavrogenis et *al.*, 2024).

Les lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques reconnaissent des peptides présentés par les MHC de classe I et détruisent les cellules infectées ou tumorales par différents mécanismes : (i) libération de granules cytotoxiques dans la synapse immunologique, (ii) induction de l'apoptose, et (iii) sécrétion de cytokines modulant la réponse immunitaire (S. K. Kim & Cho, 2022; Markousis-Mavrogenis et *al.*, 2024).

Les protéines contenues dans les granules cytotoxiques (perforine et granzymes) peuvent induire l'apoptose dans les cellules cibles. Toutefois, ce processus peut également être initié par la liaison des protéines membranaires FAS-L (FAS ligand), présentes sur les LT cytotoxiques $CD8^+$, aux récepteurs FAS (CD95) situés sur la cellule cible. Cette interaction déclenche une cascade de signaux intracellulaires conduisant à l'activation de l'apoptose (S. K. Kim & Cho, 2022).

3.1.2. Activation du système immunitaire dans le tissu cardiaque

Dans un tissu cardiaque sain, des cellules immunitaires résidentes, principalement des macrophages et des cellules dendritiques, sont naturellement présentes (Markousis-Mavrogenis et *al.*, 2024; Swirski & Nahrendorf, 2018).

Lorsqu'une altération du tissu cardiaque survient, provoquant un stress ou la mort des cardiomyocytes, une réaction immunitaire est déclenchée. Les cardiomyocytes endommagés libèrent des signaux de danger (DAMPs : damage-associated molecular patterns), tels que de l'ADN, de l'ARN, des protéines, ou encore des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans le tissu cardiaque (Figure 8.1). Ces DAMPs sont reconnus par les cellules immunitaires résidentes, ce qui active plusieurs voies inflammatoires, notamment la voie NF-κB et celle de l'inflammasome NLRP3 (Figure 8.2), décrites plus en détail ci-après.

L'activation des cellules immunitaires résidentes permet aux macrophages d'éliminer les cellules apoptotiques et aux cellules dendritiques de migrer vers les ganglions lymphatiques, où elles activent et recrutent des lymphocytes (Figure 8.5). Les sécrétions des cellules immunitaires résidentes jouent un rôle essentiel dans ce processus, car elles permettent l'augmentation de l'expression des protéines d'adhésion au niveau de la barrière endothéliale (Figure 8.3). Cela facilite l'infiltration des lymphocytes (Figure 8.5) et d'autres cellules immunitaires recrutées (Figure 8.4) dans le tissu cardiaque (Figure 8.6), où elles exercent leurs fonctions spécifiques (Figure 8.7) (Markousis-Mavrogenis et *al.*, 2024).

Lors d'une inflammation du tissu cardiaque, les cellules endothéliales jouent un rôle majeur dans l'activation précoce du système immunitaire. Les cellules endothéliales possèdent à la fois des récepteurs aux chimiokines et des récepteurs de danger (*i.e.* NOD-like receptor et Toll-like receptor). Lorsqu'elles sont activées, elles sécrètent des molécules pro-inflammatoires dont différentes interleukines (i.e. IL-1B, -6 et -8), des cytokines (CXCL1, CCL2 ou CCL5) ainsi que du TNF-α (Figure 8.3). Cette sécrétion pro-inflammatoire permet de potentialiser la réponse inflammatoire en recrutant différentes cellules immunitaires. L'augmentation de l'expression de protéines d'adhésion au niveau de l'endothélium permet aux leucocytes d'adhérer et d'avancer (hausse des sélectines) jusqu'au site d'inflammation (hausse des intégrines) et finalement de migrer dans les tissus sous-jacents (hausse deCD31 et d'ICAM-1) (Figure 8.3) (Mai et al., 2013).

La balance entre la sécrétion pro- et anti-inflammatoire est un facteur essentiel de la progression de la maladie, et les cellules endothéliales peuvent exercer leur effet anti-inflammatoire en produisant par exemple des antagonistes du récepteur à l'IL-1 (IL-1Ra) ou encore sécréter de l'IL-10, IL-13 ou TGF-B (Mai et al., 2013).

Les cellules endothéliales peuvent aussi jouer un rôle de cellules présentatrices d'antigènes important lors des transplantations d'organes et sont impliqués dans les mécanismes de rejet. En effet, en présence d'IFN-γ, on observe une augmentation de l'expression de MHC-I ainsi que l'initiation de la transcription de MHC-II ou des protéines B7, participant à l'activation des lymphocytes T (processus décrit plus en détail dans la partie 3.1.3.) (Mai et al., 2013).

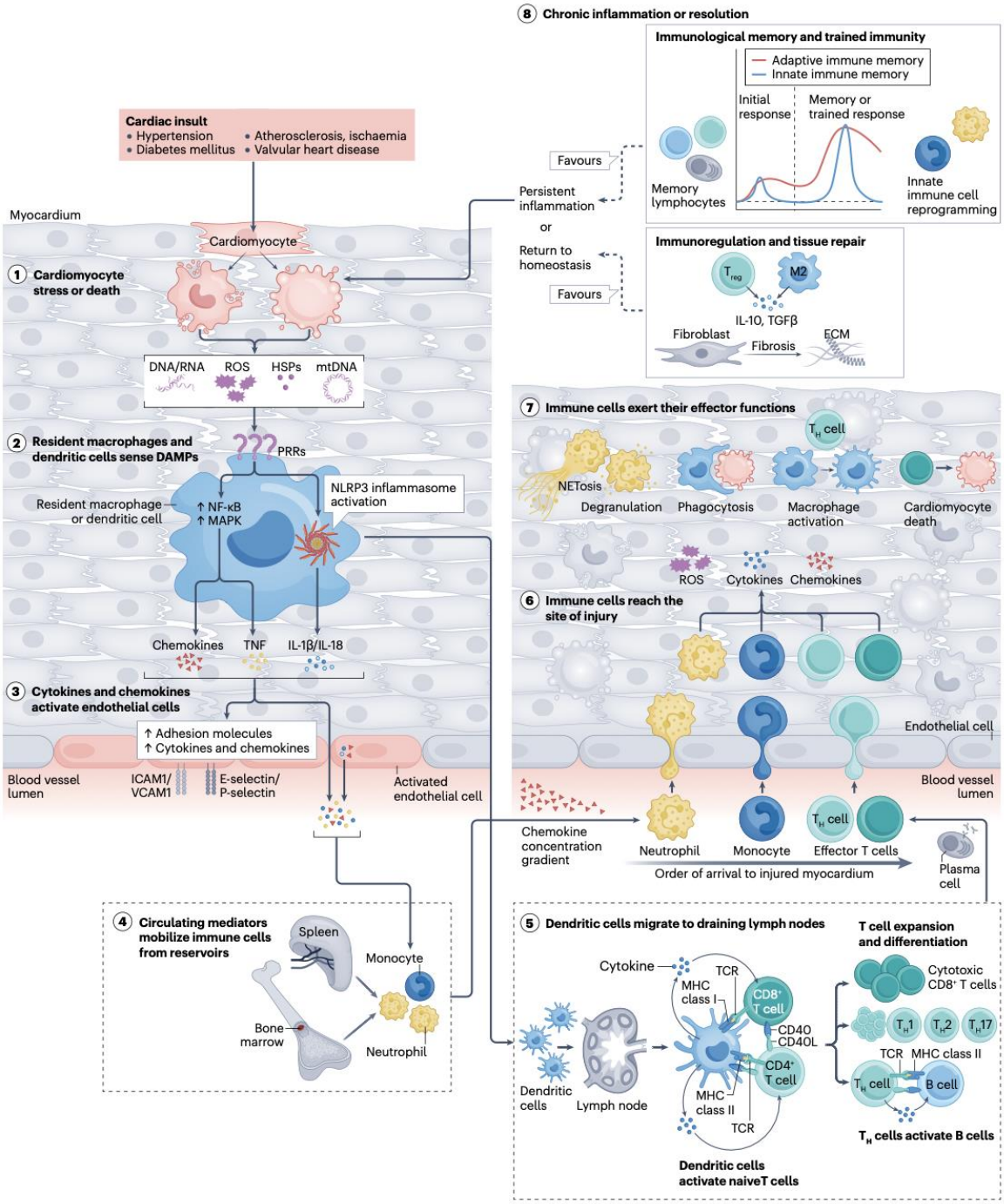


Figure 8 : Activation du système immunitaire dans le tissu cardiaque
(1) Lésion cardiaque. **(2)** Activation des cellules immunitaires résidentes. **(3)** Activation des cellules endothéliales. **(4)** Recrutement des neutrophiles et monocytes. **(5)** Recrutement des lymphocytes. **(6)** Infiltration des cellules immunitaires dans le tissu cardiaque. **(7)** Action des cellules immunitaires. (Markousis-Mavrogenis et *al.*, 2024)

3.1.3. Régulation de l'inflammation *via* les points de contrôle immunitaire

Certains récepteurs agissent comme régulateurs négatifs des lymphocytes T et sont appelés points de contrôle immunitaire (immune checkpoint). Leur interaction avec leurs ligands permet de freiner, voire de bloquer, une activation excessive ou inappropriée des LT, notamment lorsqu'ils reconnaissent des auto-antigènes.

Le récepteur Cytotoxic T Lymphocyte-Associated protein-4 (CTLA-4) se lie aux protéines de la famille B7 présentes sur les APC avec une affinité dix fois supérieure à celle du récepteur CD28 (J.-R. Hu et *al.*, 2019). Cette liaison compétitive délivre un signal inhibiteur aux LT, bloquant ainsi l'activation de la réaction immunitaire. Dans les LT naïfs, CTLA-4 est initialement situé dans des vésicules intracellulaires, qui fusionnent avec la membrane cellulaire en cas d'activation importante via le TCR (Buchbinder & Desai, 2016).

Le récepteur Programmed Cell Death 1 (PD-1), également exprimé par les LT naïfs, se lie à deux ligands de la famille B7 : Programmed Cell Death-Ligand-1 (PD-L1) et Programmed Cell Death Ligand-2 (PD-L2). Contrairement à PD-L2 qui est principalement exprimé par les APC, PD-L1 est exprimé de manière constitutive à la membrane de cellules de différents organes comme le cœur, le placenta, les muscles squelettiques ou encore les poumons (Freeman et *al.*, 2000). La liaison d'un de ses ligands à PD-1 inhibe les signaux d'activation délivrés par la liaison du TCR à un antigène et par CD28.

L'inhibition par ces deux points de contrôle immunitaire se met en place à différents stades de l'activation des LT. CTLA-4 interagit avec les protéines B7 exprimées par les APC, la réaction se déroule donc principalement au niveau des tissus lymphoïdes et induit la différenciation des LT naïfs en LT régulateurs (Treg) impliqués dans la tolérance immune. En revanche, PD-1 intéragit avec PD-L1 qui est essentiellement exprimé dans les tissus non-lymphoides, la réaction d'inhibition se déroule alors dans différents organes infiltrés par des LT effecteurs. Lorsque ces LT effecteurs infiltrent le tissu cardiaque et sont activés en l'absence de régulation appropriée, ils peuvent provoquer une myocardite immuno-induite en attaquant les cellules myocardiques (Figure 9) (Grabie et *al.*, 2019).

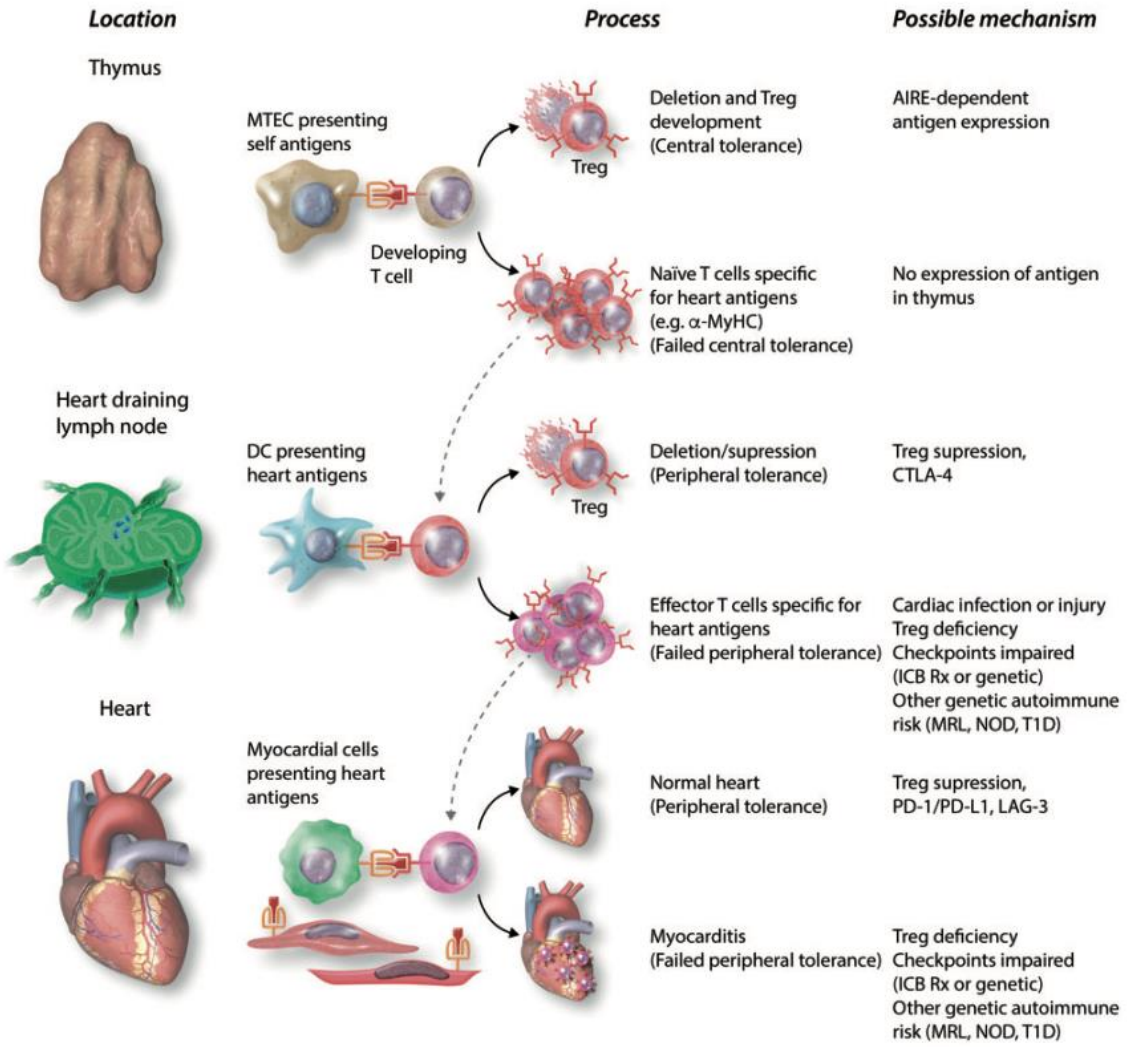


Figure 9 : Mécanismes de tolérance des cellules T aux antigènes cardiaques et régulation de leur activation

Les mécanismes de tolérance des cellules T ont lieu à trois localisations clés : le thymus, les ganglions lymphatiques drainant le cœur, et le tissu cardiaque. **Au niveau du thymus** : les cellules épithéliales médullaires thymiques (MTEC) expriment des antigènes de différents tissus et jouent un rôle de régulateurs auto-immun (AutoImmune REgulator : AIRE). Les MTEC présentent les antigènes aux LT en développement, entraînant la délétion des clones autoréactifs et/ou la génération de LT régulatrices (Treg) (tolérance centrale). Certains antigènes cardiaques, comme la myosine lourde alpha (α-MyHC), n'étant pas exprimés dans le thymus, des LT spécifiques échappent à cette tolérance. **Dans les ganglions lymphatiques qui drainent le cœur :** les cellules dendritiques (DC) présentant des antigènes cardiaques peuvent induire la délétion ou la suppression des cellules T autoréactives *via* des mécanismes de tolérance périphérique impliquant les Treg et CTLA-4. Une activation pathologique des LT peut survenir en cas de suppression défaillante des Treg, d'infection ou de lésions augmentant la co-stimulation. **Au sein du tissu cardiaque :** les cardiomyocytes et cellules endothéliales exprimant PD-L1 régulent l'activation des LT effectrices spécifiques des antigènes cardiaques, évitant ainsi les dommages. Si cette régulation échoue, par exemple en cas de déficience des Treg ou d'inhibition des points de contrôle immunitaires, des myocardites auto-immunes peuvent survenir. (Grabie et *al.*, 2019)

D'autres molécules co-inhibitrices de la réaction immunitaire ont été identifiées à ce jour. L'immunoglobuline Lymphocyte Activation gene-3 (LAG-3) est plus largement exprimée à la surface des cellules immunitaires puisqu'elle est présente sur les lymphocytes T et B, les macrophages et les cellules dendritiques. LAG-3 inhibe l'activation des LT $CD4^+$ en se fixant aux MHC de classe II, ce qui empêche la reconnaissance par le TCR de l'antigène présenté par les APC. La protéine T cell immunoglobulin-3 (TIM-3) est, quant à elle, exprimée par les LT Natural Killer (NK), et les macrophages. TIM-3 peut se lier à différentes molécules impliquées dans l'inflammation : la galectine-9, impliquée dans la migration des leucocytes, la phosphatidylsérine, dont l'externalisation signale aux macrophages que la cellule doit être phagocytée, et la protéine carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule-1 (CEACAM-1), impliquée dans des phénomènes d'adhésion entre les cellules endothéliales et les leucocytes (Grabie et *al.*, 2019).

3.1.4. La signalisation inflammatoire

3.1.4.1. Les molécules pro-inflammatoires

Les molécules pro-inflammatoires présentées ci-dessous ont été identifiées dans des échantillons de patients ayant développé une myocardite immuno-médiée après une immunothérapie par inhibiteurs de points de contrôle immunitaire. Ces études sont détaillées dans la partie 4.4.1 de l'Introduction.

IFN-γ (Interféron-γ) :

L'IFN-γ est une cytokine impliquée dans la réponse immunitaire aux infections, mais également dans le développement de maladies auto-immunes (Lees, 2015). Il est sécrété principalement par les lymphocytes T $CD4^+$, $CD8^+$ et les cellules NK, mais aussi par d'autres cellules immunitaires dont les LB ou les APC (Schroder et *al.*, 2004).

Le récepteur à l'IFN-γ est exprimé dans la plupart des cellules nucléées et comporte deux sous-unités : IFNGR1 qui est membranaire et lie directement l'IFN-γ et IFNGR2 qui stabilise le complexe et permet la transduction du sign*al.* La voie de signalisation activée par cette liaison est classiquement la voie Janus Kinase (JAK) - Signal Transducteur and Activator of Transcription (STAT) et déclenche la transcription de nombreux gènes cibles via les éléments régulateurs GAS (Gamma-Activated Sequence). Cette activation est régulée par SOCS1 et SOCS3 (Suppressor of Cytokine Signalling) pour inhiber JAK1 et JAK2 (Schroder et *al.*, 2004).

Dans un contexte inflammatoire, l'IFN-γ induit une surexpression des molécules MHC-I et MHC-II dans les cellules cardiaques pour faciliter la reconnaissance et la présentation d'antigènes aux lymphocytes T $CD8^+$ et $CD4^+$, respectivement. L'expression de PD-L1 est également augmentée dans les cardiomyocytes et les cellules endothéliales et PD-L2

uniquement dans les cellules endothéliales (Eppihimer et al., 2013; Grinnemo et al., 2019; Rodig et al., 2003; Schroder et al., 2004; Tay et al., 2020; Valenzuela, 2023). L'activation de la voie JAK-STAT par l'IFN-γ est également responsable de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (*i.e.* CXCL9, CXCL10 et CXCL11) impliquées dans la chemoattraction des cellules immunitaires au niveau du site d'inflammation (Metzemaekers et *al.*, 2018; Valenzuela, 2023). La voie des MAPK peut aussi être activée par l'IFN-γ et moduler la perméabilité de la barrière endothéliale *via* l'expression de gènes d'adhésion tels que ICAM-1 ou VCAM-1 (Ng et *al.*, 2015; Valenzuela, 2023).

TNF-α (Tumor Necrosis Factor-α) :

Le TNF-α est une cytokine clé impliquée dans des processus inflammatoires et immunitaires. Cette cytokine est principalement sécrétée par des macrophages et des monocytes, mais les cellules endothéliales peuvent également en sécréter en réponse à des signaux inflammatoires, comme une infection, une lésion tissulaire ou la présence de cellules cancéreuses (Kalliolias & Ivashkiv, 2016).

Il existe deux types de récepteurs au TNF-α : TNFR1 et TNFR2. TNFR1 est exprimé de manière ubiquitaire et est responsable de la médiation de la majorité des réponses inflammatoires et apoptotiques. TNFR2, en revanche, est principalement impliqué dans la régénération tissulaire et l'homéostasie. Lorsque le TNF-α se lie à TNFR1, les voies de signalisation Nuclear Factor-κB (NF-κB) et des MAP kinases (MAPK) peuvent être activées. L'activation de ces voies induit une production de cytokines pro-inflammatoires et active les cellules endothéliales afin d'augmenter leur capacité d'adhésion des cellules immunitaires et ainsi favoriser leur recrutement au niveau des tissus endommagés. Le TNF-α peut également activer la caspase-8 et induire la mort cellulaire par apoptose afin d'éliminer les cellules endommagées ou infectées. Néanmoins, le TNF-α joue aussi un rôle dans la régénération des tissus, comme la réparation neuronale ou cardiaque (Kalliolias & Ivashkiv, 2016).

CCL5 :

CCL5 (C-C Motif Chemokine Ligand 5), également connue sous le nom de RANTES, est une chimiokine qui favorise la migration et l'adhésion des lymphocytes T, les monocytes et les macrophages aux sites d'inflammation ou de blessure. CCL5 contribue au développement tumoral en favorisant la suppression immunitaire, l'angiogenèse et la création d'un micro-environnement tumoral, notamment par le recrutement de cellules immunitaires telles que les macrophages associés aux tumeurs (W. Zhang et *al.*, 2018).

CCL5 est principalement sécrété par les cellules T activées, et les monocytes, et se lie à des récepteurs tels que CCR1, CCR3, CCR4, et CCR5 qui le plus important. Cette interaction active plusieurs voies de signalisation notamment : PI3K-AKT, qui favorise la survie cellulaire, la

prolifération et l'angiogenèse, NF-κB qui régule l'inflammation et la réponse immunitaire, ou encore JAK-STAT qui intervient dans la signalisation des cellules immunitaires et l'inflammation. CCL5 peut activer l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation (*IL-6, TNF-α*), la survie cellulaire (*BCL2*) et la progression du cycle cellulaire (*Cyclin D*). Il influence également les gènes qui régulent l'angiogenèse et les métastases, renforçant ainsi le potentiel invasif de la tumeur (W. Zhang et *al.*, 2018).

Interleukines :

Les interleukines (IL) jouent un rôle central dans la régulation de l'inflammation et de l'immunité, et leur implication dans les maladies cardiovasculaires est désormais bien documentée. Parmi celles-ci, l'IL-1β, l'IL-2 et l'IL-6 occupent une place essentielle en raison de leurs fonctions immunologiques et de leur contribution à l'inflammation chronique et aux dysfonctionnements endothéliaux.

L'IL-1β, une cytokine pro-inflammatoire produite principalement par les macrophages activés, est activée *via* l'inflammasome NLRP3 et la caspase-1. Elle agit en stimulant la voie NF-κB, ce qui entraîne l'expression de médiateurs inflammatoires tels que l'IL-6 et le TNF-α (Katkenov et *al.*, 2024; Zegeye et *al.*, 2018). Dans les maladies cardiovasculaires, l'IL-1β joue un rôle clé en exacerbant l'athérosclérose par l'activation des cellules endothéliales, le recrutement des leucocytes et l'amplification de l'inflammation locale. Les essais cliniques, comme l'étude CANTOS, ont démontré que l'inhibition ciblée de l'IL-1β à l'aide du canakinumab réduit significativement les événements cardiovasculaires récurrents, confirmant son rôle critique dans ces pathologies (Katkenov et *al.*, 2024). De plus, l'IL-1β agit en synergie avec d'autres cytokines, comme le TNF-α, pour amplifier l'expression de molécules pro-inflammatoires telles que l'IL-6, le GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor) et le MCP-1 (Monocyte Chemotacitc Protein 1 ou CCL2), exacerbant ainsi l'inflammation endothéliale dans des contextes comme l'insuffisance cardiaque et les myocardites (Krishnaswamy et *al.*, 1998).

L'IL-6, quant à elle, est une cytokine multifonctionnelle dont l'implication dans les maladies cardiovasculaires est largement documentée. Elle est produite par plusieurs types cellulaires, notamment les macrophages, les cellules endothéliales et les fibroblastes, en réponse à des stimuli inflammatoires (Zegeye et *al.*, 2018). L'IL-6 active principalement la voie JAK-STAT *via* son récepteur membranaire IL-6R, mais elle peut également activer les voies PI3K-AKT et MEK-ERK par trans-signalisation à l'aide de son récepteur soluble sIL-6R (Zegeye et *al.*, 2018). Cette trans-signalisation est particulièrement impliquée dans la progression des maladies cardiovasculaires, car elle favorise le recrutement des monocytes *via* la production de chimiokines telles que le MCP-1 et la régulation des molécules d'adhésion. L'IL-6 contribue également à l'instabilité des plaques d'athérome et à la dysfonction endothéliale, tandis que ses niveaux élevés sont corrélés à une augmentation significative du risque d'événements

cardiovasculaires tels que l'infarctus du myocarde et l'insuffisance cardiaque (Katkenov et *al.*, 2024).

Enfin, l'IL-2, bien que moins étudiée dans le contexte des maladies cardiovasculaires, joue un rôle crucial dans l'immunité adaptative et la régulation de la tolérance immunitaire. Elle favorise la prolifération des LT effecteurs tout en soutenant la survie des LT régulateurs (Treg), essentiels pour limiter les réponses inflammatoires excessives (Gaffen & Liu, 2004). L'IL-2 agit *via* son récepteur (IL-2R) composé de trois sous-unités (α, β, γ), activant les voies JAK-STAT, PI3K-AKT et MAPK-ERK pour promouvoir des signaux pro-prolifératifs et anti-apoptotiques (Gaffen & Liu, 2004). Bien que son rôle direct dans les maladies cardiovasculaires reste à clarifier, des études expérimentales suggèrent qu'une dérégulation de l'IL-2 peut contribuer à l'inflammation systémique et aux lésions vasculaires, favorisant potentiellement l'athérosclérose et d'autres pathologies cardiovasculaires (Gaffen & Liu, 2004).

En somme, ces cytokines interagissent avec des cellules telles que les monocytes, macrophages et cellules endothéliales pour orchestrer des réponses inflammatoires complexes, exacerbant les lésions vasculaires, l'athérosclérose et la dysfonction myocardique (Gaffen & Liu, 2004; Katkenov et *al.*, 2024; Krishnaswamy et *al.*, 1998; Zegeye et *al.*, 2018).

Granzyme B :

Les granules cytotoxiques libérés par les LT cytotoxiques activés sont principalement composés de perforine, protéine membranaire formant des pores dépendamment du calcium, et de granzyme, protéase à sérine dont le plus étudié est le granzyme B (GZMB). Les sous-unités de perforine et le granzyme sont stockés dans des granules lytiques avec un pH acide pour conserver les protéases inactives. Suite à la fusion des granules lytiques avec la membrane plasmique, ces composés se retrouvent dans la synapse immunologique entre le LT et la cellule cible. L'internalisation du granzyme peut se faire directement *via* les pores de perforine formés à la membrane de la cellule cible, ou bien par endocytose lorsque le mannose-6-phosphate (M6P), présent sur le granzyme et qui a permis son trafic jusqu'au golgi dans les LT, se fixe sur ses récepteurs sur la cellule cible. Une fois dans le cytoplasme, le GZMB initie la mise en place de l'apoptosome, et active la caspase-3 qui est une des caspases effectrices de l'apoptose (Figure 10) (Boivin et *al.*, 2009).

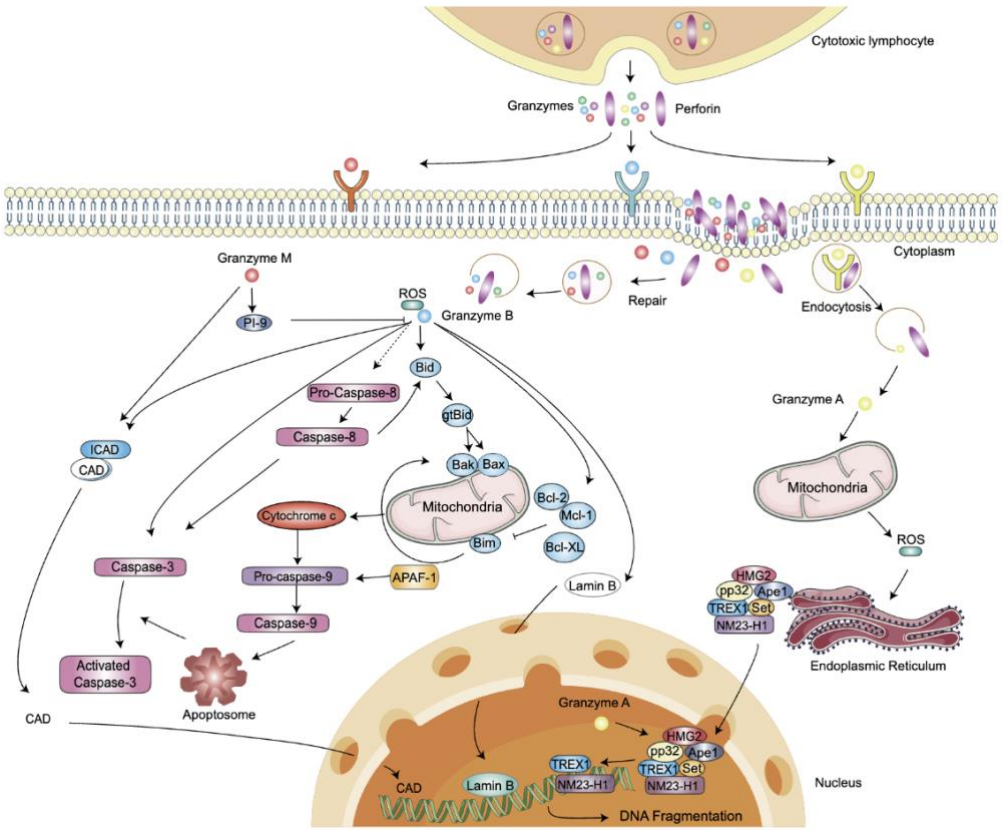


Figure 10 : Activation de l'apoptose par le granzyme B

Une fois dans le cytoplasme, le granzyme B (GZMB) clive la pro-caspase-3 et active *BID* (BH3 Interacting Domain Death Agonist), une protéine pro-apoptotique de la famille de *BCL-2* (BCL2 Apoptotic Regulator). Une fois activée, *BID* se lie à *BAX* (BCL-2 Associated X, Apoptotic Regulator) et/ou *BAK* (BCL-2 Antagonist/Killer 1) au niveau des mitochondries (Sutton et *al.*, 2000). *BAX* et *BAK* sont habituellement des protéines anti-apoptotiques, mais la liaison avec *BID* inhibe cette fonction et induit la perméabilisation de la membrane des mitochondries. Le cytochrome C est alors libéré dans le cytoplasme, permettant le recrutement et l'oligomérisation du complexe Apaf-1 (Apoptotic peptidase activating factor 1), principal composant de l'apoptosome. Une fois l'apoptosome mis en place, la pro-caspase-9 est recrutée, s'active par auto-clivage et clive les formes zymogènes des caspases effectrices -3 et -7 pour les rendre actives. Ces dernières vont exercer leur activité pro-apoptotique en détruisant la liaison entre CAD (Caspase-Activated DNase) et ICAD (Inhibitor of Caspase-Activated DNase). CAD est transloquée dans le noyau et dégrade l'ADN entre les nucléosomes, entraînant la mort par apoptose des cellules cibles (Boivin et *al.*, 2009). Source : https://tinyurl.com/rr5fatr8

3.1.4.2. Les voies de signalisation

La voie des MAP kinases :

Les MAP (Mitogen-Activated Protein) kinases sont une famille de kinases à sérine/thréonine qui sont impliqués dans divers processus biologiques dont la réponse au stress osmotique, aux chocs thermiques et la réponse à différentes cytokines inflammatoires dont l'IL-1, le TNF-α et IL-6 qui sont impliquées dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose (L. Chen et *al.*, 2018).

Trois grandes familles de MAPK ont été identifiées et leur nomenclature dépend de la dernière kinase de la cascade : les ERK1 et ERK2 (Extracellular signal-regulated kinases), les JNK1, JNK2 et JNK3 (C-Jun N-terminal Kinase) et la kinase MAP p38 (W. Zhang & Liu, 2002).

Ces différentes voies de signalisation sont composées d'au moins trois kinases : une MAPK, une MAPK kinase (MAPKK) et une MAPKK kinase (MAPKKK). La MAPKKK phosphoryle et active la MAPKK, qui phosphoryle et active la MAPK Figure 11 (W. Zhang & Liu, 2002).

Chacune de ces voies est impliquées dans différents processus cellulaires les ERK régulent la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire, tandis que les MAP kinases p38 et JNK sont plus impliquées dans la réponse inflammatoire et la mort cellulaire Figure 11 (W. Zhang & Liu, 2002).

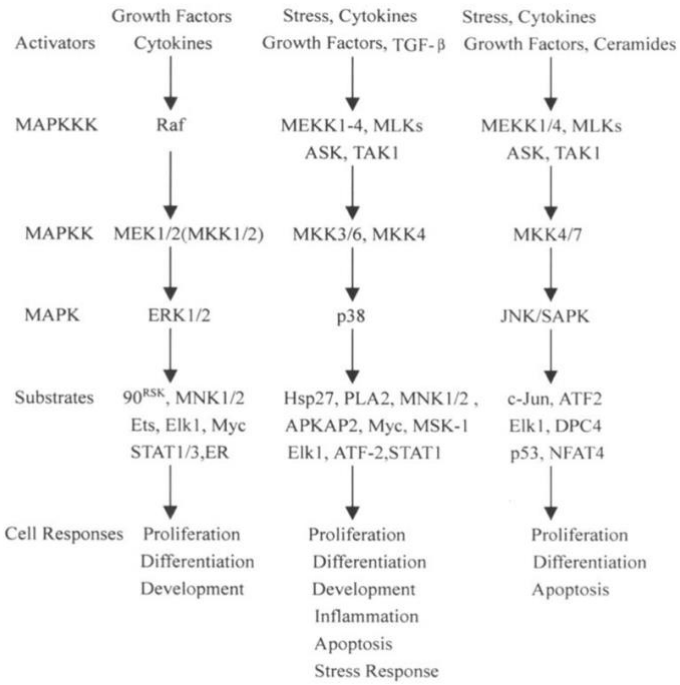


Figure 11 : Implication des différentes voies de signalisation des MAP kinases
(W. Zhang & Liu, 2002).

La voie JAK-STAT :

La voie de signalisation Janus kinase-transducteur et activateur de transcription (JAK-STAT) est au cœur de la régulation de nombreux mécanismes cellulaires impliqués notamment dans l'inflammation, la réponse immunitaire et l'apoptose. Une activation anormale de la voie JAK-STAT a été mise en avant dans différentes pathologies impliquant la réponse immunitaire, et notamment dans le développement des cancers. De nombreuses cytokines peuvent activer cette voie de signalisation : interférons, interleukines et certains facteurs de croissance (L. Chen et *al.*, 2018; X. Hu et *al.*, 2021).

Lorsque ces cytokines se lient à leurs récepteurs, les protéines JAK liées sur la partie intracellulaire des récepteurs sont phosphorylées et recrutent une ou plusieurs protéines STAT. Les STAT sont des facteurs de transcription latents présents dans le cytoplasme, qui ont besoin d'être phosphorylés pour être transportés dans le noyau et se lier à l'ADN (Figure 12) (L. Chen et *al.*, 2018; X. Hu et *al.*, 2021).

De nombreuses protéines inhibent cette voie de signalisation et notamment les protéines SOCS (Suppressor Of Cytokine Signaling) qui agissent par rétrocontrôle négatif. En effet, la transcription des protéines SOCS est induite par STAT lui-même. Une fois dans le cytoplasme, les protéines SOCS peuvent bloquer la liaison de STAT aux récepteurs des cytokines, inhiber la fonction kinase de JAK ou ubiquitiner JAK et STAT afin qu'ils soient dégradés (Figure 12) (Xue et *al.*, 2023).

D'autres inhibiteurs de la voie existent : la famille des PIAS (Protein Inhibitor of Activated STAT) qui empêche la dimérisation des STAT, ou leur liaison à l'ADN, et différentes phosphatases qui déphosphorylent JAK et STAT (Figure 12) (Xue et *al.*, 2023).

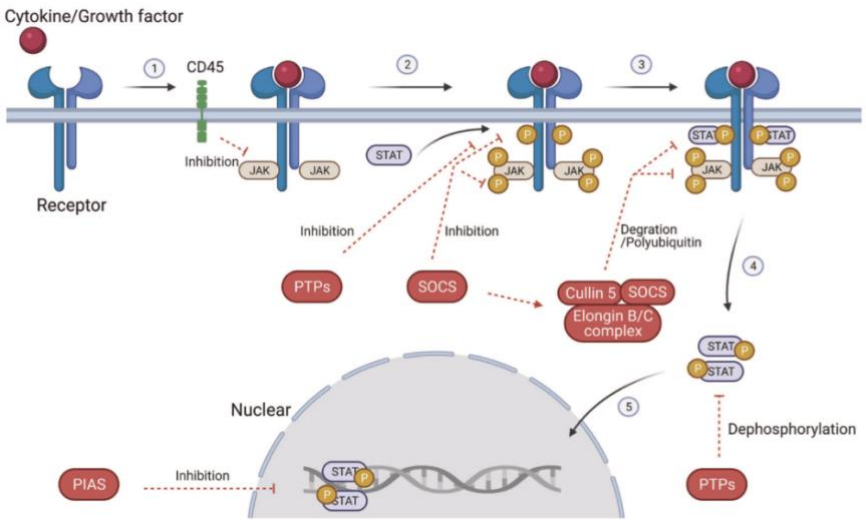


Figure 12 : Activation et régulation de la voie JAK-STAT
(Xue et *al.*, 2023).

La voie NF-κB :

Le facteur de transcription NF-κB est en réalité une famille de facteurs de transcription incluant RelA (p65), RelB, c-Rel, NF-κB1 (p105/p50 dont la forme active est p50) et NF-κB2 (p100/p52 dont la forme active est p52). Ces protéines forment des homo- ou des hétérodimères qui se lient à l'ADN pour réguler l'expression des gènes cibles. Pour empêcher leur translocation dans le noyau où ils agissent, des inhibiteurs de NF-κB (IκB) se lient en C-terminal aux dimères de NF-κB et masquent la séquence de localisation nucléaire. Lorsque les protéines IκB sont phosphorylées et ubiquitinées en N-terminal, les dimères de NF-κB sont libérés et peuvent migrer vers le noyau afin d'exercer leur fonction de facteur de transcription (Guo et *al.*, 2024).

Différents stimuli activent la voie NF-κB dont des cytokines pro-inflammatoires (IL-1α, IL-1β, TNF-α), le stress oxydatif, des PAMPs (Pathogen-Associated molecular Pattern) et des DAMPs (Danger-Associated molecular Pattern) (Guo et *al.*, 2024; Schroder et *al.*, 2004). Lorsque ces molécules se lient à leurs récepteurs, les récepteurs Toll-like (TLR), les récepteurs des cellules B (BCR), les récepteurs des cellules T (TCR), le récepteur à l'interleukine-1 (IL-1R) et le récepteur au TNF-α (TNFR), la voie d'activation canonique de NF-κB est activée, et de nombreuses protéines adaptatrices et kinases sont recrutées, dont le complexe I-kappaB kinase (IKK). Ce complexe est composé de IKKα, IKKβ et NEMO (IKKγ). Les deux sous-unités IKKα et IKKβ sont des kinases tandis que NEMO sert de régulateur du complexe (Figure 13) (Guo et *al.*, 2024).

Pour être actif, le complexe IKK doit être phosphorylé par la NF-κB inducing kinase (NIK). Il pourra alors phosphoryler IκB qui inhibera le dimère NF-κB. IκB phosphorylé subira dans un second temps une ubiquitination et sera dégradé par le protéasome afin que NF-κB soit libéré et transloqué vers le noyau où il se fixera à des séquences d'ADN spécifiques (Figure 13) (Guo et *al.*, 2024).

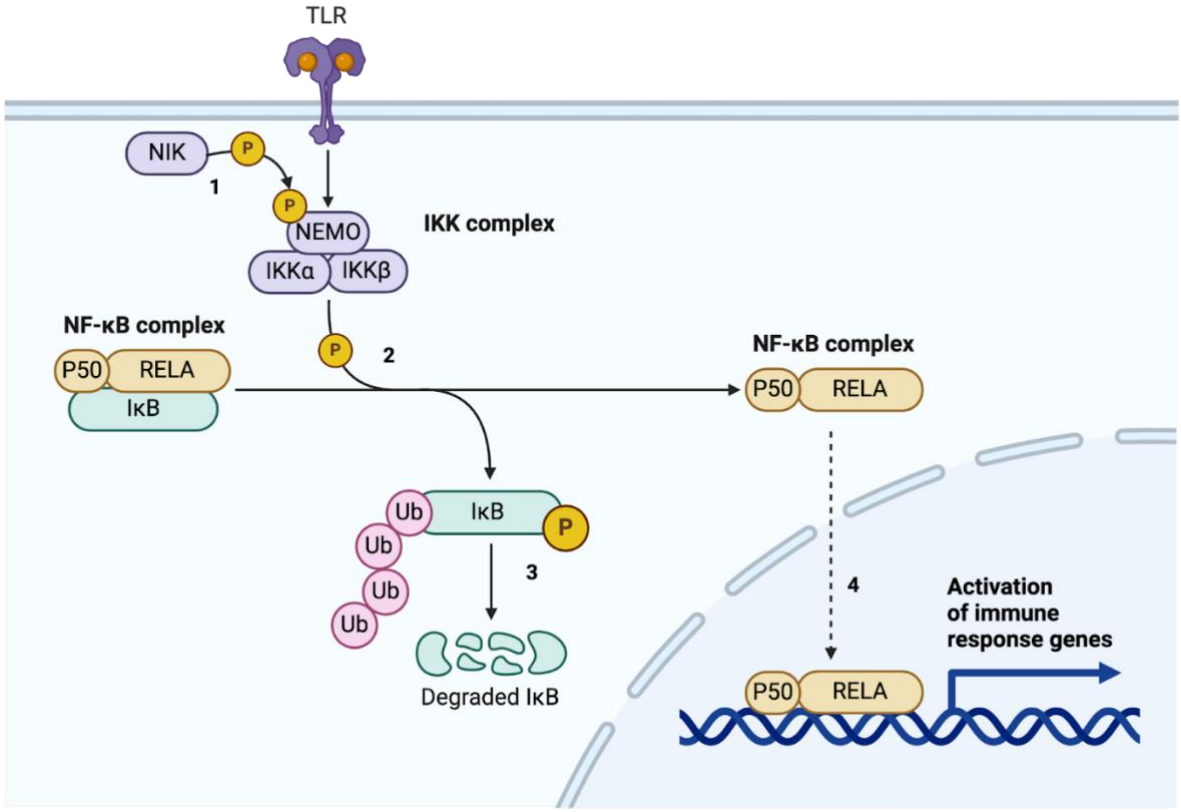


Figure 13 : Activation de la voie NF-κB par une stimulation du Toll-Like Receptor (TLR)
(1) Activation du complexe IKK : La stimulation des TLR conduit à l'activation de la kinase NIK (NF-κB-inducing kinase), qui phosphoryle NEMO (IKKγ) et active les kinases IKKα et IKKβ dans le complexe IKK. **(2)** Phosphorylation de IκB : Le complexe IKK phosphoryle la protéine inhibitrice IκB liée au complexe NF-κB (P50-RELA). **(3)** Dégradation de IκB : La phosphorylation d'IκB entraîne son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome, libérant ainsi le complexe NF-κB. **(4)** Translocation de NF-κB : Le complexe NF-κB (P50-RELA) migre dans le noyau où il se lie à l'ADN et active la transcription des gènes impliqués dans les réponses immunitaires et inflammatoires.

Les gènes régulés par NF-κB sont multiples et agissent dans différents processus biologiques comme la réponse immunitaire, en régulant l'expression de chemokines et de cytokines, telles que TNF-α, IL-1β et IL-6. NF-κB régule également des gènes anti-apoptotiques comme *Bcl-2*, et des gènes impliqués dans le cycle cellulaire induisant ainsi la prolifération (Guo et *al.*, 2024).

La voie NF-κB est souvent activée de manière constitutive dans les cellules cancéreuses, car les gènes activés favorisent la prolifération tumorale, la résistance à l'apoptose et régulent le microenvironnement tumoral (Guo et *al.*, 2024). Au niveau cardiovasculaire, la voie NF-κB joue un rôle central à différents stades du développement de l'athérosclérose. En réponse à différents stimuli qui contribuent au développement de l'athérosclérose, dits pro-athérogéniques, dont IL-1, présence de ROS (Reactive Oxygen Species), NF-κB est activé dans les cellules endothéliales vasculaires ce qui induit l'expression de différentes cytokines (IL-6, TNF-α) et de protéines d'adhésion. La dysfonction endothéliale induite par ces signaux permet le recrutement de cellules immunitaires ainsi que le changement du phénotype contractile

des cellules vasculaires musculaires lisses en un phénotype prolifératif. Cette accumulation de cellules, ainsi que la production d'une matrice riche en collagène vont conduire à la formation de la plaque d'athérome riche en cristaux de cholestérol aussi bien au niveau intra- qu'extracellulaire. Lors d'une rupture de plaque, le contenu est exposé au sang circulant et déclenche la cascade de coagulation. La formation d'un thrombus peut alors obstruer partiellement ou totalement les artères coronaires et conduire à un infarctus du myocarde. L'inflammation causée par l'infarctus du myocarde est en partie médiée par NF-κB, et plus particulièrement l'inflammasome NLRP3 (Guo et *al.*, 2024).

3.2. Inflammasome et cardiopathies

3.2.1. Structure et rôle des inflammasomes

Les inflammasomes sont des complexes multiprotéiques macromoléculaires dont la fonction est d'activer les caspases inflammatoires (caspases 1, 4, 5 et 11) lors d'une réponse immunitaire à une infection ou à des signaux de danger de types PAMPs (Pathogen-Associated molecular Pattern) ou DAMPs (Danger-Associated molecular Pattern), par exemple (Toldo & Abbate, 2024). Ces complexes intracellulaires ont tous une structure similaire : un récepteur avec un domaine Pattern-Recognition Receptor (PRR) qui joue le rôle de senseur, la protéine Apoptosis-associated Speck-like proteins (ASC) avec un domaine de recrutement des caspases qui joue le rôle d'adaptateur et la pro-caspase-1 qui joue le rôle d'effecteur.

Les inflammasomes sont nommés en fonction de leur récepteur intracellulaire spécifique. Parmi ces complexes, on retrouve Absent in melanoma 2 (AIM2), et ceux de la famille des NOD-like receptors (NLR), qui forment deux sous-groupes en fonction du domaine N-terminal du NLR : les NLRP qui contiennent un domaine pyrine (PYD), et les NLRC qui contiennent un domaine de recrutement des caspases (CARD). Il existe une forte corrélation entre l'activation des différents inflammasomes et la progression de nombreuses pathologies qui peuvent atteindre tous les systèmes de l'organisme : nerveux, respiratoire, urogénital, sanguin et lymphatique, digestif et cardiovasculaire (Figure 14) (Ramachandran et *al.*, 2024; J. Yao et *al.*, 2024).

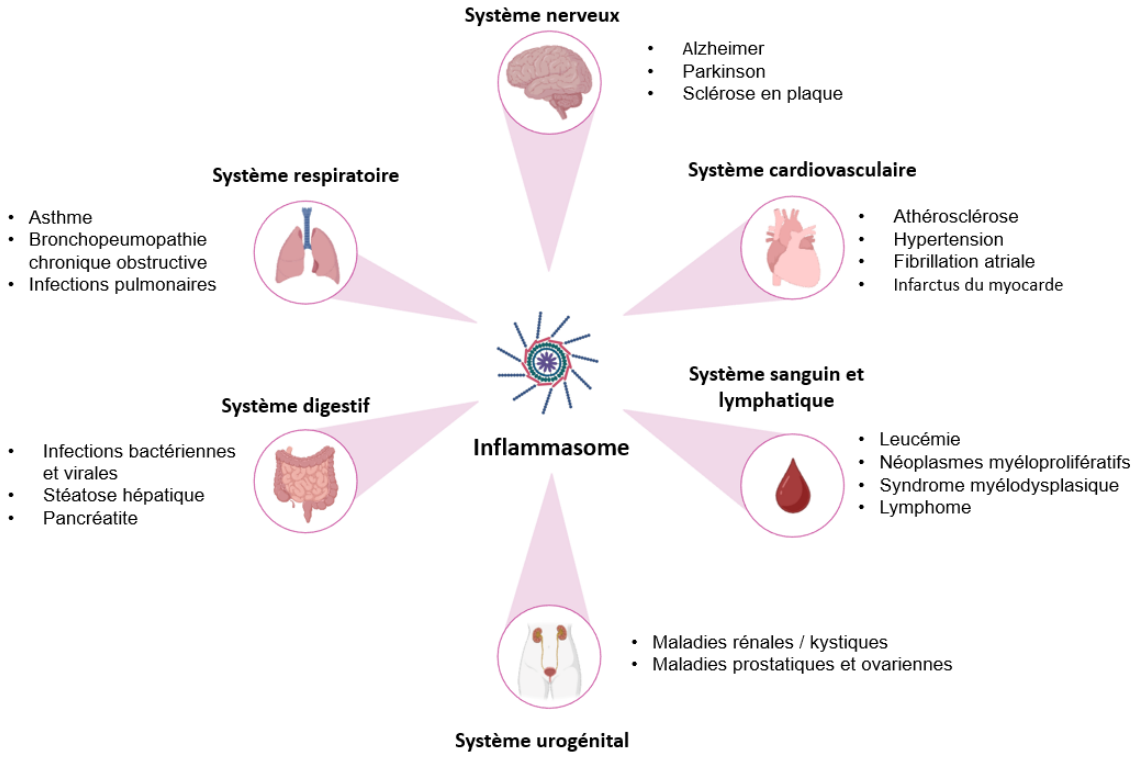


Figure 14 : Inflammasome et pathologies
L'activation des différents inflammasomes est associée à la progression de certaines maladies auto-immunes et dégénératives systémiques.

Des recherches ont mis en effet en évidence que la formation et l'activation des complexes inflammasomes varient selon la pathologie étudiée ou le type de bactérie impliqué dans l'infection (Bai et *al.*, 2020). Ainsi, NLRP1 est activé par l'anthrax, ou lors d'infections à *Toxoplasma gondii, Shigella flexneri,* et *Listeria monocytogenes* (Chavarría-Smith & Vance, 2015). NLRC4 est stimulé par des ligands spécifiques des bactéries porteuses d'un système de sécrétion de type III (TSS3), comme *Escherichia coli* (Duncan & Canna, 2018). L'inflammasome NLRP6 est principalement activé par des métabolites sécrétés par le microbiote intestinal (Levy et *al.*, 2017), tandis que AIM2 répond à l'accumulation de séquences d'ADN double brin dû à la multiplication de différents pathogènes, dont des virus, des bactéries et des parasites (Lugrin & Martinon, 2018). L'inflammasome NLRP3 est quant à lui déclenché par de nombreux stimuli comme des molécules endogènes, des cristaux, ou des pathogènes comme détaillés dans la prochaine sous-partie (Bai et *al.*, 2020).

3.2.2. L’inflammasome NLRP3

Si, dans les maladies cardiovasculaires, le rôle des différents inflammasomes est encore très mal compris, celui de l’inflammasome NLRP3 commence à être étudié (Toldo & Abbate, 2024). Son activation se fait en deux étapes principales : l’initiation de la transcription des composants du complexe et des effecteurs, et l’activation de NLRP3 qui entraîne la mise en place du complexe.

3.2.2.1. Structure du complexe NLRP3

Le récepteur intracellulaire NLRP3 est constitué de trois domaines distincts : le domaine C-terminal Leucine-Rich Repeat (LRR), le domaine central NACHT doté d’une activité ATPase et le domaine N-terminal PYD (Figure 15.A) (Toldo & Abbate, 2024; J. Yao et *al.*, 2024). Le domaine LRR agit comme un capteur, détectant des signaux de danger multiples tels que les cytokines pro-inflammatoires, les PAMPs et les DAMPs. Le domaine NACHT est impliqué dans l’activation du complexe. La liaison de l’ATP au domaine induit l’ouverture de la structure initiale en « cage » de NLRP3, une structure inactive qui garde les sous-unités de NLRP3 repliées et stables (Figure 15.B). Après l’ouverture de la structure, la kinase NEK7, une protéine stabilisatrice de type sérine/thréonine, est alors recrutée pour stabiliser la structure ouverte de NLRP3 laissant apparaître en deux sous-unités distinctes. Grâce à cette stabilisation et à la polymérisation de la protéine adaptatrice ASC qui se lie au domaine PYD, NLRP3 adopte une forme discoïdale (Xiao et *al.*, 2023). Cette structure discoïdale présente à sa périphérie des filaments qui sont les domaines LRR de NLRP3 (Figure 15.C). ASC est structurée en deux domaines : le domaine PYD, situé en C-terminal et essentiel pour son interaction avec NLRP3, et le domaine CARD en N-terminal, qui permet la liaison avec la pro-caspase-1, activant ainsi l’inflammasome. Comme dit précédemment, ASC joue un rôle clé en servant de pont entre le senseur NLRP3 et la caspase-1 effectrice (Figure 15.A) (Toldo & Abbate, 2024).

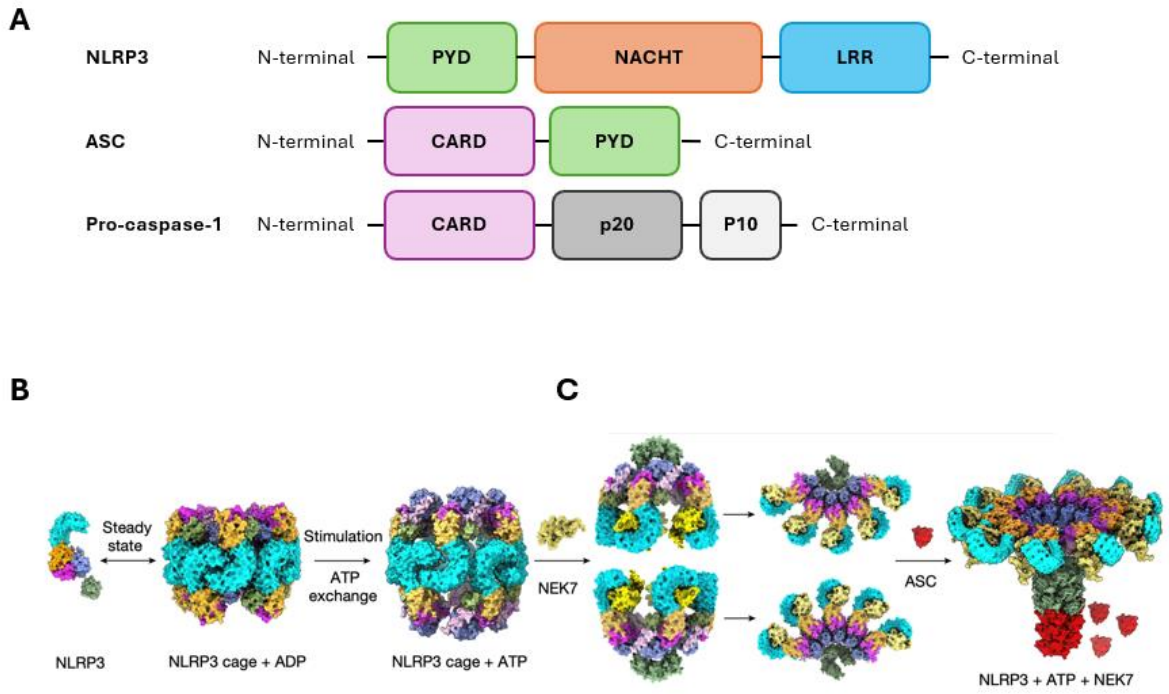


Figure 15 : Structure et mise en place de l'inflammasome NLRP3
(A) Domaines composant les protéines de l'inflammasome NLRP3. (B) Formation et ouverture de la cage de NLRP3 en présence d'ATP. (C) Stabilisation de la structure ouverte grâce à NEK7 et formation du disque de NLRP3 suite à la polymérisation avec ASC. Adapté de (Xiao et *al.*, 2023).

L'effecteur du complexe NLRP3, la pro-caspase-1, comprend lui aussi plusieurs domaines. En position N-terminale se trouve le pro-domaine de la caspase-1, un domaine CARD, qui permet l'interaction et la liaison avec la protéine adaptatrice ASC (Figure 15.A) (Toldo & Abbate, 2024). Le clivage de ce pro-domaine est indispensable pour que la caspase-1 adopte sa forme active. La caspase-1 est un hétérodimère composé d'un grand domaine catalytique (p20) situé juste après le pro-domaine, et d'un petit domaine catalytique (p10) en C-termin*al.* Une fois recrutée au sein du complexe inflammasome, la pro-caspase-1 subit un clivage auto-protéolytique produisant les deux sous-unités p20 et p10 qui s'assemblent et forment l'enzyme active. La caspase-1 mature peut dès lors exercer son activité de protéase à cystéine et cliver ses substrats spécifiques dont les pro-interleukines 1β et 18 (pro-IL-1β et pro-IL-18) ou la gasdermine-D (GSDMD) (Ramachandran et *al.*, 2024).

3.2.2.2. Initiation et activation de l'inflammasome NLRP3

L'activation de l'inflammasome NLRP3 commence par une étape d'amorçage (*priming* en anglais), déclenchée par divers signaux tels que les DAMPs, les PAMPs ou les cytokines. Ces molécules, en se liant à leurs récepteurs membranaires (dont les TLR), activent la voie NF-κB (décrite précédemment, *cf*. 3.1.d.ii). Cette activation entraîne la transcription des gènes codant pour les protéines constituant le complexe NLRP3, préparant ainsi la cellule à l'assemblage de l'inflammasome. Une fois tous les composants de l'inflammasome NLRP3 présents dans le cytoplasme, un signal déclencheur active le récepteur intracellulaire NLRP3 et provoque la mise en place du complexe (Figure 16) (Toldo & Abbate, 2024).

Les principaux signaux déclencheurs de l'activation de l'inflammasome NLRP3 sont (i) la modification de la composition ionique intracellulaire (efflux de potassium (K^+) et de chlore (Cl^-) et/ou influx de calcium (Ca^{2+}) et de sodium (Na^+)), ou (ii) l'augmentation du stress oxydatif ou (iii) la présence de cathepsine B dans le cytoplasme suite à une dysfonction lysosomale (Tang et *al.*, 2024). En plus de ces signaux, différentes protéines cytoplasmiques participent à la mise en place et à l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Figure 16). Nous allons détailler ces signaux :

(i) Modification de la composition ionique intracellulaire : Les flux K^+ et de Ca^{2+} peuvent être déclenchés par différents mécanismes. Par exemple, l'ATP extracellulaire provenant de cellules endommagées se lie au récepteur purinergique P2X7, ce qui engendre une sortie de K^+ et une entrée de Ca^{2+} (J. Yao et *al.*, 2024). Ainsi, dans un modèle murin d'infarctus du myocarde, l'inhibition de P2X7 par siARN (small interfering ARN) limite l'activation de la caspase-1 trois jours après la chirurgie mais aussi diminue l'hypertrophie et le dysfonctionnement cardiaques après sept jours (Mezzaroma et *al.*, 2011). La fuite de K^+, et donc la baisse de sa concentration intracellulaire facilite la liaison à NLRP3 de la protéine kinase NEK7, très exprimée dans le tissu cardiaque. Cela modifie la conformation de la « cage » de NLRP3 mentionnée plus haut (Mezzaroma et *al.*, 2021; Toldo & Abbate, 2024).

Les modifications de la concentration Cl^- sont également impliquées dans la mise en place et l'activation de l'inflammasome NLRP3. Ainsi, l'efflux de Cl^- favorise la polymérisation de l'adaptateur ASC sur le complexe NLRP3 (J. Yao et *al.*, 2024). La liaison d'ASC avec la kinase BTK (Burton Tyrosine Kinase) facilite la polymérisation d'ASC et l'activation du complexe de l'inflammasome NLRP3. L'inhibition de BTK, dans un modèle murin de sepsis, a montré une amélioration de la fonction cardiaque en bloquant l'activation du complexe de NLRP3 (O'Riordan et *al.*, 2019).

(ii) Augmentation du stress oxydatif : des dysfonctions mitochondriales sont également à l'origine d'efflux potassiques, en particulier lorsque les membranes de ces organelles sont déstabilisées. La diminution de K^+ intracellulaire s'accompagne alors d'une augmentation de ROS. En effet, quand une mitochondrie est endommagée, certaines protéines de sa membrane sont ubiquitinées afin que la mitochondrie soit détruite par autophagie, un processus protéolytique qui dégrade les protéines mal repliées et les organites endommagés afin de recycler leurs composants au sein de la cellule (Schroder & Tschopp, 2010; Toldo & Abbate, 2024). L'autophagie peut être activée lors d'une infection bactérienne et par différents stress cellulaires dont la signalisation pro-inflammatoire et plus particulièrement l'IFN-γ (Schroder & Tschopp, 2010). Un mécanisme spécifique permet la destruction de mitochondries dysfonctionnelles en limitant la libération de ROS dans le milieu extracellulaire : c'est la mitophagie qui empêche la mise en place de l'inflammasome. Dans la mitophagie, un autophagosome se développe autour des mitochondries dysfonctionnelles avant de fusionner avec un lysosome qui en dégrade le contenu *via* ses hydrolases dont des protéases, des lipases, des nucléases, des glycosidases, des phosphatases, et des sulfatases, qui bénéficient du pH acide lysosomal pour fonctionner.

L'inhibiteur de la thiorédoxine, TXNIP (Thioredoxin Interacting Protein), fait le lien entre le stress oxydatif et l'activation de l'inflammasome NLRP3 : en absence de ROS, TXNIP est lié à la thiorédoxine, une enzyme antioxydante majeure. Quand la concentration intracellulaire en ROS augmente, TXNIP se dissocie de la thiorédoxine et interagit avec le domaine LRR de NLRP3. Cette interaction déclenche un changement de conformation de NLRP3 qui participe à l'activation et à la mise en place du complexe de l'inflammasome. Dans un modèle murin d'ischémie-reperfusion, l'utilisation d'un petit ARN interférant ciblant TXNIP inhibe ainsi l'activation de NLRP3 (Y. Liu et *al.*, 2014).

Outre la mitophagie, des modifications post-traductionnelles de la protéine NLRP3, comme l'ubiquitination et la désubiquitination, régulent également la mise en place du complexe de l'inflammasome NLRP3. Des enzymes de la famille TRIM (Triplicate motif-containing proteins) qui sont des ligases responsables de l'ajout d'ubiquitine sur la protéine NLRP3 sont à l'origine de la dégradation de l'inflammasome NLRP3. Ainsi, la polyubiquitination de la lysine 48 de NLRP3 active l'autophagie et diminue la maturation d'IL-1β en réponse au lipopolysaccharide (LPS) (Tang et *al.*, 2024).

(ii) Activité cathepsine B : la membrane des lysosomes peut être déstabilisée par la présence de cristaux de cholestérol ou d'acide urique, ou par des pathogènes. Les nombreux cristaux de cholestérol présents dans les plaques d'athérome induisent en effet une dysfonction endothéliale par l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Toldo & Abbate, 2024) puisque la membrane perméabilisée des lysosomes induit la libération cytoplasmique de K^+ et de la cathepsine B (J. Yao et *al.*, 2024). La cathepsine B active ensuite d'autres protéases dont les caspases-3 et -7 impliquées dans l'apoptose, mais surtout l'inflammasome en se liant à NLRP3 (C. Liu et *al.*, 2022). L'implication de la cathepsine B a été démontrée dans la myocardite virale grâce à l'utilisation d'un modèle murin knock-out (KO) pour son gène lors d'une infection par coxsackievirus B3. Dans ce modèle, l'absence de cathepsine B améliore la survie, diminue l'infiltration du tissu cardiaque par les cellules immunitaires et baisse la concentration de troponine I dans le sang (Y. Wang et *al.*, 2018). La fonction cardiaque a aussi été évaluée dans ces souris KO atteintes de cardiomyopathie diabétique. L'absence de cathepsine B améliore la fonction cardiaque en diminuant la fibrose, l'inflammation et la pyroptose (mort cellulaire inflammatoire) (C. Liu et *al.*, 2022).

Outre ces différents mécanismes, il existe une voie non canonique d'activation de l'inflammasome NLRP3 qui met en jeu les caspases inflammatoires -4, -5 et -11. Cette voie est principalement activée par des stimuli comme des bactéries à Gram négatif. Le LPS de ces bactéries se lie à TLR4 et déclenche la voie de signalisation des MAPK qui active notamment la transcription de la caspase-11 (J. Yao et *al.*, 2024).

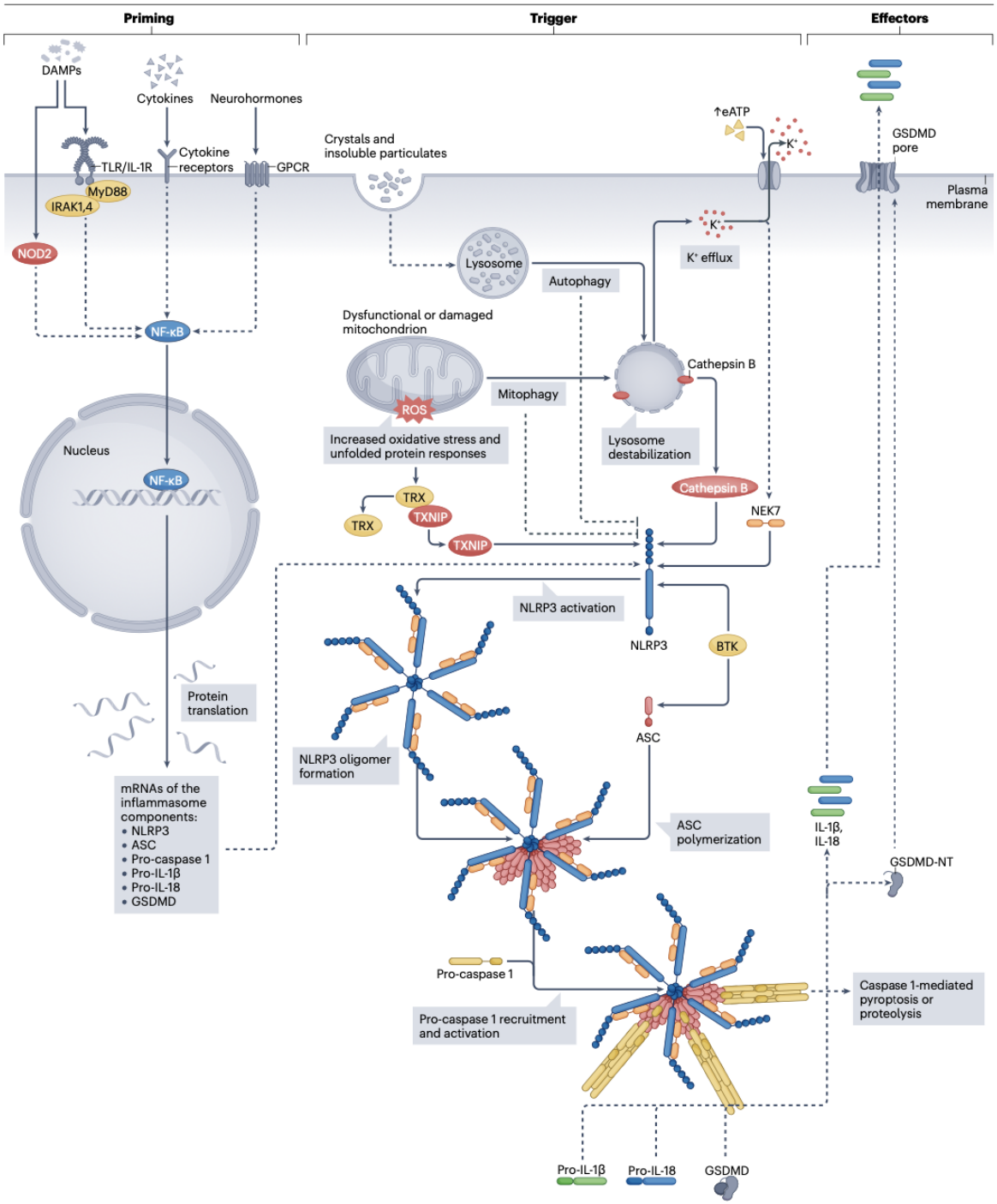


Figure 16: Activation de l'inflammasome NLRP3

Initiation : La transcription des composants de l'inflammasome NLRP3 est induite suite à l'activation de la voie NF-κB par différents stimuli (DAMPs, PAMPs, cytokines pro-inflammatoires …). **Activation :** La mise en place du complexe de l'inflammasome NLRP3 est déclenchée par différents stimuli (présence de K^+, Casthepsine B ou ROS). Pour s'assembler les différentes sous-unités de NLRP3 doivent changer de conformation notamment grâce à NEK7 avant de se lier à l'adaptateur ASC et que la caspase-1 s'active. **Effecteurs :** L'activation de la caspase-1 est à l'origine du clivage des formes zymogènes de IL-1B, IL-18 et de la gasdermine D. Des pores de GSDMD se forment à la membrane et les cytokines pro-inflammatoires sont sécrétées via ces pores. (Toldo & Abbate, 2024)

3.2.2.3. Activité fonctionnelle du complexe

La caspase-1 constitue l'effecteur principal du complexe inflammasome NLRP3. Elle agit en clivant les formes zymogènes des interleukines pro-inflammatoires, pro-IL-1β et pro-IL-18, ainsi que GSDMD (Figure 16). La caspase-1 libère le domaine N-terminal de la GSDMD, qui migre vers la membrane cellulaire pour y former des pores d'environ 20 nm. Cela conduit à la libération d'IL-1β et d'IL-18 dans le milieu extracellulaire, ces cytokines diffusant ensuite vers les cellules avoisinantes pour exercer leurs effets pro-inflammatoires (Toldo & Abbate, 2024). D'autres caspases comme la caspase-11, peuvent également cliver la GSDMD, favorisant ainsi la sécrétion de médiateurs inflammatoires (J. Yao et *al.*, 2024).

Par ailleurs, l'activation de l'inflammasome NLRP3 peut induire une forme de mort cellulaire inflammatoire appelée pyroptose, un type particulier de mort cellulaire programmée. La pyroptose présente des caractéristiques intermédiaires entre l'apoptose (dépendante de la caspase-1 mais indépendante des caspases pro-apoptotiques telles que caspase-3, -7 et -9) et la nécrose (due à la formation de pores de GSDMD dans la membrane cellulaire qui perd alors son intégrité) (Figure 16). La perte de la barrière membranaire entraîne une lyse osmotique, relâchant dans le milieu extracellulaire les molécules pro-inflammatoires et amplifiant la réponse inflammatoire (Schroder & Tschopp, 2010; Toldo & Abbate, 2024).

3.2.3. Rôle de l'inflammasome NLRP3 dans les maladies cardiovasculaires

Dans les maladies cardiovasculaires, l'implication de l'inflammasome NLRP3 se révèle être un facteur clé (Figure 17). Lors d'un infarctus du myocarde, des stimuli pro-inflammatoires, tels que la nécrose des cardiomyocytes, induisent une augmentation de l'expression des gènes associés à l'inflammasome NLRP3 dans les cardiomyocytes, les cellules endothéliales, les fibroblastes, ainsi que dans les cellules immunitaires du tissu cardiaque. L'inhibition de l'activation de l'inflammasome dès le début de la reperfusion permet de limiter la taille de la zone infarcie et de préserver la fonction cardiaque (G. Chen et *al.*, 2018; Toldo & Abbate, 2018). Dans l'athérosclérose, NLRP3 est principalement activé dans les cellules endothéliales vasculaires par la déstabilisation lysosomale due à l'endocytose de cristaux de cholestérol, présents dans la circulation sanguine ; cela entraîne la pyroptose des cellules et la formation de plaques d'athérome. Dans la péricardite, IL-1 active l'inflammasome NLRP3, et des traitements comme la colchicine (anti-inflammatoire qui bloque la polymérisation des microtubules et donc le trafic des composants du complexe de l'inflammasome, la production

de ROS diminuant en conséquence) et des inhibiteurs de NLRP3 réduisent l'épanchement péricardique.

L'inflammasome NLRP3 affecte aussi les cellules musculaires lisses *via* la dégradation des protéines contractiles par la caspase-1 comme chez des patients porteurs d'un anévrisme de l'aorte abdominale. Aussi, l'activation chronique de NLRP3 en réponse à des facteurs comme l'hyperlipidémie ou l'hyperglycémie favorise la pyroptose et le remodelage ventriculaire, ce qui peut engendrer des cardiomyopathies dilatées ou diabétiques (Zheng et *al.*, 2022). La concentration de BNP, un marqueur d'insuffisance cardiaque, est ainsi positivement corrélée aux niveaux d'activation de NLRP3 chez les patients ayant une cardiomyopathie dilatée (Mezzaroma et *al.*, 2021). Différents traitements sont envisagés tels que les statines, les médicaments hypoglycémiants, les anti-inflammatoires et les antioxydants afin de remédier au dysfonctionnement de la barrière endothéliale par l'inhibition de l'inflammasome NLRP3 (Y. Chen et *al.*, 2016).

L'inflammasome NLRP3 joue donc un rôle central dans les mécanismes pathologiques cardiovasculaires, notamment par son activation dans des types cellulaires clés tels que les cardiomyocytes et les cellules endothéliales. Cette activation est au cœur de nombreuses réponses inflammatoires, contribuant à la progression et à la chronicité des maladies cardiovasculaires. Étudier son rôle spécifique dans ces deux types cellulaires permettra de mieux comprendre les processus pathologiques sous-jacents et de poser les bases pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, ouvrant ainsi des perspectives prometteuses pour le traitement des pathologies cardiaques.

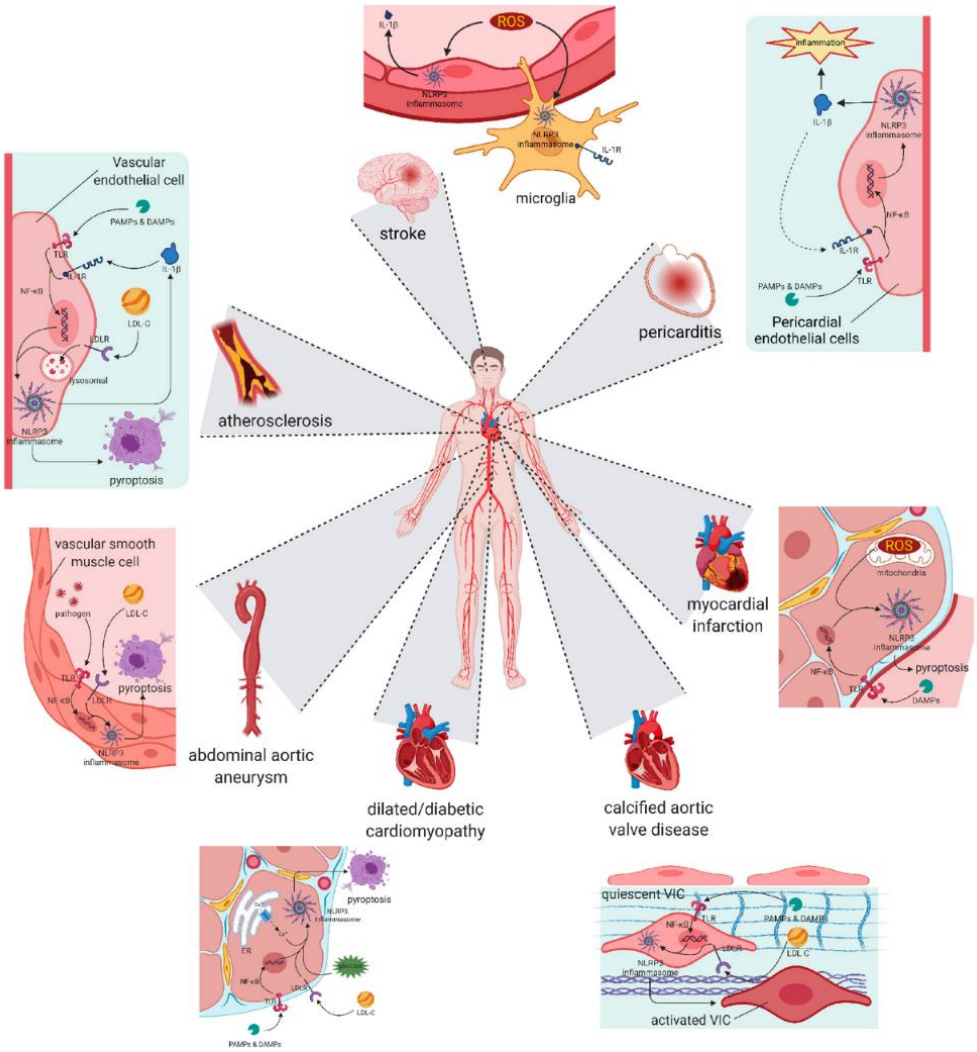


Figure 17 : Pyroptose et maladies cardiovasculaires

Athérosclérose : L'activation de NLRP3 dans les cellules endothéliales vasculaires provoque une pyroptose cellulaire et une accumulation lipidique subséquente, conduisant à la formation de plaques d'athérome. **Péricardite** : L'activation de NLRP3 dans les cellules endothéliales péricardiques peut être déclenchée par des substances pro-inflammatoires et aggrave le développement inflammatoire de la péricardite. **Infarctus du myocarde et accident vasculaire cérébral (AVC)** : L'activation de NLRP3 dans les cellules en reperfusion aggrave les lésions d'ischémie-reperfusion, exacerbant les symptômes d'infarctus du myocarde ou d'AVC. **Maladie valvulaire aortique calcifiée** : L'inflammation liée à NLRP3 dans la valve aortique peut activer les cellules interstitielles valvulaires quiescentes en cellules activées, initiant le processus de calcification de la valve. **Cardiomyopathie** : Une inflammation chronique médiée par NLRP3, déclenchée par l'hyperglycémie ou l'hyperlipidémie, favorise la pyroptose des cardiomyocytes et le remodelage ventriculaire, aboutissant à une cardiomyopathie dilatée ou diabétique. **Anévrisme de l'aorte abdominale** : L'activation de NLRP3 dans les cellules musculaires lisses de l'aorte entraîne une perte cellulaire, provoquant un anévrisme de l'aorte abdominale. (Zheng et *al.*, 2022)

Dans les cardiomyocytes qui n'expriment pas naturellement les composants de l'inflammasome (sauf ASC chez la souris) et qui ne sécrètent pas de grandes quantités d'IL-1β, une activation de la caspase-1 se déclenche dès les premières heures suivant une ischémie dans des modèles murins d'infarctus; la caspase reste ensuite élevée plusieurs jours, ce qui conduit finalement à la pyroptose des cardiomyocytes (G. Chen et *al.*, 2018; Mezzaroma et *al.*, 2011).

L'angiotensine-II (Ang-II) est également un puissant déclencheur de l'inflammasome NLRP3. Les travaux de Willeford *et al.* (2018) sur un modèle murin ont révélé que l'Ang-II, *via* la Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase II delta (CaMKIIδ), active NF-κB et induit la production de ROS mitochondriaux, ce qui conduit à la mise en place de l'inflammasome NLRP3 dans les cardiomyocytes. Dans ce modèle, des cardiomyocytes isolés de souris sauvages perfusées pendant 1 jour avec de l'Ang-II exprimaient trois fois plus de NLRP3 et avaient une activité de caspase-1 significativement augmentée par rapport aux cardiomyocytes de souris KO pour CaMKIIδ ou de souris sauvages traitées avec un inhibiteur de NF-κB. Ces expériences ont également montré dans les cardiomyocytes de souris sauvages par rapport aux souris KO une augmentation des transcrits de plusieurs gènes pro-inflammatoires : *ccl2* (ou MCP1) : chimiokine essentielle pour recruter les cellules immunitaires lors de l'inflammation), *cd3* (complexe protéique exprimé à la surface des LT associé au TCR), *cxcl2* (chimiokine qui attire principalement les neutrophiles vers les sites d'inflammation), et *il-1β*. Dans les cardiomyocytes, la surexpression de MCP1 induite par l'Ang-II entraîne un recrutement massif de macrophages dans le tissu cardiaque, recrutement qui va de pair avec une augmentation des cellules $CD68^+$ (marqueur de macrophages) dans les cœurs des souris sauvages (Figure 18) (Willeford et *al.*, 2018).

Ces travaux illustrent l'importance de CaMKIIδ dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les cardiomyocytes. Ce mécanisme permet le recrutement de macrophages via la sécrétion de MCP1 et il contribue au développement de la fibrose cardiaque (Willeford et *al.*, 2018) et probablement à la progression de la fibrillation atriale (C. Yao et *al.*, 2018). Chez les patients atteints de fibrillation atriale, qu'elle soit paroxystique ou persistante de longue durée, une augmentation des niveaux protéiques d'ASC et de la sous-unité p20 de la caspase-1 a en effet été observée dans les cardiomyocytes isolés après chirurgie cardiaque, suggérant une activation de NLRP3. Plus spécifiquement, dans les formes persistantes de fibrillation atriale, une augmentation des niveaux protéiques des composants de l'inflammasome (NLRP3 et pro-caspase-1) a également été notée et indiquant que cette transcription *de novo* pourrait favoriser la progression de la fibrillation atriale (C. Yao et *al.*, 2018).

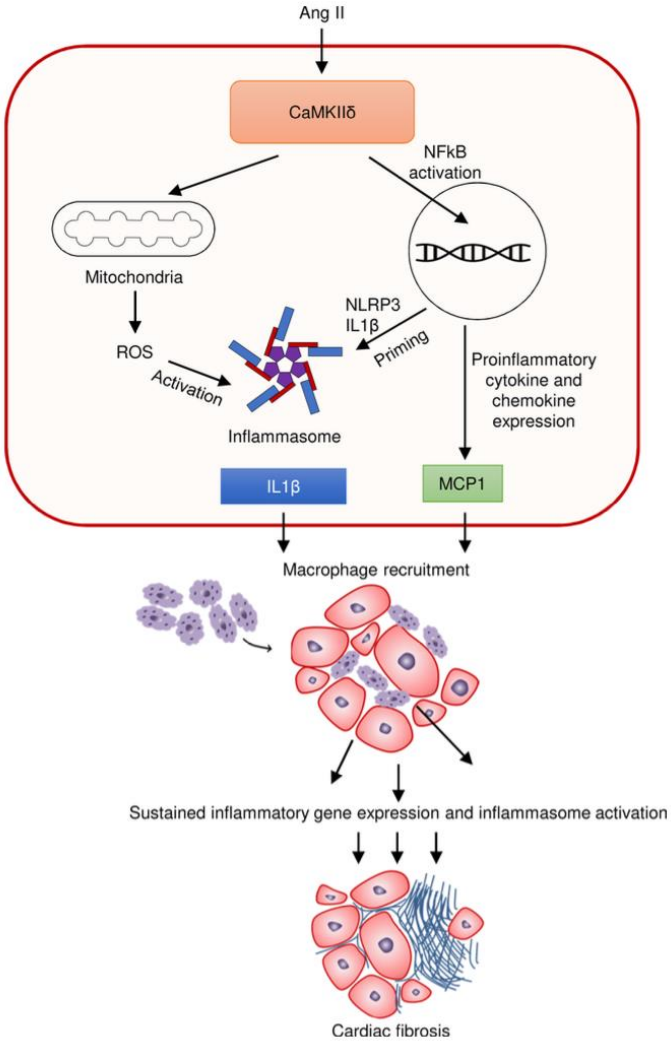


Figure 18 : Inflammasome NLRP3 et fibrose cardiaque.
L'angiotensine II (Ang II) active la kinase CaMKIIδ, entraînant la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les mitochondries et l'activation de NF-κB. Ces mécanismes initient le "priming" et l'activation de l'inflammasome NLRP3, induisant la production d'IL-1β et de MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1). Ces cytokines favorisent le recrutement des macrophages, la persistance de l'inflammation et l'expression prolongée de gènes inflammatoires, conduisant à l'activation chronique de l'inflammasome et, finalement, à la fibrose cardiaque. Ce processus met en évidence les interactions complexes entre les signaux inflammatoires et les mécanismes cellulaires contribuant aux remodelages pathologiques du tissu cardiaque. (Willeford et *al.*, 2018)

Dans les cellules endothéliales, l'inflammasome NLRP3 participe activement au statut de la barrière endothéliale vasculaire, un élément souvent compromis dans les maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose.

Dans un modèle murin de diabète de type I, induit par injection de streptozotocine (qui endommage les cellules-β pancréatiques), des souris *Nlrp3*$^{+/+}$ et *Nlrp3*$^{-/-}$ ont été utilisées pour évaluer l'impact de l'activation de NLRP3 sur l'endothélium. Chez les souris *Nlrp3*$^{+/+}$ en état d'hyperglycémie, on observe une formation accrue de l'inflammasome NLRP3 dans

l'endothélium artériel et une augmentation de l'activité de la caspase-1. Par contre, chez les souris *Nlrp3*$^{-/-}$, on n'observe pas de modification de l'activité de la caspase-1 et l'expression des protéines de jonction serrée (ZO-1 et ZO-2) est préservée par rapport aux souris *Nlrp3*$^{+/+}$. Ces résultats suggèrent que la perméabilité accrue de l'endothélium est modulée par l'activation de NLRP3 (Y. Chen et *al.*, 2016).

Par ailleurs, lors d'inflammations endothéliales avec une production accrue de ROS, les cellules sécrètent, ou libèrent lors de leur lyse, des médiateurs pro-inflammatoires comme IL-1β, IL-18 et HMGB1 (High Mobility Gene Box 1) *via* les pores de gasdermine D, favorisant l'activation de la voie NF-κB dans les cellules voisines. Cela entraîne la production de nouvelles chimiokines et de molécules d'adhésion, qui facilitent l'extravasation des leucocytes et amplifient ainsi l'inflammation (Figure 19.A et C) (Bai et *al.*, 2020). HMGB1, en particulier, est également connu pour accroître la perméabilité endothéliale. Dans un contexte d'hyperglycémie, l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les cellules endothéliales vasculaires murines (MVEC), entraîne la sécrétion de HMGB1 qui augmente la perméabilité des monocouches endothéliales par un effet autocrine ou paracrine. La même étude a montré que l'utilisation de glycyrrhizine, un inhibiteur de HMGB1, permet de maintenir les jonctions serrées et de réduire la perméabilité des monocouches de MVEC (Y. Chen et *al.*, 2016). La dysfonction endothéliale est par ailleurs étroitement liée à une altération de la fonction mitochondriale. Dans des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC), l'exposition à l'acroléine (un inhibiteur de l'autophagie induite par les ROS) entraîne une activation de l'inflammasome NLRP3 et une pyroptose accrue (Jiang et *al.*, 2018).

La pyroptose est également amplifiée dans des modèles de souris transgéniques portant un nombre élevé de copies du gène HNP (Human Neutrophil Peptide, peptide modulant la réponse immunitaire). Des expériences de septicémie induite par ligature et ponction caecale (CLP) montrent que ces souris ont une mortalité accrue en raison d'une dysfonction endothéliale sévère liée à l'activation de l'inflammasome NLRP3. Les peptides HNP, sécrétés par les cellules immunitaires, favorisent la pyroptose des cellules endothéliales en se liant au récepteur P2X7, entraînant ainsi l'activation de l'inflammasome. En conditions septiques, P2X7 est surexprimé dans les cellules endothéliales, affaiblissant la barrière endothéliale et entraînant des dysfonctionnements vasculaires. Cette étude montre aussi que l'inhibition de la liaison HNP-P2X7 à l'aide d'un anticorps spécifique diminue l'activation de la caspase-1 et la pyroptose. L'administration de cet anticorps spécifique in vivo chez des souris présentant un nombre élevé de copies du gène HNP a permis de réduire significativement la mortalité à 7 jours dans un modèle de septicémie induite par CLP. (Q. Chen et *al.*, 2019)

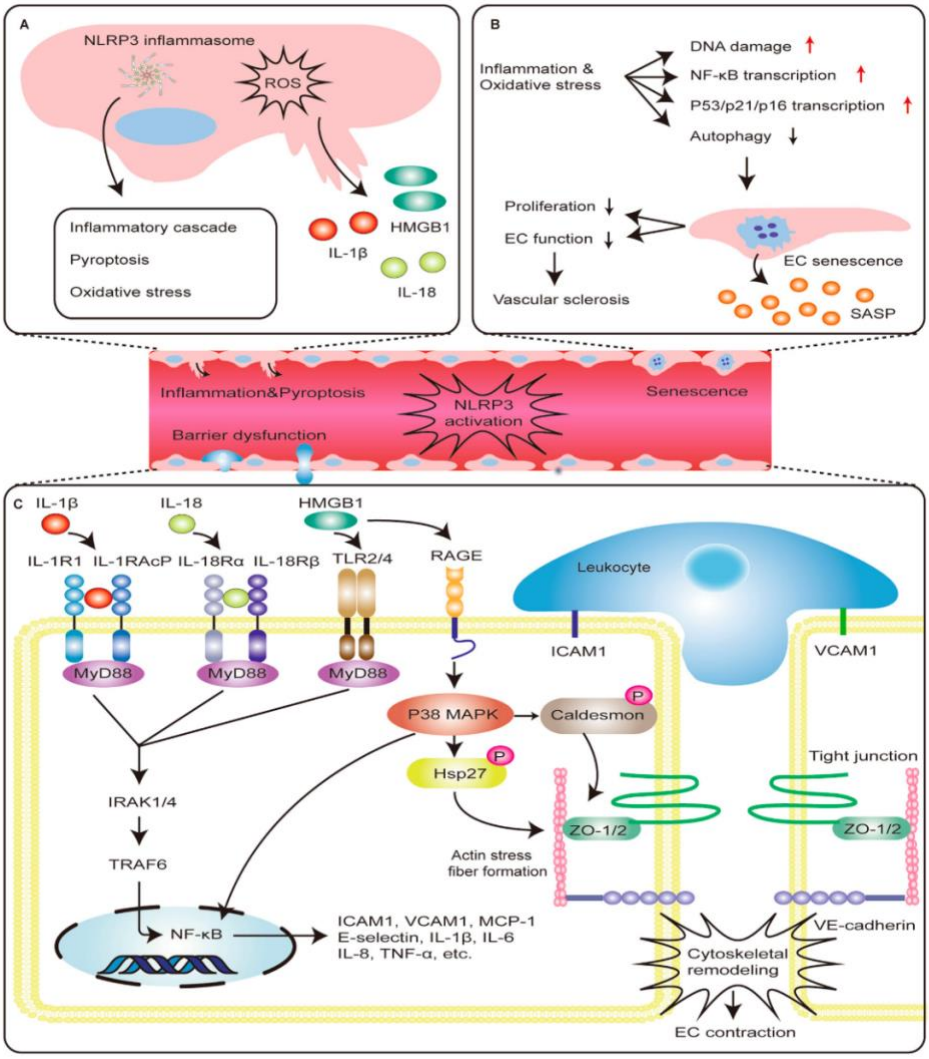


Figure 19 : Rôle de l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans la dysfonction endothéliale.
(a) La sécrétion des formes matures de IL-1β, IL-18 et HMGB1 résulte de l'activation de l'inflammasome NLRP3. Ces médiateurs possèdent des propriétés pro-inflammatoires, ce qui permet à l'inflammasome NLRP3 d'induire une réponse inflammatoire puissante, un stress oxydatif et une mort cellulaire pro-inflammatoire appelée pyroptose. **(b)** L'inflammation et le stress oxydatif peuvent provoquer des dommages à l'ADN des cellules endothéliales, activer la voie de signalisation NF-κB, augmenter la transcription des gènes P53/P21/P16 et inhiber l'autophagie, contribuant ainsi au processus de sénescence des cellules endothéliales. Les cellules sénescentes sécrètent un phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP), incluant des médiateurs pro-inflammatoires, qui favorisent la dysfonction endothéliale et, à terme, conduisent à la sclérose vasculaire. **(c)** La liaison de l'IL-1β à son récepteur de surface cellulaire IL-1R1 et de l'IL-18 à son récepteur de surface IL-18R activent la signalisation intracellulaire (MyD88, IRAK1/4 (kinase associée au récepteur IL-1) et TRAF (facteur associé au récepteur du TNF), ce qui entraîne l'activation de NF-κB. HMGB1 peut également activer la voie de signalisation NF-κB, en aval de l'activation des récepteurs TLR2/4. L'activation de cette voie augmente la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires, tels que les cytokines et les chimiokines, qui favorisent l'adhésion des leucocytes et leur extravasation. En outre, la liaison de HMGB1 au récepteur RAGE active la kinase MAP p38 en aval, entraînant la phosphorylation des protéines de liaison à l'actine, Hsp27 et caldesmon. Cela conduit à la formation de fibres de stress d'actine, au remodelage du cytosquelette et à la contraction des cellules endothéliales. Ces réactions augmentent la perméabilité endothéliale en modifiant la contractilité cellulaire et en perturbant les connexions intercellulaires. (Bai et *al.*, 2020)

3.3. Inflammasome NLRP3 et Interféron-γ

L'interféron-gamma (IFN-γ) est un régulateur clé de l'inflammation et de l'inflammasome NLRP3. En effet, l'IFN-γ active la voie non canonique de l'inflammasome, notamment en stimulant la caspase-11. De plus, il régule l'expression de divers composants du complexe inflammatoire tels que NLRP3, ASC et la pro-caspase-1, ce qui permet une activation plus rapide en réponse à des signaux de danger comme les DAMPs, les PAMPs et d'autres molécules pro-inflammatoires. L'IFN-γ stimule également la production de protéines essentielles à l'assemblage de l'inflammasome, notamment les guanylate-binding proteins (GBP) (B.-H. Kim et *al.*, 2016; Xie et *al.*, 2019). Ces protéines de la famille des GTPases sont codées par sept gènes chez l'homme (GBP1 à GBP7) ; elles agissent en tant que régulateurs directs de l'inflammasome NLRP3 et peuvent se lier au complexe NLRP3 ou AIM2 pour faciliter leur activation (Shenoy et *al.*, 2012).

Des études utilisant des macrophages stimulés par l'IFN-γ et des combinaisons de LPS/ATP ont exploré le rôle de chaque GBP dans l'activation de l'inflammasome NLRP3. Grâce à des siRNA ciblant chaque GBP individuellement, il a été démontré que GBP5 est indispensable à la sécrétion d'IL-1β, confirmant son rôle central dans l'activation de l'inflammasome (Shenoy et *al.*, 2012). Un modèle murin KO pour le gène *gbp5* (*gbp5*$^{-/-}$) a ensuite été utilisé pour confirmer ces résultats. Dans les macrophages issus de la moelle épinière de ces souris, la stimulation par du LPS et de l'ATP, conduit à une perte de l'activité de la caspase-1 et à une absence de sécrétion d'IL-1β et d'IL-18. De plus, dans ces cellules n'exprimant pas *gbp5*, en présence de l'IFN-γ, l'activité de l'inflammasome NLRP3 est encore plus réduite, mettant en évidence le rôle potentiel de l'IFN-γ dans la régulation positive de cette voie par la régulation des GBP (Shenoy et *al.*, 2012). Des analyses de co-immunoprécipitation réalisées sur des lysats protéiques de ces macrophages ont confirmé une liaison directe entre GBP5 et NLRP3. Une fois liée à NLRP3, GBP5 s'organise en tétramère, facilitant l'oligomérisation des protéines adaptatrices ASC qui est une étape essentielle pour la formation de l'inflammasome (Kelley et *al.*, 2019; B.-H. Kim et *al.*, 2016).

Pour étudier le rôle d'autres protéines de la famille GBP dans la régulation de l'inflammasome NLRP3, des modèles murins KO pour *gbp2*$^{-/-}$ et *gbp3*$^{-/-}$ ont aussi été développés. Des expériences de co-immunoprécipitation ont révélé que GBP2 se lie directement à ASC pour former des structures tétramériques. L'interaction entre GBP2 et GBP5 facilite la liaison entre ASC et NLRP3. Par ailleurs, GBP3 semble intervenir dans la régulation de la pyroptose en interagissant avec la gasdermine D lors de l'activation non canonique de l'inflammasome NLRP3 (B.-H. Kim et *al.*, 2016).

Des recherches récentes ont montré que l'IFN-γ peut activer l'inflammasome NLRP3 via des endosomes spécifiques en réponse à des infections. Le système du complément, qui conduit à la lyse bactérienne en réponse à une infection, joue un rôle clé dans la régulation de

l'inflammation et de l'inflammasome NLRP3. Il est également impliqué dans le rejet de greffes, où la reconnaissance d'anticorps anti-donneur active le complexe d'attaque membranaire (MAC) au niveau des cellules endothéliales du greffon. Contrairement aux bactéries pathogènes, les cellules du greffon ne sont pas lysées, mais leur immunogénicité augmente de manière significative, ce qui favorise le rejet de greffe. Pour analyser cette réponse dans le cadre du rejet de greffe et l'implication de l'inflammasome NLRP3, des HUVEC ont été stimulées par l'IFN-γ, pour induire l'expression des composants de l'inflammasome (NLRP3, ASC et caspase-1), puis par des anticorps anti-donneur. Il a été observé que les complexes MAC sont internalisés via des endosomes RAB5$^+$, une protéine essentielle à la formation des endosomes. Ce processus stabilise la kinase NIK, déclencheur de l'activation de NF-κB, régulateur de la voie NF-κB et donc de la transcription des composants de l'inflammasome NLRP3. Finalement, le complexe MAC entraîne la translocation de NLRP3 vers les endosomes contenant MAC, Rab5 et NIK, induisant l'activation de la caspase-1 et la sécrétion d'IL-1β, ce qui traduit l'activation effective de l'inflammasome NLRP3 (Xie et *al.*, 2019).

4. La myocardite immuno-médiée par les inhibiteurs de points de contrôle immunitaire

4.1. Les cancers et les maladies cardiovasculaires

4.1.1. Les cancers : réalité moléculaire, cellulaire et tissulaire

De manière générale, le développement des cancers repose sur l'acquisition et l'accumulation d'altérations génétiques et épigénétiques qui perturbent la régulation de différents processus cellulaires. Les cancers peuvent être causés par des mutations héréditaires, des expositions répétées à des agents cancérigènes (tabac, radiations, produits chimiques), des infections virales et des erreurs spontanées dans la réplication de l'ADN.

Au niveau moléculaire, ces modifications génétiques peuvent être dues à la substitution ponctuelle d'une base azotée par une autre, à la modification du nombre de copies de la séquence d'un gène suite à l'insertion ou la suppression de segments d'ADN, ainsi que des réarrangements génomiques au cours desquels des gènes se retrouvent sous le contrôle d'autres promoteurs. De plus, des séquences d'ADN étrangères peuvent être intégrées au

génome de cellules somatiques suite à des infections virales (Stratton et *al.*, 2009). Enfin, des modifications épigénétiques comprenant des méthylations ou des acétylations peuvent induire, ou au contraire inhiber, l'expression de certains gènes essentiels à la vie cellulaire. Les gènes porteurs de ces mutations, et responsables de la dérégulation des processus cellulaires impliqués dans le développement du cancer, sont appelés oncogènes.

Au niveau cellulaire, les oncogènes interviennent le plus couramment dans : (i) l'activation de la division cellulaire et/ou l'inhibition de l'apoptose et de la sénescence, ce qui permet aux cellules porteuses d'anomalies de survivre et de proliférer, (ii) l'activation de l'angiogenèse, nécessaire à la vascularisation de la tumeur et à l'apport des nutriments nécessaires à sa croissance, (iii) la modification de l'adhésion cellulaire, ce qui favorise l'invasion tumorale et sa dissémination (iv) la modification du métabolisme, ce qui permet de soutenir la croissance rapide par une augmentation de la consommation de glucose.

Au niveau tissulaire, les cellules cancéreuses s'organisent le plus souvent en masses ou en nodules appelés tumeurs et visibles par imagerie. La formation de nouveaux vaisseaux sanguins est indispensable pour oxygéner et apporter les nutriments jusqu'au centre de la tumeur. Ces masses peuvent avoir des bords bien définis, mais il se peut que certaines cellules cancéreuses se détachent de la tumeur primaire et envahissent les tissus environnants ou pénètrent dans les vaisseaux sanguins et lymphatiques et se disséminent. On parle alors de tumeurs secondaires ou métastases. Les cancers hématologiques, tels que les leucémies et les lymphomes, affectent généralement les cellules du sang et du système lymphatique et se caractérisent par une dissémination systémique plutôt que par la formation de masses localisées. Le développement d'une tumeur dans un tissu sain est souvent à l'origine d'une perte d'organisation de ce tissu, voire même d'une perte de fonction.

4.1.2. Facteurs de risques communs aux cancers et aux maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires et les cancers sont les principales causes de mortalité dans le monde, avec respectivement près de 18 millions et 10 millions de décès en 2020 selon l'Organisation Mondiale de la Santé.

Leur étude a permis de mettre en avant des facteurs de risques communs à leur développement comme l'hypertension, l'obésité ou encore le diabète. D'autres facteurs comme le tabagisme ou la consommation excessive d'alcool sont aussi décrits comme facteurs de risque dose-dépendant. A l'inverse, un régime de type méditerranéen et une activité physique régulière sont associés à une réduction des risques de cancer et de maladies cardiovasculaires. Certains types de cancer sont en outre fortement associés au développement de maladies cardiovasculaires, tandis que la présence d'une maladie

cardiovasculaire chez un patient augmente le risque de déclarer un cancer (Wilcox et *al.*, 2024). De plus, chez les patients traités pour un cancer, les maladies cardiovasculaires sont la cause la plus fréquente de décès non liés au cancer en raison de la cardiotoxicité induite par les différents traitements anticancéreux (De Boer et *al.*, 2020).

Différents mécanismes moléculaires ont été identifiés et sont impliqués dans le développement de ces deux groupes de maladies. L'inflammation chronique et la présence de cytokines pro-inflammatoires dont les interleukines IL-1β, IL-6 et IL-18 dans la circulation sanguine sont associées aussi bien à l'insuffisance cardiaque qu'à différents types de carcinomes (De Boer et *al.*, 2020). L'acquisition et l'accumulation de mutations somatiques dans les cellules prolifératives, quel que soit le tissu, est une conséquence du vieillissement. Avec l'âge, différentes populations de cellules hématopoïétiques apparaissent, et les clones de cellules souches pour lesquels ces mutations confèrent un avantage prolifératif seront sélectionnés au fur et à mesure et sur-représentés dans la population (Fuster et *al.*, 2017; Sano et *al.*, 2018). Cette prolifération excessive des cellules hématopoïétiques mutées augmente le risque de développer un cancer hématologique, mais elle est aussi associée à une augmentation de l'incidence de l'athérosclérose, des maladies coronariennes, et des accidents vasculaires cérébraux (Sano et *al.*, 2018).

La majorité de ces mutations somatiques acquises dans les cellules hématopoïétiques et associées à un risque élevé de maladie coronarienne sont présentes sur 5 gènes : *TET2* (Ten-eleven translocation-2 : dioxygènase responsable de régulations épigénétiques suite à la déméthylation de l'ADN), *DNMT3a* (DNA methyltransferase 3 alpha : enzyme responsable de la méthylation de l'ADN *de novo*, laissant apparaître de nouveaux profils épigénétiques), *ASXL1* (Additional sex combs like 1 : régule les modifications post-traductionnelles des histones en se liant avec des complexes de remodelage de la chromatine), *JAK2* (Janus Kinase 2 : kinase cytoplasmique impliquée dans des cascades de signalisation régulant par exemple la différenciation, la prolifération et la survie cellulaire), et *TP53* (tumor protein 53 : régule l'expression de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN) (De Boer et *al.*, 2020). Dans des modèles murins d'insuffisance cardiaque, il a été mis en avant que l'absence de *TET2* ou *DNMT3a* dans les cellules hématopoïétiques aggrave la dysfonction cardiaque, mais cette dernière peut être améliorée par une inhibition pharmacologique de l'inflammasome NLRP3 (Sano et *al.*, 2018). Dans un modèle murin d'athérosclérose, la reconstruction partielle de la moelle osseuse avec des cellules déficientes en TET2 (10% des cellules $TET2^{-/-}$ et 90% des cellules $TET2^{+/+}$) augmentait la sécrétion d'IL-1β à la suite de l'activation de l'inflammasome NLRP3. En effet, ils ont montré que l'inhibiteur de l'inflammasome utilisé dans les modèles murins d'insuffisance cardiaque a aussi une activité athéroprotectrice (Fuster et *al.*, 2017).

De plus, les cellules cardiaques, comme les cellules tumorales, peuvent adapter leur métabolisme afin de répondre à différents stress, par exemple l'inflammation chronique. Au niveau du tissu cardiaque, une augmentation de la production de ROS par les mitochondries des cardiomyocytes perturbe l'homéostasie redox (Wilcox et *al.*, 2024). Dans les cellules

cancéreuses, des mutations génétiques présentes sur des gènes codant pour des enzymes du cycle de Krebs sont responsables de la génération d'onco-métabolites par les mitochondries. Grâce à la production de ces métabolites, les cellules cancéreuses modifient leur métabolisme et leur environnement, notamment l'homéostasie redox, afin de favoriser leur prolifération (Y. Liu & Yang, 2021). Les onco-métabolites circulants ont un impact, comme pour les cellules cancéreuses, au niveau du métabolisme du tissu cardiaque, mais peuvent aussi altérer l'expression génique, la fonction protéique et induire des modifications épigénétiques responsables d'un remaniement tissulaire et du développement de cardiomyopathies dilatées (De Boer et *al.*, 2020). Les voies métaboliques impliquées dans la production d'onco-métabolites ou dans la régulation redox sont donc des cibles thérapeutiques anti-cancéreuses plus ciblées (Y. Liu & Yang, 2021).

Les peptides natriurétiques, hormones sécrétées par le cœur et les vaisseaux qui permettent de diagnostiquer l'insuffisance cardiaque, sont également liées à la progression tumorale (De Boer et *al.*, 2020). D'autres paramètres comme la sénescence cellulaire ou encore le microbiote intestinal sont des facteurs de risques communs aux deux pathologies (Wilcox et *al.*, 2024).

La figure 20 illustre les facteurs de risques communs aux maladies cardiovasculaires et aux cancers.

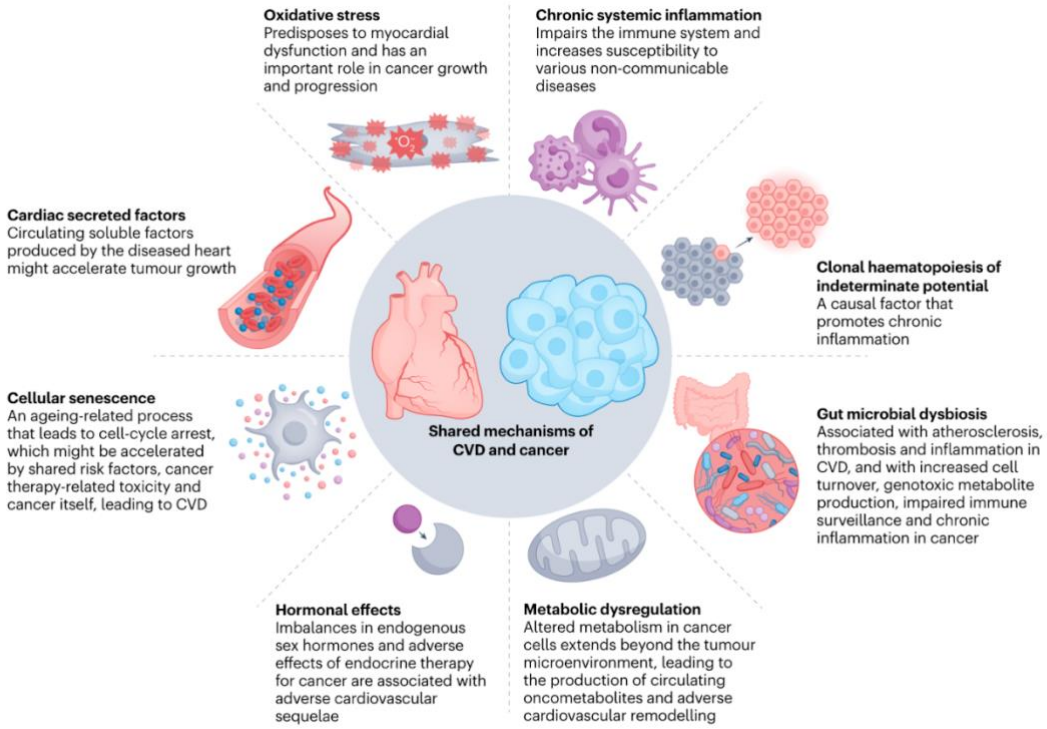


Figure 20 : Mécanismes communs entre les maladies cardiovasculaires et le cancer
Les maladies cardiovasculaires et le cancer partagent des mécanismes sous-jacents liés à des dérèglements des processus immunitaires, génétiques, métaboliques, hormonaux et microbiens. Ces dysfonctionnements impactent directement le vieillissement cellulaire, la prolifération, le métabolisme et les lésions cellulaires. Ces mécanismes communs représentent des cibles thérapeutiques prometteuses, qu'il s'agisse de traitements déjà établis ou de thérapies expérimentales, visant à prévenir ou à atténuer à la fois les maladies cardiovasculaires et le cancer. (Wilcox et *al.*, 2024)

4.1.3. Système immunitaire et échappement tumoral

Comme décrit précédemment, les cellules présentatrices d'antigènes reconnaissent des antigènes étrangers, et les présentent aux lymphocytes afin de les activer (Figure 21.1-3). Au cours de la formation de la tumeur, les cellules cancéreuses produisent des antigènes appelés néo-antigènes. Ces néo-antigènes peuvent, par exemple, provenir de nouvelles protéines exprimées par la cellule cancéreuse suite à une infection virale, ou de l'expression des oncogènes mutés. Les lymphocytes peuvent alors reconnaître et détruire les cellules cancéreuses qui expriment ces néo-antigènes (Figure 21.6-7).

Cependant, dès le début de la cancérogenèse, le microenvironnement tumoral se forme et complique l'élimination des cellules cancéreuses par le système immunitaire. En effet, les cellules cancéreuses adoptent des stratégies d'échappement immunitaire, qui peuvent (i) empêcher l'infiltration de la tumeur par le système immunitaire ou (ii) inactiver le système immunitaire (D. S. Chen & Mellman, 2013; S. K. Kim & Cho, 2022).

Afin d'empêcher la reconnaissance des cellules tumorales par les cellules T, les clones de cellules cancéreuses qui n'expriment pas de néo-antigènes, ou sous-expriment MHC-I, sont sélectionnés et se multiplient plus. Dans le microenvironnement tumoral, la sécrétion de molécules anti-inflammatoires comme l'interleukine-10 (IL-10) et le facteur de croissance transformant β (TGF-β) inhibent la maturation des cellules dendritiques et donc la production de signaux pro-inflammatoires comme la sécrétion d'interleukine-12 (IL-12) et d'IFN-γ (Figure 21.2) (D. S. Chen & Mellman, 2013; S. K. Kim & Cho, 2022). Les cellules cancéreuses peuvent aussi sous-exprimer certaines cytokines indispensables à la migration et à l'infiltration des cellules T, dont CXCL9, afin d'échapper au système immunitaire (S. K. Kim & Cho, 2022).

Si les cellules immunitaires réussissent à infiltrer la tumeur (Figure 21.5), les cellules cancéreuses adaptent leur stratégie d'échappement. De la même manière que pour la maturation des cellules dendritiques, le TGF-β peut inhiber l'activité cytotoxique des LT et favoriser le développement des cellules Treg. Certaines tumeurs comme les mélanomes, les cancers du poumons non à petites cellules et les cancers des ovaires détournent le mécanisme de régulation du système immunitaire basé sur les points de contrôle immunitaire en exprimant abondamment PD-L1 à leur surface (Figure 21.7) (Buchbinder & Desai, 2016; Garcia-Diaz et *al.*, 2017; Theivanthiran et *al.*, 2020). Les LT activés présents dans le microenvironnement tumoral sécrètent de l'IFN-γ. La liaison de l'IFN-γ à son récepteur présent sur les cellules tumorales active la voie JAK-STAT et induit l'expression de PD-L1 et PD-L2 à leur surface (Garcia-Diaz et *al.*, 2017).

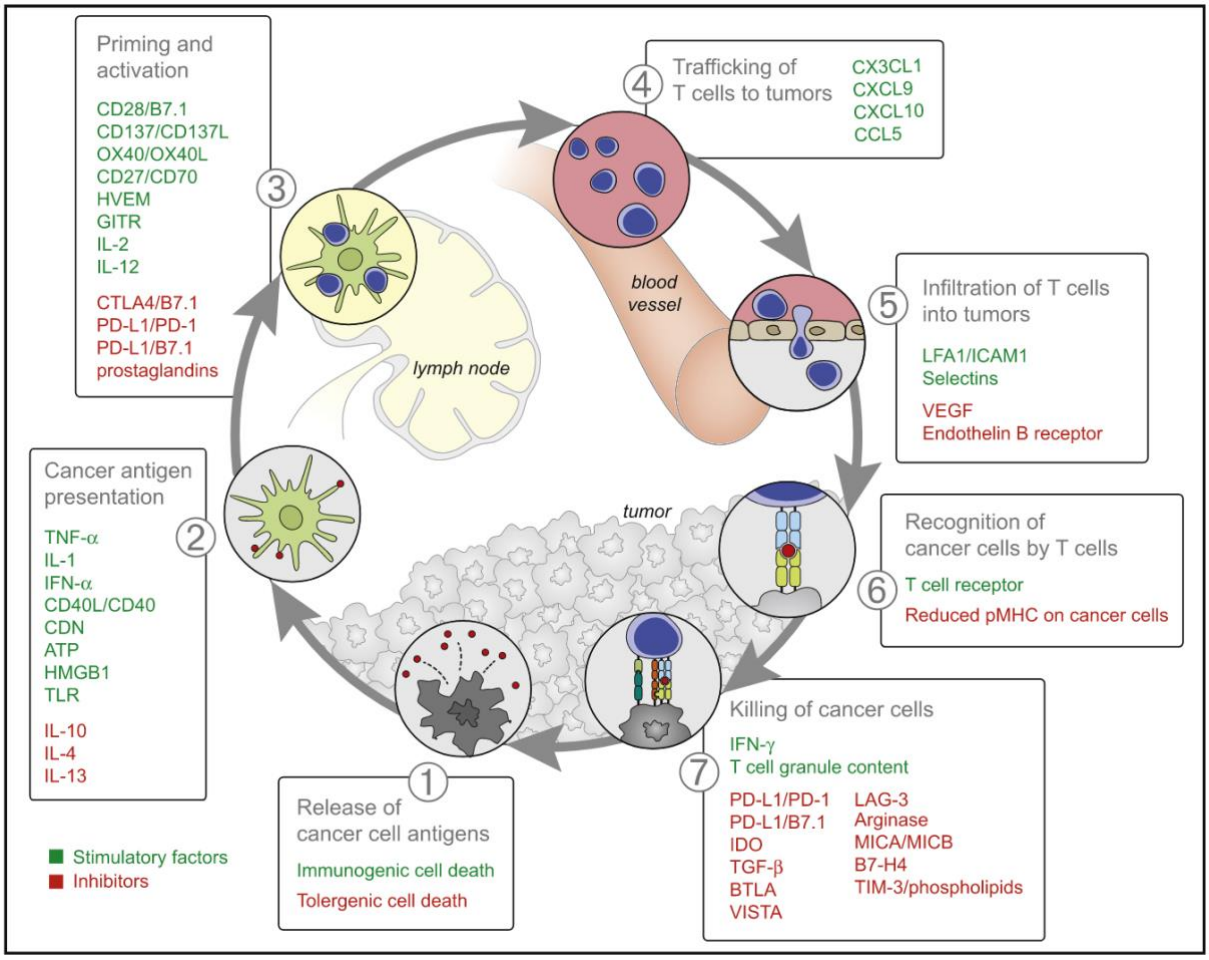


Figure 21 : Représentation du cycle immunitaire dans la réponse anti-cancéreuse
Chaque étape du cycle immunitaire contre le cancer nécessite la coordination de nombreux facteurs, de nature à la fois stimulante et inhibitrice. Les facteurs stimulants, indiqués en vert, favorisent l'immunité, tandis que les facteurs inhibiteurs, indiqués en rouge, aident à réguler le processus, à réduire l'activité immunitaire et/ou prévenir l'auto-immunité. Les points de contrôle immunitaire, tels que CTLA-4, peuvent inhiber le développement d'une réponse immunitaire active, principalement au niveau de la maturation et de la prolifération des cellules T (étape 3), ou PD-L1, permettant d'inhiber la reconnaissance des cellules tumorales au sein de la tumeur (étape 7). (D. S. Chen & Mellman, 2013)

4.2. Les traitements anticancéreux

Il existe différents types de traitements anticancéreux, dont la radiothérapie et les chimiothérapies qui sont les plus connues du grand public. Souvent associés à la chirurgie, ces traitements visent à détruire les cellules cancéreuses par l'utilisation de radiations ionisantes ou d'agents chimiques comme les inhibiteurs de topoisomérases qui empêchent la réplication de l'ADN, ou les agents alkylants qui provoquent des cassures dans l'ADN bicaténaire.

Contrairement à la chimiothérapie traditionnelle, qui attaque les cellules en division rapide de manière non spécifique, de nouvelles thérapies anti-cancéreuses révolutionnaires ont été développées ces dernières années. Les immunothérapies anticancéreuses regroupent différentes stratégies qui permettent de réactiver le système immunitaire du patient, en induisant ou en augmentant la réponse immunitaire anticancéreuse. Ces thérapies sont adaptées en fonction de l'origine du cancer (gènes spécifiques impliqués comme HER2 dans le cancer du sein ou infection par des virus oncogènes) afin d'avoir un effet antitumoral plus ciblé et d'augmenter la survie des patients comparé aux thérapies anticancéreuses conventionnelles.

4.2.1. Les virus oncolytiques

Dès les années 1990, des essais cliniques ont été menés avec des virus génétiquement modifiés comme traitement anticancéreux, mais ce n'est qu'en 2015 que le premier virus oncolytique a été validé par la Food and Drug Administration (FDA). Des essais cliniques sont toujours en cours chez des patients atteints principalement de mélanomes, de cancers avancés du pancréas ou des ovaires (Lawler et *al.*, 2017).

Les virus oncolytiques sont capables d'infecter spécifiquement les cellules cancéreuses, grâce à la reconnaissance de récepteurs spécifiques du virus souvent surexprimés à la surface des cellules cancéreuses, et de conduire à leur lyse. De plus, les cellules tumorales ont une activité métabolique et réplicative élevée, ce qui permet une division cellulaire rapide et une réplication virale importante. La réplication virale, ainsi que la libération de particules virales et d'antigènes tumoraux suite à la lyse des cellules cancéreuses dans le microenvironnement tumoral sont à l'origine du recrutement et de l'activation des cellules de l'immunité innée et de l'immunité adaptative (Lawler et *al.*, 2017). L'environnement pro-inflammatoire favorise donc l'immunité anti-tumorale (Farkona et *al.*, 2016; Lawler et *al.*, 2017; Y. Zhang & Zhang, 2020).

4.2.2. Les vaccins anti-tumoraux

Les vaccins anti-tumoraux sont utilisés soit pour le traitement d'un cancer, soit en prévention. Le but est d'activer l'immunité anti-tumorale dirigée contre les néo-antigènes exprimés par les cellules cancéreuses. On distingue deux types de vaccins anti-tumoraux, les vaccins prophylactiques développés à partir de particules virales non infectieuses de virus responsables du développement de certains cancers comme le papillomavirus, et les vaccins thérapeutiques élaborés à partir d'antigènes tumoraux (SV Vasudhar Bhat et *al.*, 2021; Y.

Zhang & Zhang, 2020). Ces antigènes tumoraux peuvent être des antigènes associés aux tumeurs, c'est-à-dire qu'ils sont exprimés dans toutes les cellules de l'hôte mais plus fortement dans les cellules cancéreuses, ou des antigènes spécifiques des tumeurs, c'est-à-dire qu'ils ne sont pas couramment présents dans les cellules de l'hôte et résultent souvent de mutations à l'origine de la tumeur, ou encore des antigènes viraux, lorsque le cancer est d'origine virale (SV Vasudhar Bhat et *al.*, 2021).

La FDA approuve des vaccins prophylactiques dirigés contre deux virus oncogènes : le papillomavirus humain responsable notamment du cancer du col de l'utérus, et l'hépatite B qui est un facteur de risque majeur dans le développement du cancer du foie. Le seul vaccin thérapeutique approuvé par la FDA à ce jour est le Sipuleucel-T utilisé dans le cadre du traitement du cancer de la prostate. Pour cela, des cellules dendritiques du patient sont prélevées et exposées à un antigène anti-tumoral spécifique de ce type de cancer, le PAP (phosphatase acide prostatique), puis réinjectées au patient (SV Vasudhar Bhat et *al.*, 2021).

4.2.3. La thérapie cellulaire par transfert adoptif

La thérapie cellulaire par transfert adoptif consiste à utiliser les lymphocytes T du patient dans un contexte thérapeutique. Ce type de thérapie est fondé sur la modification génétique des cellules T par transfection d'un vecteur codant pour un récepteur antigénique chimérique (CAR-T cells) capable de reconnaître des antigènes de surface spécifiques aux cellules tumorales. Concrètement, les cellules T sont isolées à partir du sang des patients, transfectées, et celles qui expriment le récepteur, les CAR-T cells, sont sélectionnées et réinjectées au patient. La reconnaissance de l'antigène se fait donc indépendamment de sa présentation par le MHC au TCR (L. Zhang et *al.*, 2020). Les CAR-T cells sont utilisées depuis les années 2010 et sont d'une grande efficacité pour traiter différents cancers, et principalement les cancers hématologiques (Rosenberg & Restifo, 2015). D'autres thérapies permettent de modifier le TCR (T-TCR cells) présent sur les cellules T afin qu'il reconnaisse de manière spécifique l'antigène présenté par le MHC des cellules tumorales (Y. Zhang & Zhang, 2020).

4.2.4. Les thérapies ciblées

Les thérapies ciblées anticancéreuses visent spécifiquement des molécules ou des voies de signalisation impliquées dans la croissance et la progression tumorale. Parmi ces thérapies, on trouve des inhibiteurs de tyrosines kinases, indispensables à la transmission des signaux intracellulaires, des inhibiteurs de la voie PI3K-AKT, très souvent suractivée dans les cancers et responsable de la prolifération anarchique des cellules cancéreuses.

Parmi les inhibiteurs de tyrosine kinase on retrouve, un anticorps monoclonal spécifique du récepteur HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2), le Trastuzumab, qui est utilisé depuis 1998 dans le traitement du cancer du sein $HER2^+$. D'autres anticorps monoclonaux sont utilisés en immunothérapie, notamment dirigés contre les points de contrôle immunitaire.

Mais le succès des immunothérapies anticancéreuses est principalement dû aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaire (ICI). En effet, près de 50% des patients atteints de cancers sont éligibles à ce traitement (Munir et *al.*, 2024).

Comme mentionné dans la section 4.1.3, l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales en présence d'IFN-γ (Figure 22.A) permet d'inhiber les LT par la liaison à son récepteur PD-1. Ce mécanisme participe ainsi à l'échappement tumoral et à la progression du cancer (Figure 22.B). Le principe des immunothérapies de type ICI est d'inhiber à l'aide d'anticorps monoclonaux les récepteurs co-inhibiteurs des LT (CTLA-4, PD-1), ou de leurs ligands (PD-L1) pouvant être exprimés par les cellules cancéreuses afin de conserver les LT activés (Figure 22.C). L'Ipilimumab, anticorps dirigé contre CTLA-4, a été le premier approuvé en 2011 dans le cadre du traitement des mélanomes métastatiques (Munir et *al.*, 2024). Dans les années qui ont suivi, les anticorps dirigés contre PD-1 et PD-L1 ont été approuvés par la FDA afin de traiter différents cancers, en plus du mélanome, dont le cancer du poumon non à petit cellules, le cancer de la vessie et le carcinome rénal. En 2022, c'est un anticorps anti-LAG-3, en combinaison avec un anti-PD-1, qui a été autorisé par la FDA pour traiter les mélanomes avancés (Munir et *al.*, 2024).

Les thérapies, telles que les vaccins ou les T-CAR cells, pourraient être plus efficaces en association avec des inhibiteurs de PD-1 ou PD-L1 qui suppriment l'inhibition immunitaire dans le microenvironnement tumoral. Les inhibiteurs de PD-1/PD-L1 sont souvent efficaces chez les patients dont les tumeurs expriment PD-L1, mais peuvent échouer si les étapes initiales du cycle d'immunité contre le cancer sont défaillantes. La combinaison d'inhibiteurs PD-1/PD-L1 avec d'autres thérapies, comme les anti-CTLA-4 ou les agents facilitant l'infiltration des lymphocytes T, pourrait améliorer les réponses, bien que ces approches augmentent le risque de toxicité (D. S. Chen & Mellman, 2013).

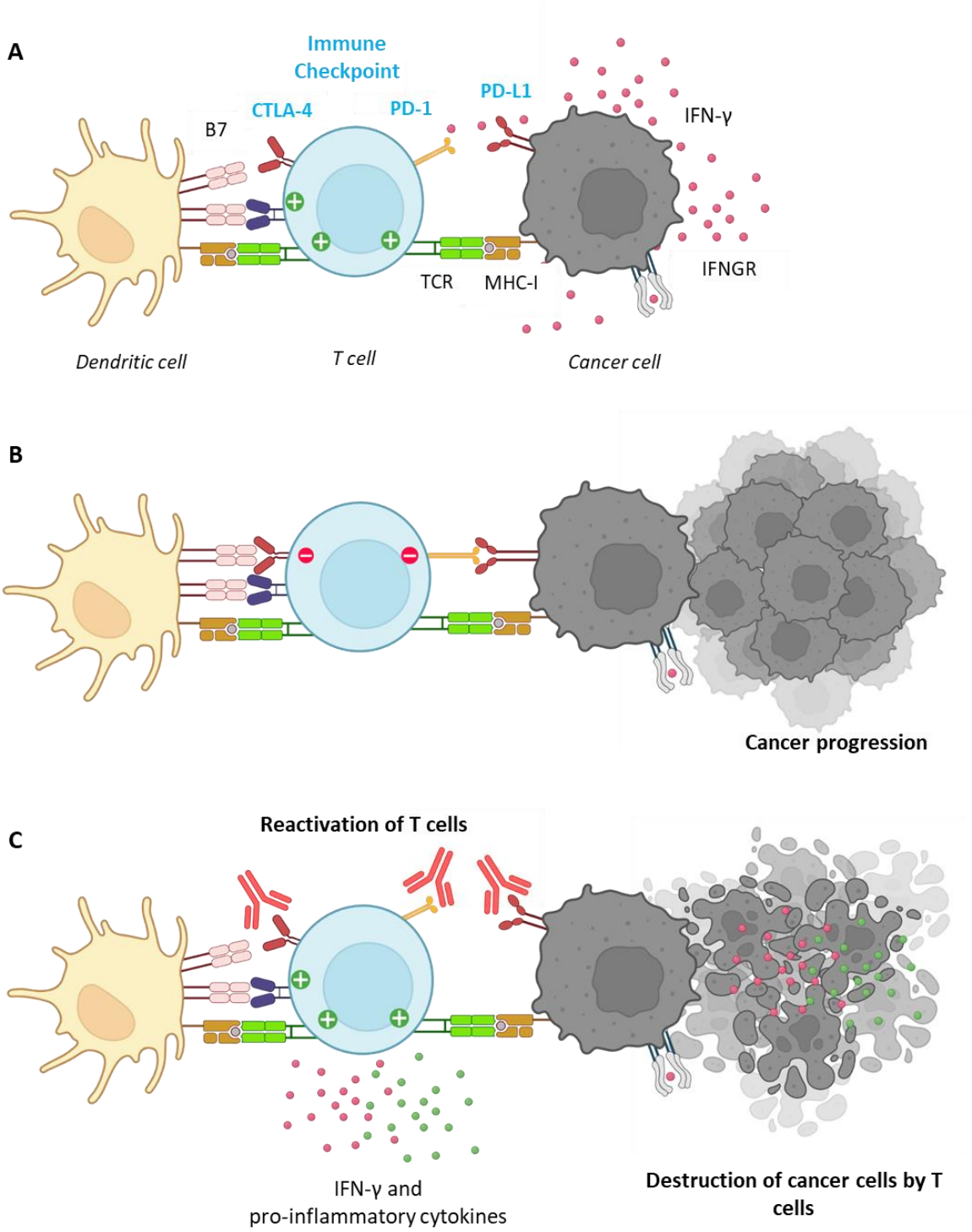


Figure 22 : Mécanismes de l'immuno-surveillance et de l'immunothérapie dans le contexte du cancer **(A)** Les cellules dendritiques ou les cellules tumorales activent les LT *via* la présentation de l'antigène et les molécules de co-stimulation (B7, TCR, MHC-I). L'activation des LT entraîne la sécrétion d'IFN-*γ*, qui se fixe sur son récepteur (IFNGR) au niveau des cellules tumorales et induit l'expression de PD-L1. Les points de contrôle immunitaire CTLA-4, PD-1 et PD-L1 sont en bleu. **(B)** La liaison PD-1/PD-L1 inactive les LT et favorise l'échappement tumoral et la progression du cancer. **(C)** Les inhibiteurs de points de contrôle immunitaire (anti-PD-1, anti-PD-L1 ou anti-CTLA-4) restaurent l'activité des LT, favorisent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, et induisent la destruction des cellules tumorales. Adapté de (J.-R. Hu et *al.*, 2019)

4.3. La toxicité des traitements anticancéreux

Les traitements anticancéreux, bien qu'efficaces dans la prise en charge des tumeurs, sont associés à des toxicités variées impliquant différents organes et systèmes. Parmi ces effets secondaires, la cardiotoxicité se distingue par sa fréquence et son impact potentiel sur la morbi-mortalité des patients. Ce travail se concentrera spécifiquement sur les mécanismes et les implications de la toxicité induite par ces traitements.

La cardiotoxicité des traitements anticancéreux dépend de l'interaction de trois principaux paramètres : le type de thérapie anticancéreuse, les effets du cancer sur le système cardiovasculaire du patient, et les spécificités du patient comme son état clinique et ses prédispositions génétiques (Farmakis et *al.*, 2023). Une discipline médicale transversale se situant entre la cardiologie et l'oncologie, la cardiologie-oncologique, a donc vu le jour ces dernières années. Elle a pour but d'améliorer la prise en charge des patients traités pour un cancer et ayant également des pathologies cardiovasculaires, pouvant découler ou non du traitement anticancéreux.

Dans le cadre des chimiothérapies, la classe des anthracyclines, utilisée pour traiter aussi bien des cancers hématologiques que des tumeurs solides, présente des toxicités majeures au niveau cardiovasculaire. Les anthracyclines, dont le mécanisme d'action passe par l'inhibition de la topoisomérase II (enzyme indispensable pour la réplication de l'ADN), sont responsables de la mort d'un grand nombre de cardiomyocytes, soit à cause des dommages à l'ADN, soit à cause des ROS produits par les mitochondries déstabilisées. A long terme, les patients souffrent d'insuffisance cardiaque due au développement d'une cardiomyopathie dilatée (Mark Johnson & Daniel Keyes, 2024).

Certains variants génétiques associés aux cardiomyopathies dilatées ont été identifiés chez des patients ayant déclaré une cardiomyopathie suite à un traitement anticancéreux par chimiothérapie ou immunothérapie (anthracycline et/ou trastuzumab (Anti-HER2)). Une étude a comparé une cohorte de patients ayant développé une cardiotoxicité après un traitement anticancéreux, dont les anthracyclines et/ou le trastuzumab, avec des données issues de The Cancer Genome Atlas (TCGA) et des donneurs sains. TCGA est une vaste base de données publique regroupant des informations génomiques et cliniques de patients atteints de divers types de cancers, permettant d'explorer les altérations moléculaires impliquées dans la tumorigenèse. Cette analyse a mis en évidence des variants génétiques principalement localisés sur 9 gènes : *BAG3* (BAG Cochaperone 3 : stabilisation du sarcomère par interaction avec la desmine et inhibition des voies pro-apoptotiques par interaction avec BCL2), *DSP* (Desmoplakin : composant majeur des desmosomes impliqués dans la cohésion des cardiomyocytes), *LMNA* (Lamine A/C : renforce et stabilise la membrane nucléaire interne), *MYH7* (Myosine Heavy Chain 7 : interagit avec l'actine pour générer la contraction des cardiomyocytes), *SNC5A* (Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit 5 : canal sodique

impliqué dans la génération et la propagation des potentiels d'action cardiaques), *TTN* (Titin : impliquée dans la structure des sarcomères), *TCAP* (Titin-cap : se lie à la titine et permet de conserver une stabilité et une intégrité des sarcomères dans les cardiomyocytes), *TNNC1* (Troponine C1 : se lie au calcium et modifie l'interaction entre myosine et actine), et *TNNT2* (Troponine T2 : régulation de la contraction musculaire cardiaque) (Garcia-Pavia et *al.*, 2019). Les variants de ces 9 gènes associés aux cardiomyopathies sont présents chez 40% des patients ayant une cardiomyopathie dilatée, et 12,2 % des patients ayant développé une cardiotoxicité à la suite d'un traitement anticancéreux (Garcia-Pavia et *al.*, 2019). Parmi ces 9 gènes, les variants tronqués de la titine, une protéine nécessaire à la mise en place du sarcomère dans les cardiomyocytes, sont les plus fortement associés aux cardiotoxicités. Ces variants de la titine ont été retrouvés chez 7,5 % des patients ayant une cardiotoxicité, contre 1,1% des patients du "Cancer Genome Atlas" et 0,7% des donneurs sains (Garcia-Pavia et *al.*, 2019).

Concernant les ICI, près de 40 % des patients développent des effets indésirables liés au système immunitaire dont les plus fréquents sont les toxicités cutanées (40-50%), et gastro-intestinales (10-30%). D'autres toxicités ont été répertoriées dont les toxicités neurologiques (1-6%), endocrines (10%), ou encore cardiaques (1%) (Keam et *al.*, 2024). Parmi les événements indésirables cardiaques, on trouve principalement la myocardite, mais aussi le bloc atrioventriculaire, les arythmies, le syndrome de Tako-Tsubo, ou la péricardite.

4.4. Physiopathologie de la myocardite immuno-médiée

Les premiers cas de myocardite immuno-médiée fulminante observés chez les patients ont été publiés en novembre 2016, et les biopsies endomyocardiques post-mortem décrivaient des infiltrats immunitaires denses, composés principalement de LT $CD4^+$, $CD8^+$ et de macrophages, semblables à ceux des biopsies de rejet de greffe (Johnson et *al.*, 2016).

En conditions physiologiques dans le tissu cardiaque, les cardiomyocytes et les cellules endothéliales expriment faiblement le complexe majeur d'histocompatibilité MHC-I et le récepteur PD-L1. En cas d'infiltration dans le tissu cardiaque, les LT reconnaissent MHC-I, et sécrètent de l'IFN-γ qui, lorsqu'il se fixe au niveau des cellules cardiaques, augmente la transcription et la traduction de PD-L1 et induit celle de MHC-II (Figure 23. A). Les LT sont alors inactivés grâce à la liaison de PD-1 avec son ligand PD-L1 présent sur les cellules cardiaques, permettant ainsi de conserver un tissu cardiaque sain. A contrario, en présence d'ICI, les LT restent activés malgré l'augmentation de l'expression de PD-L1 et continuent de sécréter différentes molécules pro-inflammatoires responsables de l'inflammation et de la destruction des cardiomyocytes (Figure 23.B). De plus, du l'expression de MHC-II à la surface des cellules cardiaques favorise également l'infiltration des cellules T $CD4^+$ (Grabie et *al.*, 2019).

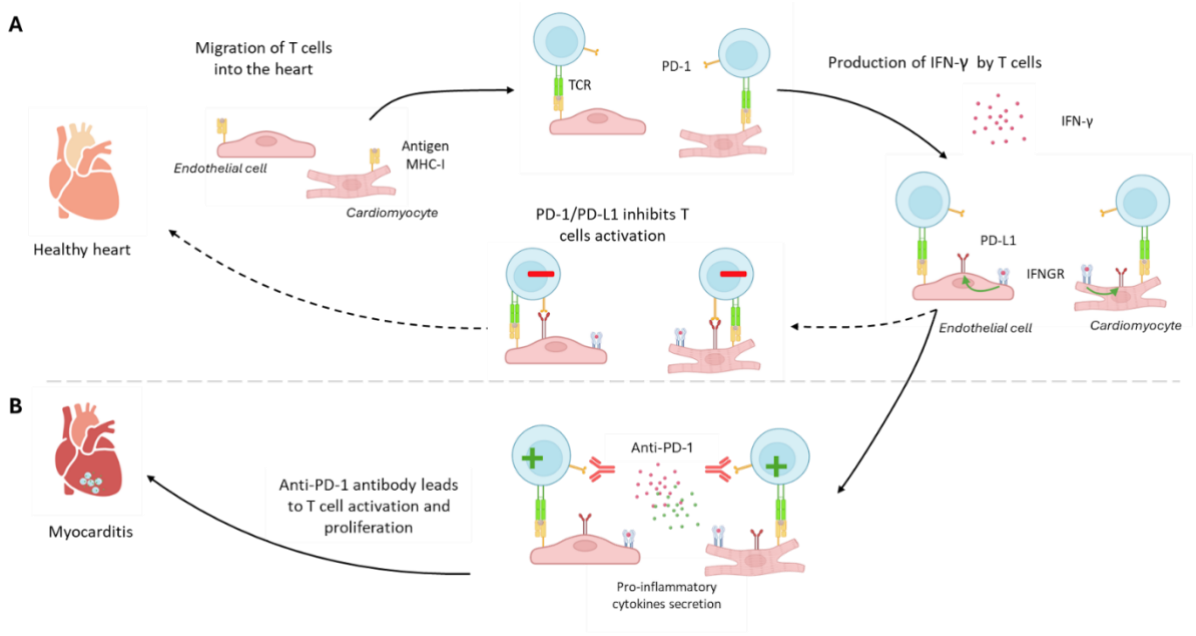


Figure 23 : Rôle de la signalisation PD-1/PD-L1 dans la réponse immunitaire cardiaque et son implication dans la myocardite immuno-médiée
(A) Dans le cœur sain, les cellules endothéliales et les cardiomyocytes expriment le ligand PD-L1, qui interagit avec le récepteur PD-1 sur les cellules T, inhibant leur activation et limitant ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN-γ. Ce mécanisme maintient la tolérance immunitaire dans le tissu cardiaque. **(B)** En cas de myocardite, l'administration d'anticorps anti-PD-1 bloque l'interaction PD-1/PD-L1, entraînant une activation excessive des cellules T, une prolifération accrue et une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, ce qui aggrave l'inflammation cardiaque. Adapté de (Grabie et *al.*, 2019)

4.4.1. Présentation clinique de la myocardite immuno-médiée post-ICI

La myocardite est une inflammation du myocarde pouvant entraîner une insuffisance cardiaque, des troubles du rythme et, dans certains cas, une évolution vers une cardiomyopathie dilatée ou le décès (Tschöpe et al., 2021). Cette pathologie peut être causée par des infections, des mécanismes auto-immuns ou des traitements immunomodulateurs tels que les ICI (Suresh et al., 2022). La myocardite infectieuse est majoritairement d'origine virale avec, par exemple, les entérovirus, les adénovirus et le parvovirus B19 qui infectent directement le myocarde et déclenchent une réponse immunitaire exacerbée pouvant conduire à la destruction des cardiomyocytes. Certaines bactéries comme *Borrelia burgdorferi* (maladie de Lyme) ou des parasites comme *Trypanosoma cruzi* (maladie de Chagas) peuvent

également être responsables de myocardites (Tschöpe et al., 2021). À l'inverse, la myocardite immuno-médiée ou auto-immune est caractérisée par une activation aberrante du système immunitaire en l'absence d'infection active, comme observé dans des pathologies telles que le lupus érythémateux systémique ou la sclérodermie, où les lymphocytes T et les macrophages infiltrent le myocarde et provoquent une inflammation chronique et une fibrose progressive (Cooper, 2009).

La myocardite induite par les immunothérapies de type ICI (MIM) est la cardiotoxicité la plus grave, létale dans 25-40% des cas, mais elle reste rare, survenant chez environ 1% des patients. La MIM se déclare principalement dans les douze premières semaines du traitement, entre la 1ère et la 3ème perfusion, et la combinaison d'ICI, notamment Ipilimumab (anti-CTLA-4) et Nivolumab (anti-PD-1), est un facteur de risque pour les patients (Keam et *al.*, 2024; Lyon et *al.*, 2022).

Le diagnostic de la MIM est complexe et il peut être posé soit à la suite du résultat histologique positif d'une biopsie endomyocardique, qui est l'examen de référence, soit grâce au calcul d'un score diagnostique (ICOS) représentant l'association d'une élévation du taux de troponine circulante et d'un critère majeur, ou de deux critères mineurs. Le critère majeur est une anomalie à l'IRM cardiaque, notamment le rehaussement septal tardif au gadolinium identifié comme un prédicteur potentiel de cardiotoxicité sévère chez les patients atteints de MIM post-ICI (Cadour et *al.*, 2022). Les critères mineurs sont des symptômes cliniques (fatigue, myalgie, douleur thoracique, dyspnée …), des troubles du rythme ventriculaire et / ou de la conduction visibles à l'électrocardiogramme (ECG), une altération de la fraction d'éjection du ventricule gauche, ou d'autres atteintes immuno-médiées telles que la myosite ou la myopathie (Lyon et *al.*, 2022).

Une fois diagnostiquées, les MIM doivent être classées selon leur gravité, de modérée à très grave avec syndrome myasthéniforme, pour guider au mieux leur prise en charge. L'interruption du traitement par ICI est conseillée en cas de myocardite suspectée, avec reprise éventuelle après résolution des anomalies et discussion en équipe pluridisciplinaire. Les patients atteints de myocardite, fulminante ou non, doivent être hospitalisés avec surveillance continue de l'ECG, et sont traités par corticoïdes en première ligne afin de réduire les effets inflammatoires indésirables majeurs, dont la mortalité. Si la réponse au traitement est insuffisante, ou en cas de forme sévère, une immunosuppression de deuxième ligne est envisagée. Après rétablissement du patient, la reprise du traitement dépend de la gravité de la MIM et des options oncologiques disponibles (Lyon et *al.*, 2022).

4.4.2. Populations immunitaires infiltrant le tissu cardiaque lors de la myocardite immuno-médiée

La myocardite associée aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaires (ICI-M) se caractérise par une infiltration importante de populations immunitaires dans le tissu cardiaque, principalement observée dans les biopsies endomyocardiques.

Les LT $CD8^+$ cytotoxiques sont très représentés dans l'infiltrat immunitaire, ainsi que dans les PBMC circulants des patients ayant déclenché une myocardite. Ils présentent une forte activation observée via l'expression des marqueurs cytotoxiques comme GZMB, GNLY (Granulysin, composant des granules cytotoxiques) et CCL5, ainsi que des molécules d'activation telles que LAG3, TIGIT (T Cell Immunoreceptor With Ig And ITIM Domains) et PD-1 (Siddiqui et *al.*, 2024; Zhu et *al.*, 2022). Ces cellules contribuent directement aux lésions myocardiques. Les macrophages inflammatoires infiltrant le tissu cardiaque, identifiés par leur expression de CXCL2, CXCL3 et CXCL8, produisent également des cytokines telles que TNF-α et IL-1β, amplifiant l'inflammation locale (Siddiqui et *al.*, 2024). L'analyse des PBMC circulants révèle une augmentation des cellules T $CD8^+$ TEMRA, exprimant également des gènes liés à la cytotoxicité et à l'inflammation, renforçant l'idée d'un processus systémique (Blum et *al.*, 2024; Zhu et *al.*, 2022). Des concentrations élevées de cytokines circulantes, telles qu'IL-12p40, IL-15, IL-27 et IL-18, sont aussi observées. IL-15 semble avoir un rôle protecteur en limitant l'activation des cellules T $CD8^+$, tandis qu'IL-12 et IL-18 exacerbent les réponses inflammatoires (Blum et *al.*, 2024; Yu et *al.*, 2024).

Les interactions immunitaires dans l'ICI-M révèlent des connexions complexes entre la tumeur, le cœur et d'autres pathologies inflammatoires comme la myosite. Bien que certains clones de lymphocytes T soient présents à la fois dans les tissus tumoraux et cardiaques, les antigènes spécifiques ciblés diffèrent généralement, les clones intracardiaques les plus enrichis ne reconnaissant pas les auto-antigènes cardiaques typiques tels que l'α-myosine ou la troponine (Blum et *al.*, 2024). De plus, des similitudes immuno-pathologiques importantes sont observées entre la myocardite et la myosite associées aux ICI, incluant une infiltration massive de cellules T $CD8^+$ exprimant des marqueurs cytotoxiques (GZMB, GNLY) et des chimiokines inflammatoires (CCL4, CCL5, CXCL10) (Siddiqui et *al.*, 2024). Les macrophages infiltrants produisent également des cytokines pro-inflammatoires telles que TNF-α et IL-1β, activant des voies inflammatoires *via* NF-κB et l'IFN-γ. Ces deux pathologies partagent des signatures transcriptionnelles similaires dans les PBMC, impliquant des gènes liés à la réponse à l'interféron, à la présentation antigénique et à la myocardite virale (Blum et *al.*, 2024). Enfin, l'activation de l'inflammasome NLRP3 et l'implication des autoanticorps renforcent le lien pathogénique entre la myocardite, la myosite et l'inflammation systémique associée à l'ICI-M.

4.4.3. Implication de l'inflammasome NLRP3 dans la myocardite immuno-médiée

L'implication de l'inflammasome NLRP3 dans l'ICI-M a été mentionnée pour la première fois en 2021 par Finke et *al.*. Leur étude est basée sur la comparaison de biopsies endomyocardiques de patients ayant ou non déclaré une ICI-M, avec celles de patients atteints de cardiomyopathie dilatée ou de myocardite virale. Ils ont montré une activation marquée des voies dépendantes de l'IFN-γ, contribuant à l'inflammation myocardique *via* des médiateurs comme GBP5 et GBP6, fortement exprimés dans les cardiomyocytes (Finke et *al.*, 2021). Cette activation immunitaire locale suggère une contribution importante de l'inflammasome NLRP3 à l'inflammation cardiaque.

Les cytokines pro-inflammatoires renforcent ce processus pathologique, à la fois au niveau cardiaque et systémique. Dans les biopsies cardiaques, l'IFN-γ stimule la production de chimiokines telles que CXCL9, CXCL10 et CXCL11, qui attirent les lymphocytes T $CD8^+$ *via* le récepteur CXCR3 (Finke et *al.*, 2021). Des travaux ultérieurs, notamment ceux de Sun et *al.* (2024), ont confirmé l'activation de l'inflammasome, accompagnée d'une production accrue d'IL-1β et d'IL-18, caractéristiques de cet inflammasome. Par ailleurs, l'augmentation de la gasdermine E (GSDME), un médiateur clé de la pyroptose, amplifie les lésions myocardiques inflammatoires (S.-J. Sun et *al.*, 2024).

Ces résultats positionnent NLRP3 comme un acteur majeur de la pathogenèse de la MIM post-ICI, en lien avec l'activation des macrophages et des lymphocytes T, et en font une cible prometteuse pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

En résumé, la myocardite associée aux ICI est un effet secondaire complexe, impliquant des infiltrats cellulaires spécifiques, des cytokines pro-inflammatoires et l'activation de l'inflammasome NLRP3. Les interactions avec les tumeurs et les similitudes avec la myosite renforcent l'idée de mécanismes immunitaires convergents. Une meilleure compréhension de ces processus est essentielle pour identifier des cibles thérapeutiques et améliorer la prise en charge des patients recevant des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire.

4.5. Stratégies d'étude de la myocardite immuno-médiée

4.5.1. Modèles animaux

Les modèles murins jouent un rôle essentiel dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la myocardite immuno-induite. Parmi eux, les souris déficientes en points de contrôle immunitaire ont été largement étudiées. Les souris CTLA-$4^{-/-}$, sur fonds BALB/c et C57BL/6, développent une myocardite sévère associée à une infiltration massive de lymphocytes T dans le tissu cardiaque (Tivol et *al.*, 1995). Ce modèle pionnier a démontré l'importance de CTLA-4 dans la régulation des réponses lymphocytaires pathogènes. De manière similaire, les souris BALB/c PD-$1^{-/-}$ présentent des dysfonctions cardiaques, conduisant spontanément à une cardiomyopathie dilatée avec insuffisance cardiaque congestive (H. Nishimura et *al.*, 2001).

Les souris MRL déficientes en PD-1 et en PD-L1 ont renforcé notre compréhension des mécanismes auto-immuns cardiaques. Ces modèles présentent une infiltration myocardique massive de macrophages, de lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$, accompagnée d'auto-anticorps dirigés contre la myosine cardiaque (Lucas et *al.*, 2008; J. Wang et *al.*, 2010). Ces infiltrations, caractéristiques des myocardites dysimmunitaires, sont prédominantes dans les oreillettes et les ventricules, illustrant le rôle clé de PD-L1 dans la prévention des réponses lymphocytaires aberrantes.

Les modèles murins ont également permis d'étudier les effets spécifiques des inhibiteurs des points de contrôle immunitaire (ICI). Chez les souris BALB/c traitées par anti-PD-1, des infiltrats de lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ dans le myocarde ont été associés à une augmentation de STAT1 phosphorylé, NF-κB, TNF-α et de la caspase-3 (Tay et *al.*, 2020). De plus, l'association des traitements anti-PD-1 et anti-HER2 a démontré un effet synergique néfaste. Les souris C57BL/6 traitées, par cette bi-thérapie, ont présenté une augmentation significative des cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, IL-6, IL-8), du NF-κB et du leucotriène B4, ainsi qu'une fibrose myocardique marquée (Quagliariello et *al.*, 2019).

Zhang et *al.* ont utilisés des souris BALB/c immunisées avec un peptide de troponine I cardiaque et traitées par anti-PD-1 pour induire une myocardite liée aux ICI. Dans ce modèle, l'inflammasome NLRP3 est fortement activé, entraînant une pyroptose des cardiomyocytes caractérisés par une augmentation de l'activité de la caspase-1, de GSDMD clivé et de cytokines inflammatoires (IL-1β, IL-18). La crocine, un composé naturel, a montré des effets protecteurs significatifs en réduisant la pyroptose, l'inflammation myocardique et les dommages tissulaires *via* l'inhibition de la voie NF-κB et de l'inflammasome NLRP3 (H. Zhang et *al.*, 2022).

Les modèles combinant des déficiences en PD-1 et CTLA-4 ont permis d'approfondir les connaissances sur les interactions complexes entre ces voies immunitaires dans la myocardite. Chez les souris mutantes pour PD-1 avec une perte mono-allélique de CTLA-4 (PD-$1^{-/-}$ CTLA-$4^{+/-}$), une mortalité prématurée est observée chez environ la moitié des animaux, tandis que les souris complètement déficientes en CTLA-4 (CTLA-$4^{-/-}$) sont atteintes d'un trouble lymphoprolifératif fatal. Ces souris PD-$1^{-/-}$ CTLA-$4^{+/-}$ présentent une infiltration myocardique importante composée de lymphocytes T et de macrophages, accompagnée d'anomalies sévères à l'ECG, similaires à celles observées chez les patients atteints de myocardite. Ces observations suggèrent que l'association des anticorps bloquant anti-PD-1 et anti-CTLA-4 pourrait considérablement accroître le risque de myocardite. De plus, l'utilisation de l'abatacept, un modulateur de CTLA-4, a montré une efficacité significative, réduisant à la fois la mortalité et l'infiltration lymphocytaire myocardique (Wei et *al.*, 2021). Dans ce modèle murin, des macrophages CCR2^{+}, exprimant fortement CXCL9/10, ainsi que des LT CD8^{+} ont été identifiés (Ma et *al.*, 2024). L'analyse transcriptomique a révélé que l'activation de ces macrophages pathogènes est médiée par l'IFN-γ sécrété par les LT CD8^{+}, contribuant ainsi à l'aggravation de la pathologie cardiaque. Ces mécanismes, également retrouvés chez les patients atteints de myocardite associée aux ICI, soulignent la pertinence de ces modèles pour l'étude de cette maladie.

Parallèlement, Sun et *al.* ont mis en évidence le rôle central de la gasdermine E (GSDME) dans la pyroptose des cardiomyocytes dans des modèles murins C57BL/6J déficientes en GSDME et traitées par anti-PD-1 de manière prolongée, ou par une combinaison anti-PD-1/anti-CTLA-4, pour déclencher une myocardite. Ces souris présentent une réduction significative de l'infiltration de LT, de macrophages et de monocytes dans le myocarde, ainsi qu'une diminution des dommages mitochondriaux et de l'inflammation. GSDME, en libérant de l'ADN mitochondrial, active la voie cGAS-STING et déclenche une réponse immunitaire médiée par l'IFN-γ. La suppression pharmacologique ou génétique de GSDME améliore la survie et réduit les biomarqueurs de la myocardite, notamment les troponines et les cytokines pro-inflammatoires. Les résultats soulignent que la pyroptose médiée par GSDME se produit principalement dans les cardiomyocytes, confirmant leur rôle central dans la pathogénie des myocardites associées aux ICI (S.-J. Sun et *al.*, 2024).

Enfin, des modèles murins tumoraux ont permis de valider les observations cliniques. Chez les souris C57BL/6 porteuses de mélanome murin traitées par anti-PD-1, une augmentation de PD-L1 dans les cellules endothéliales cardiaques a été corrélée à une infiltration myocardique de lymphocytes T CD4^{+} et CD8^{+} fortement activés. Ces données suggèrent une interaction médiée par PD-L1 dans le myocarde et une dérégulation métabolique myocardique associée (Michel et *al.*, 2022).

Un modèle complémentaire d'étude a été développé chez le singe, non porteur de cancer, traité par une combinaison d'anti-PD-1 et d'anti-CTLA-4. Ce modèle a révélé une infiltration myocardique composée majoritairement de LT, de macrophages et de cellules B, reflétant les

caractéristiques de la myocardite observée chez l'Homme. Une analyse transcriptomique a mis en évidence une augmentation de l'expression de récepteurs de chimiokines (CXCR3-CXCL9/CXCL10, CCR5-CCL5), de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC), et de gènes pro-inflammatoires tels que STAT4 et TNF-α. Ces résultats renforcent l'idée que la myocardite induite par les ICI repose sur des mécanismes inflammatoires et chimiotactiques similaires entre les modèles simien et humain, offrant une base pour des recherches translationnelles (Ji et *al.*, 2019).

4.5.2. Modèles cellulaires

A ce jour, deux modèles *in vitro* ont été développés pour étudier l'impact des ICI sur les cardiomyocytes. Un premier modèle a été développé à partir de cardiomyocytes fœtaux humains co-cultivés avec des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) et stimulés avec du pembrolizumab (anti-PD-1) et/ou du trastuzumab (anti-HER2). La combinaison de ces deux anticorps monoclonaux entraîne une augmentation notable de la mort cellulaire, accompagnée d'une surcharge en calcium intracellulaire et de l'activation de la voie NF-κB, ce qui illustre une réponse inflammatoire et apoptotique exacerbée (Quagliariello et *al.*, 2019). Le même groupe de recherche a publié un an plus tard, dans le même modèle de co-cutlure de cardiomyocytes fœtaux humains et PBMC, l'effet des anticorps anti-PD-1 et anti-CTLA-4 sur les voies inflammatoires. Les résultats montrent une augmentation de l'expression de la sous-unité p65 de NF-κB et du complexe inflammasome NLRP3 en présence des PBMC, suite à la stimulation par les ICI. De plus, des immunomarquages ont révélé la localisation cytoplasmique de NLRP3, accompagnée d'une augmentation des cytokines pro-inflammatoires IL-1β, IL-6, IL-8 et TGF-β. Ces observations mettent en avant les mécanismes inflammatoires amplifiés par les ICI (Quagliariello et *al.*, 2020).

Un autre groupe a développé un modèle de cardiomyocytes dérivés de cellules souches embryonnaires (ESC-CM), co-cultivés avec des lymphocytes T $CD4^+$ ou $CD8^+$. Les résultats de cette étude montrent l'augmentation significative de la réponse inflammatoire, notamment *via* l'expression accrue de PD-L1, après l'ajout d'anticorps anti-PD-1. Bien que le traitement par anti-PD-1 seul ne provoque pas d'apoptose des cardiomyocytes, la co-culture avec des lymphocytes T $CD4^+$ induit une apoptose marquée. Cet effet n'a pas été observé lors de la co-culture avec des lymphocytes T $CD8^+$, mettant en lumière une spécificité d'interaction avec les T $CD4^+$ (Tay et *al.*, 2020).

Ces modèles cellulaires offrent des outils précieux pour décrypter les mécanismes d'action des ICI sur les cardiomyocytes et décortiquer les voies inflammatoires et apoptotiques impliquées dans la myocardite induite. Ils constituent également une base pour le développement de stratégies visant à prévenir ou atténuer ces effets secondaires cardiaques potentiellement graves. Cependant, ces modèles de cardiomyocytes n'utilisent que des

cellules provenant de personnes saines et aucun modèle *in vitro* utilisant des cellules endothéliales n'a été développé dans ce contexte de cardiotoxicité aux traitements par ICI. Pourtant, il existe de nombreuses cultures primaires endothéliales largement utilisées en recherche cardiovasculaire notamment pour l'étude de mécanismes inflammatoires, apoptotiques et de dysfonction endothéliale : HUVEC, HCMEC (Human Cardiac Microvascular Endothelial Cells) ou les HCAEC (Human Coronary Artery Endothelial Cells).

4.6. Utilisation des cellules souches pluripotentes induites en cardio-oncologie

Les approches traditionnelles pour étudier les effets sur le système cardiovasculaire des traitements anticancéreux, reposant sur des modèles animaux ou des lignées cellulaires, présentent des limites importantes. Les différences inter-espèces rendent difficile la transposition directe des résultats aux patients. Dans ce contexte, les hiPSC offrent une alternative de choix. Comme mentionné dans la partie 2 de l'Introduction, ces cellules reprogrammées à partir de cellules somatiques humaines peuvent être différenciées en cellules cardiaques pour être utilisées afin de reproduire les réponses spécifiques des patients aux traitements anticancéreux. Cette technologie permet de combler le fossé entre les modèles précliniques et les applications cliniques.

Les hiPSC-CM se sont révélées essentielles pour modéliser la cardiotoxicité des thérapies anticancéreuses, notamment celle de la doxorubicine, offrant une plateforme unique pour explorer les mécanismes sous-jacents et identifier les patients à risque. Une étude menée par Burridge et *al.* a montré que des hiPSC-CM peuvent reproduire la sensibilité individuelle à la doxorubicine au niveau cellulaire. La comparaison des hiPSC-CM issus de 4 patients ayant développé une cardiotoxicité et de 4 patients n'ayant pas déclaré de cardiotoxicité à la doxorubicine, a révélé des différences marquées. Les hiPSC-CM des patients ayant déclaré une cardiotoxicité présentaient une viabilité réduite, des dysfonctionnements mitochondriaux et métaboliques, une mauvaise régulation du calcium, une activité antioxydante diminuée et une production accrue de radicaux libres. Ces résultats mettent en évidence l'efficacité des hiPSC-CM comme modèle pour étudier les mécanismes génétiques et moléculaires responsables de la cardiotoxicité induite par la doxorubicine (Burridge et *al.*, 2016).

Les hiPSC-EC ont aussi été utilisées pour étudier la cardiotoxicité des traitements anticancéreux, dont la doxorubicine. Ces travaux ont montré la prédisposition au stress apoptotique des cellules endothéliales comparée à d'autres types cellulaires comme les cellules musculaires lisses vasculaires dérivées d'hiPSC. Cette prédisposition est à considérer avec attention car elle pourrait contribuer aux toxicités cardiovasculaires induites par les thérapies anticancéreuses (Spetz et al., 2022).

Concernant les immunothérapies anticancéreuses, une étude utilisant des hiPSC-CM en co-culture avec des cellules endothéliales dérivées de progéniteurs circulants a démontré que la signalisation HER2/4, activée par la neureguline-1 ou le HB-EGF sécrétés par les cellules endothéliales, exerce un effet cardioprotecteur. L'inhibition de cette voie par le trastuzumab induit une cardiotoxicité, notamment en présence d'un stress cellulaire comme celui provoqué par la doxorubicine (Kurokawa et *al.*, 2018).

Des études GWAS menées sur des patients ayant déclaré une cardiotoxicité aux traitements anticancéreux ont permis d'identifier plusieurs variants associés à un risque accru d'effets secondaires cardiaques. L'utilisation de l'édition génomique CRISPR/Cas9 a ensuite permis de valider l'implication de certains de ces variants et d'explorer leur rôle mécanistique dans des hiPSC-CM. Par exemple, la suppression de *TOP2B* par CRISPR dans ces cellules a montré une réduction de la toxicité induite par la doxorubicine, confirmant son rôle clé dans la cardiotoxicité des anthracyclines. Ces approches permettent ainsi d'affiner la stratification des patients en fonction de leur risque génétique, facilitant une approche thérapeutique personnalisée (Pinheiro et *al.*, 2019).

Les hiPSC offrent l'avantage de reproduire la diversité génétique humaine et de modéliser des réponses spécifiques des patients, tout en réduisant le recours aux modèles animaux. Cependant, leur immaturité fonctionnelle et leur difficulté à capturer les interactions systémiques *in vivo* restent des limites. Des avancées, comme les co-cultures multicellulaires et les modèles 3D (sphéroïdes cardiaques, tissus bioingénierés), reproduisent plus fidèlement l'architecture myocardique et miment les effets à long terme des traitements (Shead et *al.*, 2024). Ces progrès renforcent leur potentiel pour mieux prédire les toxicités chroniques et les interactions multicellulaires.

5. Objectifs de l'étude

Le système immunitaire joue un rôle central dans de nombreuses cardiopathies, notamment par l'intermédiaire des mécanismes inflammatoires. Parmi eux, l'inflammasome a été identifié comme un acteur clé dans diverses pathologies cardiovasculaires, telles que l'athérosclérose, l'infarctus du myocarde et l'insuffisance cardiaque. Ce complexe protéique inflammatoire suscite également un intérêt croissant pour son rôle potentiel dans les cardiotoxicités associées aux traitements anticancéreux, en particulier dans les myocardites immuno-médiées (MIM). Ces complications rares mais graves, survenant chez certains patients recevant des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire (ICI), sont caractérisées par une infiltration du tissu cardiaque par des lymphocytes T activés, entraînant une inflammation intense et des dommages parfois irréversibles. Les mécanismes physiopathologiques responsables de cette toxicité cardiaque, qui peut aller jusqu'à la nécrose du tissu, demeurent à ce jour mal élucidés.

Pour mieux comprendre les mécanismes de la MIM post-ICI, notre équipe a mis en place une approche translationnelle en étroite collaboration avec le centre Medi-CO de l'hôpital Nord de Marseille. Pour caractériser ces mécanismes au niveau cellulaire, l'équipe a développé un modèle d'étude de la MIM post-ICI *in vitro,* constitué de cellules souches pluripotentes induites (hiPSC) générées à partir des cellules des patients suivis au centre Medi-CO dans le cadre de leur traitement contre le cancer par immunothérapie de type ICI (cohorte gMEDICO).

Au cours de ce travail de thèse, des clones hiPSC ont été générés sur de deux groupes de patients : ceux qui ont déclaré une MIM suite au traitement par ICI (ICI-M), et ceux qui n'ont pas déclaré de MIM (non-ICI-M).

L'objectif principal de ma thèse a été de caractériser ces hiPSC après différenciation en cellules cardiaques, cardiomyocytes (CM) et en cellules endothéliales (EC), pour les utiliser ensuite dans le cadre de la MIM. Ce travail a comporté plusieurs niveaux d'exploration :

- Caractériser l'état de différenciation des cellules cardiaques hiPSC-CM et hiPSC-EC en fonction de leur clone d'origine. En effet, compte-tenu de la complexité de ce modèle cellulaire, où la variabilité est exprimée à différents niveaux depuis la reprogrammation jusqu'à la différenciation, il était nécessaire d'établir des conditions de différenciation stables et reproductibles d'un clone à l'autre.

- Étudier la réponse des cellules cardiaques, hiPSC-CM et hiPSC-EC, à différentes cytokines inflammatoires, dont l'IFN-γ, identifiées chez les patients ayant déclaré une MIM. Nous avons fait le choix d'utiliser les cytokines pour mimer l'environnement inflammatoire dans lequel baigne les cellules cardiaques au cours de la MIM post-ICI plutôt que d'utiliser directement les cellules immunitaires. En effet, il fallait dans un premier temps caractériser de manière approfondie ce modèle sans y ajouter un autre type cellulaire au risque de trop le complexifier.

- Comparer les réponses des hiPSC-CM et des hiPSC-EC pour mieux comprendre leur rôle respectif au cours de l'inflammation. La plupart des travaux publiées à ce jour sur des modèles cellulaires d'étude de la MIM post-ICI portent sur la réponse des cardiomyocytes. Or, les cellules endothéliales sont des acteurs clé dans les maladies cardiovasculaires, en particulier quand elles sont inflammatoires. Il nous semblait majeur de caractériser l'état inflammatoire dans ces deux types cellulaires, en attachant un intérêt particulier à l'inflammasome, pour mieux comprendre les mécanismes de la MIM.

- Caractériser le comportement des cellules cardiaques hiPSC-CM et hiPSC-EC en fonction de leur groupe d'origine, ICI-M *vs* Non-ICI-M. Cette analyse est celle qui nous permet de vérifier si les clones hiPSC provenant des patients ont conservé des traits génétiques ayant causé la MIM post-ICI, et quels sont ceux qui sont le plus représentatifs de la pathologie. Elle est essentielle car elle conduira au choix des clones qui serviront dans le futur à établir un modèle multicellulaire 3D de MIM *in vitro*.

Ainsi, cette thèse contribuera à l'avancement des connaissances dans le domaine de la cardiologie et de l'immunologie, elle apportera des informations nouvelles sur le comportement des cellules cardiaques dans un contexte inflammatoire, elle participera à une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires responsables de la MIM post-ICI, et elle favorisera l'émergence de modèles cellulaires *in vitro* pour l'étude de la MIM et de l'exploration inflammatoire cardiaque, mais au-delà, des maladies cardiovasculaires en général.

Méthodes

1. Culture cellulaire

1.1. Obtention et génération des hiSPC

La génération des clones hiPSC a été réalisée par la plateforme de cellules souches du MMG, campus Timone (MaCS, Marseille) à partir d'échantillons de patients provenant de la cohorte gMEDICO. Les reprogrammations ont été effectuées à partir de fibroblastes cutanés ou de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) en fonction des échantillons disponibles pour chacun des patients.

Les fibroblastes cutanés ont été reprogrammés par nucléofection (VAPD-1001, Amaxa) avec les vecteurs OCT4, SOX2, KLF4, cMYC et SHBP53. Les plasmides de reprogrammation ne sont plus exprimés dans les hiPSC à partir du passage 5. Les PBMC sont reprogrammées par transduction Sendai (Cytotune 2, Life Technologies). Le virus Sendai n'est plus présent dans les hiPSC à partir du passage 4 - 7 en fonction des clones.

La pluripotence des hiPSC a été évaluée par cytométrie en flux afin d'identifier le pourcentage de cellules exprimant les facteurs de transcription indispensables au maintien de la pluripotence : OCT3/4, SOX2 et NANOG. De plus, des gènes spécifiques ont été testés par RT-qPCR pour observer la capacité de différenciation des clones hiPSC en ectoderme (ALDHA1, NCAM), mésoderme (BRACHYURY, COL2A1) et endoderme (FOXA2, AFP).

Après réception, les hiPSC sont maintenues dans du mTeSR™1 (85850, STEMCELL™ Technologies) avec une matrice de Matrigel hESC-qualified (354277, Corning) et passées tous les 5 à 7 jours (80 % de confluence) en utilisant du versene (15040-066, Thermo Fisher Scientific). Toutes les cultures ont été testées une fois par mois pour les mycoplasmes en utilisant le kit MycoAlert Plus (LT07-710, Lonza).

A ce jour, nous disposons de 13 clones hiPSC : un clone d'un donneur sain, et deux clones pour chacun des six patients de la cohorte gMEDICO, sélectionnés sur la base de critères cliniques. Le tableau clinique des donneurs et les caractéristiques des clones sont détaillés dans la partie 1.1. du Chapitre Résultats pour une meilleure lisibilité des résultats, en particulier la corrélation entre phénotype et provenance des clones.

1.2. Différenciation des hiPSC en cardiomyocytes (hiPSC-CM)

Les hiPSC sont dissociées avec du StemPro Accutase (A1110501, Gibco) à 37°C pendant 7 minutes ou du Gentle Cell Dissociation Reagent (100-0485, STEMCELL™ Technologies) à 37 °C pendant 10 min. Après centrifugation, 1,8 à 2 millions de cellules sont ensemencées dans du mTeSR™1 supplémenté en RevitaCell™ (A2644501, Life Technologies) sur des plaques 6 puits avec une matrice de Matrigel (jour -2). Après 24h, le milieu est remplacé par du mTeSR™1 (jour -1). Au jour 0, les cellules doivent atteindre plus de 95 % de confluence avant de commencer le protocole de différenciation en suivant les instructions du fournisseur pour le kit STEMdiff™ Ventricular Cardiomyocyte Differentiation and Maintenance (05010, STEMCELL™ Technologies). Des battements spontanés sont observés après 8 à 10 jours (Figure 24).

En fonction de la qualité de la différenciation une purification métabolique, basée sur la substitution du glucose par du lactate, est réalisée. Seuls les cardiomyocytes sont capables d'adapter leur métabolisme ce qui permet d'éliminer les cellules non-cardiomyocytes. Pour cela, à jour 15, les cellules sont cultivées pendant 5 jours dans du RPMI 1640 sans glucose (11879020, ThermoFisher Scientific) supplémenté en lactate 4 mM (L4263, Sigma-Aldrich) et Hepes 25 mM (15360-056 – Life Technologies).

A jour 16, ou après la purification métabolique, les cardiomyocytes sont dissociés en suivant les instructions du kit STEMdiff™Cardiomyocyte Dissociation (05025, STEMCELL™ Technologies). Les cellules sont remises en culture dans du milieu STEMdiff™ Cardiomyocyte Support (05027, STEMCELL™ Technologies) sur différents supports recouverts d'une matrice de Matrigel. Dans des plaques 24 puits, 500 000 cellules / puits sont ensemencées, dans des plaques 96 puits, 150 000 cellules sont ensemencées et dans des LabTek 8 chambres (94.6170.802, SARSTEDT), 400 000 cellules sont ensemencées. Après 24h, le milieu est remplacé par le milieu STEMdiff™ Cardiomyocyte Maintenance (05020, STEMCELL™ Technologies), puis changé tous les deux jours. Les hiPSC-CM sont stimulés entre les jours 28 et 32.

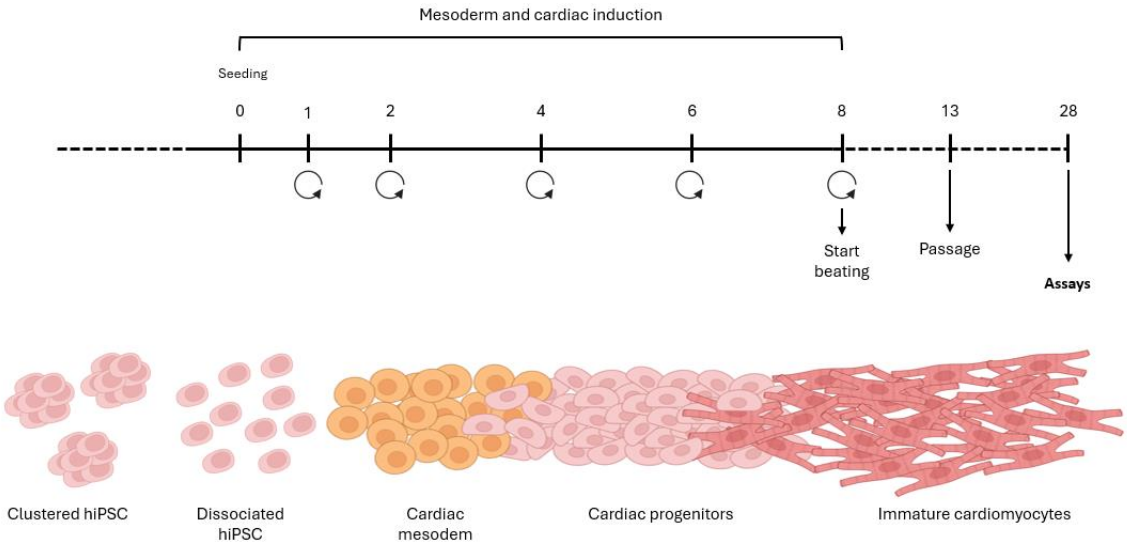


Figure 24 : Protocole de différenciation des hiPSC en cardiomyocytes

Les flèches circulaires représentent les changements de milieu de différenciation. Des battements apparaissent dès D8. Les cellules sont stimulées et analysées à partir du jour 28 (D28).

1.3. Différenciation des hiPSC en cellules endothéliales (hiPSC-EC)

Les hiPSC sont dissociées avec de l'accutase à 37°C pendant 7 minutes, puis 200 000 cellules sont ensemencées dans du mTeSR™1 supplémenté en Revitacell™ sur des plaques 6 puits avec une matrice de Matrigel (jour -1). Au jour 0, le protocole de différenciation débute en utilisant le milieu STEMdiff™ Mesoderm Induction (05221, STEMCELL™ Technologies). Au jour 3, la différenciation se poursuit avec le kit STEMdiff™Endothelial Differentiation (08005, STEMCELL™ Technologies) selon les instructions du fournisseur (Figure 25).

Une fois différenciées, les hiPSC-EC sont cultivées sur une matrice de la gélatine à 0,1% (G1890, Sigma) dans du MV2 (C-22022, Promocell) supplémenté en VEGF recombinant (Human recombinant VEGF-165, 78158.1, STEMCELL™ Technologies) à 25 ng/ml. Un passage au TrypLE Express (12604013, ThermoFisher) est réalisé tous les 5 à 7 jours lorsque les cellules sont entre 85 et 90 % de confluence.

À passage 4, les hiPSC-EC sont ensemencées sur différents supports avec une matrice de gélatine à 0,1% et sont stimulées après 48h de remise en culture. Dans des plaques 6 puits, 80 000 cellules sont ensemencées, dans les plaques 24 puits, 165 000 cellules / puits sont ensemencées, dans des plaques 96 puits, 8 000 cellules sont ensemencées et dans des LabTek 8 chambres, 500 000 cellules sont ensemencées.

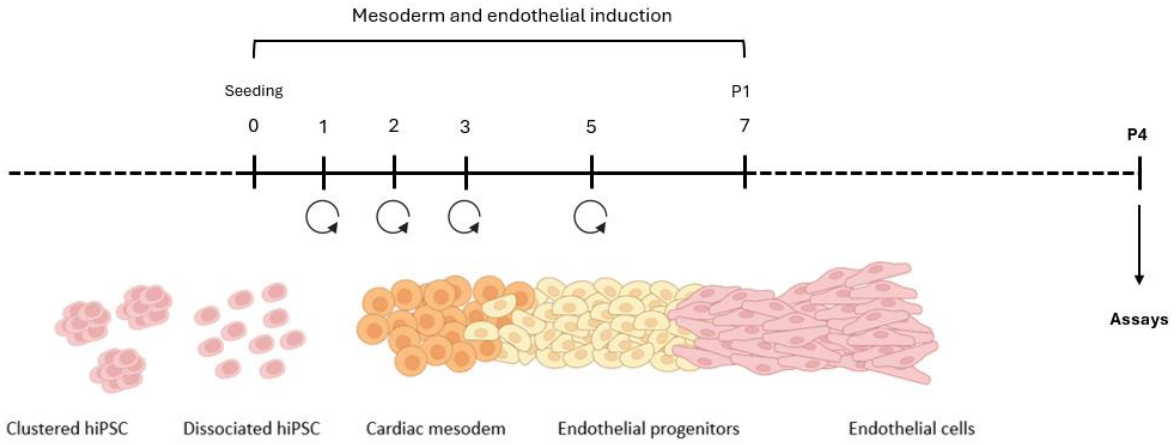


Figure 25 : Protocole de différenciation des hiPSC en cellules endothéliales
Les flèches circulaires représentent les changements de milieu de différenciation. Les cellules sont stimulées et analysées au passage 4.

1.4. Stimulation des hiPSC-CM et hiPSC-EC

Les différents modèles cellulaires ont été stimulés avec des molécules pro-inflammatoires, seules ou en combinaison, pendant 48h. Des effets doses ont été réalisés dans un premier temps afin de sélectionner les concentrations adéquates pour le cocktail de stimulation (Tableau 1).

Molécule	Effet dose (ng/ml)				Références
CCL5	0,1	1	10	100	580202 – Biolegend
GZMB	0,05	0,5	5		SRE0021 – Merck
IL-1β	0,1	1	10	100	579402 – Biolegend
IL-2	0,2	2	20		130-097-745 – Miltenyi Biotec
IL-6	0,1	1	10	100	570802 – Biolegend
IFN-γ	0,1	1	10	100	130-096-484 – Miltenyi Biotec
TNF-α	0,05	0,5	5		130-094-014 – Miltenyi Biotec

Tableau 1 : Doses et références utilisées pour les différentes molécules pro-inflammatoires

2. Caractérisation moléculaire

2.1. Étude de l'expression des transcrits

2.1.1. Extraction des ARN totaux

Les extractions d'ARN ont été réalisées en suivant les instructions du « RNeasy® Mini kit » (74104, QIAGEN). Après avoir été récupérées dans du tampon de lyse (buffer RLT + 1% β-mercaptoéthanol) les cellules ont été homogénéisées à l'aide de colonnes QIAshredder (79656, QIAGEN). Avant l'élution des ARN totaux, une étape de digestion à la DNaseI (79254, QIAGEN) est réalisée en suivant les instructions de l'annexe E du kit d'extraction d'ARN, afin d'éviter une contamination des échantillons d'ARN à l'ADN génomique.

La concentration d'ARN est par la suite déterminée par absorbance dans 2 µl d'échantillon grâce au rapport 260/280 nm mesuré avec un NanoDrop (ND-1000, Thermo Scientific).

La qualité des ARN a été confirmée au BioAnalyzer Agilent (Agilent 2100, Agilent Technologies™) en utilisant des puces RNA 600 Nano (5067-1511, Agilent Technologies ™). Lorsque le RIN (RNA Integrity Number) est compris entre 8 et 10 cela reflète une bonne intégrité des ARN. Tous les ARN que nous avons testés étaient de bonne qualité (9 < RIN < 10).

2.1.2. PCR quantitative

L'étape de rétrotranscription des ARN totaux en ADN complémentaire (ADNc) est réalisée avec le kit SuperScript® VILO ™ Master Mix à partir de 1 µg d'ARN dans 20 µl de volume final selon les recommandations du fournisseur (11755050, ThermoFisher Scientific).

La PCR quantitative (qPCR) est réalisée en utilisant le Power SYBR Green Master Mix® (4367659, ThermoFisher Scientific) sur le système StepOne Plus Real Time qPCR (Applied Biosystems). Les séquences des amorces utilisées sont données dans le Tableau 2.

L'analyse des données est effectuée avec le logiciel StepOne (Applied Biosystems, v2.3). La normalisation des valeurs est effectuée soit par rapport au gène RPL32 (protéine ribosomale L32) soit par la moyenne géométrique de deux gènes : RPL13a (protéine ribosomale L13a) et YWHAZ (Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophane 5-Monooxygenase). Les -ΔCT sont calculés et utilisés pour l'analyse statistique.

Gene	Forward	Reverse
AIM2	AAACTCAGCCCCTTGGAACA	TGTGTCCTCGTTTCTAACCCC
BTK	TGGATCGATGGGCAGTATCT	AGCTTCCATTCCTGTTCTCCA
CASP1	TGCTGCTACAAAATCTGGGGT	GCTGTCAGAGGTCTTGTGCT
GBP5	CTCGGAAAGGAATACAGGCTG	GCCTGGTCAGTCTGTAAT
GBP6	AGTAAAGGCAAAAGAGGTCT	GCTACTGCCTTCTCTCTATC
GSDMD	CCTCAAGCTCATGGTTCTGG	CCCTGTATCTGCCCATCCAT
IL-1B	CAGCTACGAATCTCCGACCAC	GGCAGGGAACCAGCATCTTC
Nek7	CAGTTCCAACCACAGAAGGC	CACTAAATTGTCCGCGACCA
NLRC5	GCTCTGGTAGGCTGTGGG	ATCTGCAGCCTCCCCATT
NLRP3	ACTGCAAGCTTCAGGTGTTG	TCTGGCTGGAGGTCAGAAGT
P2X7	ACGTTTGCTTTGCTCTGGTG	CCTCTGCTATCCCCTTCACC
RPL13a	CAGGTCCTGGTGCTTGATG	GGCCCAGCAGTACCTGTTTA
RPL32	TTGTGAAGCCCAAGATCG	CCGCCAGTTACGCTTAAT
TXNIP	CCCCTGATTTAATGGCACCTG	TTCGAGCAGAGACAGACACC
YWHAZ	TCAAGAGCAGGGACAATGTTT	ACTCACTGCCTCCCATCATC

Tableau 2 : Séquences des primers utilisés en qPCR

2.1.3. Puces à ADN

Échantillons :

Dans le cadre de mon stage de master 2, j'ai effectué une analyse transcriptomique préliminaire sur des hiPSC différenciées en cardiomyocytes (CM) et en cellules endothéliales (EC) stimulées avec 10 ng/ml d'IFN-γ pendant 72h. À ce moment-là nous ne disposions d'hiPSC que pour une patiente ayant déclaré une myocardite suite au traitement par ICI, et nous avons différencié le clone 1K. Nous avons également différencié des CM et des EC à partir d'un clone hiPSC dérivés d'une personne saine (PS) pour avoir un échantillon contrôle.

J'ai comparé 8 groupes d'échantillons comprenant chacun 3 réplicats biologiques (différenciations indépendantes) : des hiPSC-CM dérivés du clone PS-E-CT6 non stimulés (E-CT6-CM-CTRL) et stimulés par l'IFN-γ (E-CT6-CM-IFN) ; des hiPSC-EC dérivées du clone PS-E-CT6 non stimulées (E-CT6-EC-CTRL) et stimulées par l'IFN-γ (E-CT6-EC-IFN) ; des hiPSC-CM dérivés du clone ICI-M-1K non stimulés (1K-CM-CTRL) et stimulés par l'IFN-γ (1K-CM-IFN) ; des hiPSC-EC dérivées du clone ICI-M-1K non stimulées (1K-EC-CTRL) et stimulées par l'IFN-γ (1K-EC-IFN).

Principe général des puces à ADN :

Une puce à ADN est composée de puits contenant quelques centaines à plusieurs dizaines de milliers d'unités d'hybridation appelées « sondes ». Ces sondes, présentes en excès au niveau des dépôts (spots), sont des fragments d'ADN, ou d'oligonucléotides, correspondant à des séquences exoniques connues et répertoriées dans des bases de données telles que NCBI-Entrez-nucleotide. L'hybridation d'une population d'ARN messager (ARNm) marquée par fluorescence sur une puce, spécifique d'un échantillon biologique donné dans une condition donnée, permet de détecter et de quantifier les variations du niveau d'expression des gènes à l'échelle du génome.

Chaque puits de la puce peut être hybridé avec des populations d'ARNm d'échantillons différents, les variations de niveau d'expression peuvent donc être comparées entre les échantillons.

Lame de verre Agilent ©

Trois puces SurePrint G3 Human Gene Expression v3 8x60K (Agilent Technologies®), comportant chacune huit zones d'hybridation, ont été utilisées. Chaque zone comporte 629 976 dépôts d'oligonucléotides (60 nucléotides) correspondant à 44 782 gènes transcrits dont la séquence est référencée dans la base de données Entrez-nucleotide du NCBI.

Protocole des puces à ADN

Principe général : pour réaliser le marquage, l'hybridation et l'acquisition des données, nous avons suivi le protocole « One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis » (V2_24-03-14) (Agilent Technologies®). L'expérience de microarray est basée sur le principe d'une hybridation non-compétitive, tous les échantillons ont été marqués avec le même fluorochrome.

Marquage, purification et quantification : Une population d'ARN complémentaires (ARNc) marqués est synthétisée à partir des ARN totaux extraits des échantillons. Une solution de « Spike » a été ajoutée aux échantillons : mélange d'ARN de séquences connues, s'hybridant à des dépôts précis présents sur les puces à ADN et servant de contrôle interne à chaque étape du protocole. 200 ng d'ARN total ont été rétrotranscrits en ADN complémentaire (ADNc), par l'enzyme AffinityScript-RT (Agilent Technologies®). Une amplification des ARNc couplée avec

le marquage Cyanine 3 (Cy-3), à partir des ADNc, est faite grâce à l'enzyme T7 RNA polymérase (Agilent Technologies®). Après une étape de purification sur colonne (RNeasy® Mini Kit protocol), la concentration d'ARNc obtenue et le taux d'incorporation de cyanine ont été quantifiés au NanoDrop ND-1000 (Thermo Fischer©).

Hybridation et acquisition des données : 600 ng d'ARNc ont été fragmentés puis utilisés pour l'hybridation. Les échantillons, analysés en triplicat, ont été hybridés sur trois lames de verre. Après 17h d'incubation en rotation à 65 °C, les lames de verre ont été lavées, séchées puis scannées sur un scanner « Agilent Microarray Scanner® ». La fluorescence a été mesurée après excitation à des longueurs d'onde allant de 550 à 610 nm. La visualisation et les intensités mesurées ont été récupérées à l'aide du logiciel « Feature Extraction® ». Les données brutes et les rapports de qualité (QC reports), évaluant la qualité du marquage, de l'hybridation et des lavages par rapport au Spike, ont été enregistrés.

Normalisation des données brutes

La librairie « AgiND », développée pour le diagnostic et la normalisation des puces Agilent, est chargée sur « RStudio ». Cette normalisation diminue l'importance des variations artéfactuelles inter- et intra-puces, pour rendre similaires les distributions d'intensité des puces et les comparer. Les valeurs d'intensité sont transformées en log2, pour obtenir des données symétriques et une distribution proche d'une loi normale puis normalisées par la méthode des quantiles.

Analyse statistique des données normalisées

Les données normalisées ont été filtrées afin de supprimer les sondes contrôles nécessaires pour valider l'hybridation puis d'éliminer le bruit de fond. Seuls les gènes exprimés au-dessus du bruit de fond dans 100% des échantillons ont été conservés, soit 33 766 sondes pour les cardiomyocytes et 31 687 sondes pour les cellules endothéliales. Le logiciel « TMeV » (Tigr MultiExperiment Viewer) a ensuite été utilisé pour effectuer les tests SAM (Significance Analysis of Microarray). Cette méthode basée sur le test de Student permet d'identifier les gènes différentiellement exprimés entre les différents échantillons. Les p-valeurs empiriques ont été calculées après 10 000 permutations.

J'ai appliqué un false discovery rate (FDR) à 0%, 1% et 5%. Après chaque test SAM, un clustering hiérarchique basé sur la corrélation de Pearson a été réalisé sur les échantillons et sur les sondes.

Enrichissement fonctionnel

L'analyse d'enrichissement fonctionnel a été réalisée avec l'outils g:GOSt, disponible sur g:profiler (https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost), qui permet une interprétation biologique de listes de gènes basée sur l'utilisation de termes "GO" (Gene Ontology) ainsi que des voies "KEGG" (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Un calcul d'enrichissement fonctionnel

a été effectué avec le test exact de Fisher puis une correction des tests multiples avec la méthode de Benjamini-Hochberg permettant de sélectionner les termes et voies significatives ($p > 0,05$).

2.2. Étude de l'expression protéique

Toutes les analyses de cytométrie ont été effectuées sur un CytoFlexLX (Beckman Coulter) et les données ont été analysées avec Kaluza Analysis Version 2.1 (Beckman Coulter).

Les images des immunomarquages ont été acquises au microscope Zeiss Axio Observer, et analysées avec le logiciel Zen blue (version 3.7.97.03000).

2.2.1. Caractérisation des hiPSC-CM

Cytométrie en flux :

Aux alentours du jour 30 après le début de la différenciation, les hiPSC-CM sont caractérisés par cytométrie en flux. Les hiPSC-CM sont d'abord marqués avec un marqueur de viabilité en suivant les instructions du kit ViaKrome 808 Fixable viability Dye (C36628, Beckman Coulter). Les cellules sont ensuite fixées et perméabilisées en suivant les instructions du kit ensemble de tampons de coloration des facteurs de transcription eBioscience™ (00-523-00 - ThermoFischer Scientific).

Différents marqueurs ont été analysés : la troponine T2 (TNNT2), la chaîne lourde de la myosine (MYH), les chaînes légères de la myosine atriale (MLC2a) et ventriculaire (MLC2v). Pour chaque marquage, des anticorps isotypiques intracellulaires (REA control (I)) ont été utilisés aux mêmes concentrations que les anticorps spécifiques (Tableau 3).

Cible	Fluorochrome	Dilution	Référence
TNNT2	APC	1 :50	130-120-403
MYH	VioBlue	1 :10	130-106-214
MLC2a	VioBright 515	1 :50	130-129-272
MLC2v	PE	1 :50	130-119-680
REA control (I)	APC	1 :50	130-120-709
	VioBlue	1 :10	130-117-362
	VioBright 515	1 :50	130-109-119
	PE	1 :50	130-118-347

Tableau 3 : Anticorps utilisés pour la caractérisation des hiPSC-CM par cytométrie en flux

Les anticorps spécifiques et isotypiques intracellulaires proviennent tous de chez Miltenyi Biotec, et sont incubés avec les cellules dans le tampon de perméabilisation pendant 1h à 4°C, à l'abri de la lumière. Les cellules sont marquées soit avec un anticorps spécifique, soit avec l'isotype correspondant.

Immunomarquage :

A jour 15 - 20, les hiPSC-CM ont été dissociées et ensemencées sur des lames LabTek 8 chambres recouvertes de Matrigel. A jour 28-30, les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde à 4% (28908, ThermoFisher Scientific) dans du DBPS pendant 15 min à température ambiante (TA), puis perméabilisées avec du Triton-X100 à 0,2% (T8787, Sigma-Aldrich) dans du DPBS pendant 15 min à TA, et bloquées dans de l'albumine de sérum bovin (BSA A9418, Merck) dans du DPBS pendant 60 min à TA. Après lavage, les cellules sont incubées avec des anticorps primaires dirigés contre la troponine T2 (TNNT2) et le marqueur de prolifération Ki67 ou les chaînes légères de la myosine atriales (MLC2a) et ventriculaires (MLC2v) dans une solution de blocage pendant 3h à TA (Tableau 4).

Cible	Anticorps primaires	Dilution	Référence
TNNT2	Monoclonal mouse IgG1	1 :200	MA5-12960, ThermoFisher Scientific
Ki67	Polyclonal rabbit IgG	1 :500	PA5-16785, ThermoFisher Scientific
MLC2a	Monoclonal mouse IgG2b	1 :200	311011 - Synaptic Systems
MLC2v	Polyclonal rabbit IgG	1 :200	10906-1-AP, Proteintech

Tableau 4 : Anticorps primaires utilisés pour la caractérisation des hiPSC-CM par immunomarquage

Les cellules sont ensuite lavées puis incubées avec les anticorps secondaires couplés aux fluorochromes (Tableau 5) pendant 1h à TA et à l'abris de la lumière. Après un lavage, les lames sont montées avec du ProLong™ Gold antifade reagent with DAPI (P36931, ThermoFisher Scientific).

Anticorps secondaire	Fluorochrome	Dilution	Référence
Goat Anti-mouse IgG	Alexa 594	1 :1000	A-11032, ThermoFisher Scientific
Goat Anti-rabbit IgG	Alexa 488	1 :1000	A-11034, ThermoFisher Scientific

Tableau 5 : Anticorps secondaires utilisés pour l'immunomarquage.

2.2.2. Caractérisation des hiPSC-EC

Cytométrie en flux :

Après leur différenciation, les cellules ont été caractérisées à passage 2, 3 et 4 par cytométrie en flux.

Les cellules ont d'abord été marquées avec un marqueur de viabilité en suivant les instructions du kit Viobility 405/452 Fixable Dye (130-130-403, Miltenyi Biotec). Différents marqueurs ont été analysés : CD31 et VE-cadhérine pour identifier les cellules endothéliales, CD105 et CD54 pour les cellules endothéliales vasculaires et CD44 et intégrine-α9 (ITGA9) pour les cellules endothéliales endocardiques. Pour chaque marquage, des anticorps isotypiques de surface (REA control (S)) ont été utilisés aux mêmes concentrations que les anticorps spécifiques. (Tableau 6)

Cible	Fluorochrome	Dilution	Référence
CD31	VioBright 515	1 :50	130-117-232
VE-cadhérine	APC	1 :100	130-125-985
CD105	VioBright R720	1 :400	130-128-381
CD54	PE-vio770	1 :100	130-127-968
CD44	PerCP-vio700	1 :50	130-119-614
ITGA9	PE	1 :88	130-107-128
REA control (S)	VioBright 515	1 :50	130-113-445
	APC	1 :100	130-113-434
	VioBright R720	1 :400	130-127-380
	PE-vio770	1 :100	130-113-441
	PerCP-vio700	1 :50	130-113-441
	PE	1 :88	130-113-438

Tableau 6 : Anticorps utilisés pour la caractérisation des hiPSC-EC par cytométrie en flux

Les anticorps spécifiques et isotypiques proviennent tous de chez Miltenyi Biotec, et sont incubés avec les cellules pendant 15 min à 4°C, à l'abri de la lumière. Les cellules sont marquées soit avec un anticorps spécifique, soit avec l'isotype correspondant.

Immunomarquages :

Les hiPSC-EC à passage 3 sont dissociées et ensemencées sur des lames LabTek 8 chambres. Après 3 jours de culture, les cellules sont fixées, perméabilisées et bloquées selon le même protocole que pour les hiPSC-CM.

Après lavage avec du DPBS, les cellules sont incubées avec des anticorps primaires dirigés contre la VE-cadhérine, CD31, le facteur de Von Willebrand (VWF) et Ki67 (Tableau 7) dans une solution de blocage pendant 3h à TA. Les cellules sont ensuite lavées puis incubées avec les anticorps secondaires couplés aux fluorochromes (même anticorps que pour les hiPSC-CM, Tableau 5) et les lames sont montées selon le même protocole que pour les hiPSC-CM.

Cible	Anticorps primaires	Dilution	Référence
CD31	Polyclonal rabbit IgG	1 :200	11265-1-AP-Proteintech
VE-cadhérine	Monoclonal mouse IgG	1 :100	66804-1-Ig-Proteintech
vWF	Monoclonal mouse IgG	1 :100	Proteintech
Ki67	Polyclonal rabbit IgG	1 :500	PA5-16785, ThermoFisher Scientific

Tableau 7 : Anticorps primaires utilisés pour la caractérisation des hiPSC-EC par immunomarquage

2.2.3. Caractérisation de récepteurs associés à l'inflammation

Les cellules ont été marquées avec un marqueur de viabilité (hiPSC-CM : ViaKrome 808 Fixable viability Dye et hiPSC-EC : Viobility 405/452 Fixable Dye) en suivant les informations des fournisseurs. Les cellules ont ensuite été marquées avec des anticorps dirigés contre différents récepteurs membranaires liés à l'inflammation ont été analysés : PD-L1 (CD274), MHC-I (HLA-ABC), MHC-II (HLA-DR). Pour chaque marquage, des anticorps isotypiques de surface (REA control (S)) ont été utilisés aux mêmes concentrations que les anticorps spécifiques (Tableau 8). Tous ces anticorps spécifiques ou isotypiques de surface proviennent de chez Miltenyi Biotec, et sont incubés avec les cellules pendant 15 min à 4°C, à l'abri de la lumière. Les cellules sont marquées soit avec un anticorps spécifique, soit avec l'isotype correspondant.

Cible	Fluorochrome	Dilution	Référence
PD-L1	PE-Vio615	1 :50	130-122-811
MHC-I	APC-Vio770	1 :100	130-120-570
MHC-II	VioGreen	1 :50	130-111-795
TLR3	Brillant violet	1 :25	315008, Biolegend
REA control (S)	PE-Vio615	1 :50	130-113-439
	APC-Vio770	1 :100	130-113-435
	VioGreen	1 :50	130-113-444
Mouse IgG2a	Brillant Violet	1 :50	400163, Biolegend

Tableau 8 : Anticorps utilisés pour la caractérisation de récepteurs associés à l'inflammation dans les hiPSC-CM et hiPSC-EC par cytométrie en flux

En plus de PD-L1, MHC-I et MHC-II, les hiPSC-CM sont marquées avec un anticorps dirigé contre le récepteur intracellulaire TLR3 ou l'anticorps isotypique (Tableau 8). Le protocole de fixation et de perméabilisation utilisé est le même que celui utilisé pour la caractérisation de la structure des hiPSC-CM détaillé précédemment.

L'analyse de l'expression des récepteurs liés à l'inflammation est réalisée sur les populations d'hiPSC-CM exprimant la TNNT2 > 80 %, et les populations d'hiPSC-EC co-exprimant CD31 et la VE-cadhérine > 80%.

2.3. Analyse statistique

Les différences significatives entre les groupes sont calculées en utilisant, en fonction des expériences, le test ANOVA à 1 ou 2 facteurs, suivi en cas de significativité, d'un test post-hoc de comparaisons multiples de Tukey, à l'aide du logiciel Graphpad Prism (Graphpad Prism 9.0). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± déviation standard (SD) comme indiqué sur chaque figure. Une valeur de $p < 0,05$ est considérée comme statistiquement significative.

Résultats

Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé de manière séquentielle en raison des contraintes inhérentes à la génération des clones de cellules souches pluripotentes induites (hiPSC) et aux spécificités de la pathologie étudiée. La myocardite immuno-médiée post-ICI est une maladie peu fréquente, moins de 2 % des patients sous ICI, ce qui limite l'accès aux échantillons biologiques. En plus du faible nombre de patients atteints, le refus de certains patients à signer le consentement et le temps requis pour générer les clones hiPSC ont représenté des contraintes majeures, avec lesquelles il a fallu composer tout au long de cette thèse. De fait, les travaux ont été réalisés de manière non linéaire, selon les disponibilités des clones.

La première partie des résultats compile l'analyse de tous les clones générés au fur et à mesure des inclusions de patients. Ce travail a permis de valider les modèles de cardiomyocytes (hiPSC-CM) et de cellules endothéliales (hiPSC-EC) utilisés dans la suite de l'étude. La deuxième partie se concentre sur deux clones disponibles au début de ma thèse : un clone issu d'un donneur sain (clone Sain) et un autre d'une patiente ayant développé une myocardite post-ICI (ICI-M). Ces travaux, amorcés lors de mon stage de Master 2, ont constitué une première exploration des différences, entre clones issus d'un donneur sain et d'une patiente ICI-M, des réponses des hiPSC-CM et des hiPSC-EC après traitement par l'IFN-γ. La troisième, démarrée en parallèle de la seconde partie et rédigée sous forme d'un pré-article, documente la réponse aux cytokines inflammatoires dont l'IFN-γ, des EC et CM dérivés des hiPSC du donneur sain. La quatrième partie examine les résultats obtenus à partir de l'ensemble des clones générés chez les patients, ce qui explique que cette partie reste incomplète. Ces clones ICI-M et Non-ICI-M (n'ayant pas déclaré de myocardite post-ICI) ont été comparés au clone Sain. Cependant, il est important de souligner qu'un seul clone sain ne suffit pas à constituer un véritable groupe contrôle. L'obtention et l'analyse d'autres clones sains seront nécessaires pour renforcer la robustesse des comparaisons et des conclusions.

1. Établissement et caractérisation des modèles cellulaires, cardiomyocytaire et endothélial, différenciés de cellules souches humaines pluripotentes induites

1.1. Origine et nature des clones

Pour étudier les mécanismes de la myocardite induite par les immunothérapies de type inhibiteurs de point de contrôle immunitaire (ICI) au niveau cellulaire, j'ai choisi de travailler avec différents groupes de clones hiPSC. Pour cela, j'ai utilisé des échantillons provenant de patients suivis au centre de cardio-oncologie de l'Hôpital Nord de Marseille et inclus dans la cohorte gMEDICO. Cette cohorte prospective a pour but de suivre au niveau cardiologique des patients avant et pendant leur traitement anticancéreux, qu'ils développent ou non une toxicité cardiaque. Comme mentionné dans la partie 4.4.1. du Chapitre Introduction, le diagnostic clinique est basé sur un système de score diagnostique représentant l'association d'une élévation du taux de troponine circulante avec un critère majeur ou deux critères mineurs. En nous basant sur ce score diagnostic qui confirmait ou infirmait la myocardite immuno-médiée, nous avons sélectionné des échantillons afin de constituer deux groupes : le premier regroupe des patients ayant déclaré une myocardite dans les premières semaines suivant le début du traitement par ICI (ICI-M) et le second regroupe des patients n'ayant pas déclaré de myocardite induite par les ICI (Non-ICI-M). Nous avons fait le choix de sélectionner uniquement des patients traités pour un mélanome afin de minimiser l'impact de différents cancers sur nos résultats. Cependant, cette pathologie étant rare et pour pouvoir démarrer nos travaux, nous avons généré des clones sur la première patiente incluse dans notre cohorte gMEDICO, traitée pour un carcinome pulmonaire (Tableau 9). Enfin, bien que la littérature ne décrive pas une prévalence de sexe claire dans le développement des myocardites induites par les ICI, la cohorte gMEDICO est composée de 67% d'hommes contre 33% de femmes. Pour générer les clones hiPSC, nous avons sélectionné les patients présentant un tableau clinique très caractéristique de la myocardite immuno-médiée (associée ou non à d'autres toxicité dont la myosite ou la myasthénie), sans tenir compte du sexe.

Le groupe ICI-M est composé de six clones provenant de 3 patients (Tableau 9) :

- 2019_F_89_C001 : 2 clones, 1C et 1K, ont été générés à partir de fibroblastes cutanés, prélevés chez une femme de 89 ans ayant déclaré une myocardite et une myosite suite au traitement par anti-PD-1 administré contre un carcinome pulmonaire. Cette patiente a reçu une corticothérapie et est décédée.

- 2019_M_70_C009 : 2 clones ont été générés à partir de fibroblastes cutanés, prélevés chez un homme de 70 ans ayant déclaré une myocardite, une myasthénie et une myosite, suite au traitement par trithérapie anti-PD-1, anti-CTLA-4 et anti-LAG-3 administré contre un mélanome. Le patient était également traité pour un diabète et de l'hypertension artérielle avant l'administration de l'immunothérapie. Ce patient a reçu une corticothérapie et est décédé des suites de la myasthénie.

- 2021_M_87_C025 : 2 clones ont été générés à partir de PBMC, prélevés chez un homme de 87 ans ayant déclaré une myocardite, une myasthénie et un passage en fibrillation atriale, suite au traitement par thérapie anti-PD-1 administré contre un mélanome. Le patient était également traité pour de l'hypertension artérielle avant l'administration de l'immunothérapie. Ce patient a reçu une corticothérapie et est décédé.

Le groupe Non-ICI-M est composé de six clones provenant de 3 patients (Tableau 9) :

- 2019_M_41_pré_004 : 2 clones ont été générés à partir de PBMC, prélevés chez un homme de 41 ans n'ayant pas déclaré de toxicité cardiaque suite au traitement par bithérapie anti-PD-1 / anti-CTLA-4 administré contre un mélanome. Le seul effet secondaire au traitement a été un vitiligo. Ce patient est aujourd'hui en rémission.

- 2019_M_73_pré_011 : 2 clones ont été générés à partir de PBMC, prélevés chez un homme de 73 ans n'ayant pas déclaré de toxicité cardiaque suite au traitement par bithérapie anti-PD-1 / anti-CTLA-4 administré contre un mélanome. Une toxicité neurologique ainsi qu'une augmentation de la troponine non associée à une myocardite ont été observée comme effets secondaires au traitement.

- 2020_M_78_pré_018 : 2 clones ont été générés à partir de PBMC, prélevés chez un homme de 78 ans n'ayant pas déclaré de toxicité cardiaque suite au traitement par thérapie anti-PD-1 administré contre un mélanome. Le seul effet secondaire au traitement est dermatologique. Le patient présentait une hypertension artérielle avant l'administration de l'immunothérapie.

Le clone sain (Tableau 9) :

- E-CT6 : clone provenant d'un homme de 69 ans, sans cancer, ni maladie cardiovasculaire, ou autre maladie déclarée au moment du prélèvement (personne saine). Ce clone a été caractérisé et déposé par le NIGMS (National Institue of Genetic Medical Sciences) dans une banque de cellules humaines utilisées par la recherche. Plusieurs études ont été publiées avec ce clone (Loo et al 2020, Bersini et al 2020, Fleisher et al 2018).

Les fibroblastes d'origine cutanée ou les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) des patients ont été reprogrammés en cellules souches pluripotentes induites (hiPSC) par la plateforme MaCS (MMG, Marseille). Le tableau 9 ci-dessous résume les caractéristiques principales des donneurs inclus dans cette étude.

Donneur		Sexe	Age	Cancer	Traitement	Effets secondaires	Tissu utilisé pour la reprogrammation	Clones
Sain		M	69	-	-	-	Fibroblastes cutanés	E-CT6
Non-ICI-M	2019_M_41_pré_004	M	41	Mélanome	Anti-PD-1 Anti-CTLA-4	Sans myocardite ou autre effet secondaire	PBMC	3D et 3M
	2019_M_73_pré_011	M	73	Mélanome	Anti-PD-1 Anti-CTLA-4	Sans myocardite mais élévation de la troponine et neurotoxicité associée	PBMC	5B et 5I
	2020_M_78_pré_018	M	78	Mélanome	Anti-PD-1	Sans myocardite mais complications dermatologiques	PBMC	6F et 6G
ICI-M	2019_F_89_C_001	F	89	Carcinome pulmonaire	Anti-PD-1	Myocardite avérée et myosite	Fibroblastes cutanés	1C et 1K
	2019_M_70_C_009	M	70	Mélanome	Anti-PD-1 Anti-CTLA-4 Anti-LAG-3	Myocardite avérée et myasthénie	Fibroblastes cutanés	4A et 4E
	2021_M_87_C_025	M	87	Mélanome	Anti-PD-1	Myocardite avérée et myosite	PBMC	7E et 7L

Tableau 9 : Description des donneurs à l'origine des clones hiPSC
Nous disposons de 3 types d'échantillons : le clone Sain (1 seul clone hiPSC provenant d'un donneur sain), et les clones des deux groupes de patients de la cohorte gMEDICO ayant (ICI-M) ou non (Non-ICI-M) déclaré une myocardite suite à un traitement par ICI (composés chacun de 6 clones hiPSC, provenant de 3 patients).

La qualité des clones hiPSC générés a été vérifiée dans un premier temps par cytométrie en flux pour évaluer leur état de pluripotence. Au moins 80 % de chacun des clones testés expriment les marqueurs de pluripotence (OCT3-4, SOX2 et NANOG) (Tableau 10). Des corps embryoïdes ont été réalisés pour contrôler la capacité de différenciation des hiPSC pour chacun des feuillets de développement et l'expression des gènes spécifiques a été recherchée par qPCR. Une fois différenciés en corps embryoïdes, les gènes de pluripotence (OCT4, NANOG, SOX2, LIN28, ZFP42 et DNMT3B) ne sont plus exprimés et l'ensemble des corps embryoïdes expriment au moins un des deux marqueurs sélectionnés pour chacun des feuillets : ectoderme (ALDHA1 et NCAM), mésoderme (BRACHYURY et COL2A1) et endoderme (FOXA2 et AFP) (Tableau 10). Enfin, un caryotype a été effectué pour chaque clone afin de vérifier l'absence de remaniement chromosomique.

Clones		Cytométrie en flux sur les clones hiPSC			Gènes spécifiques testés par RT-qPCR sur les corps embryoïdes			
		OCT3-4	SOX2	NANOG	Pluripotence	Ectoderme	Mésoderme	Endoderme
Non-ICI-M	3D	92,6 %	96,5 %	93,5 %	-	+	+	+ (1/2)
	3M	89 %	93,3 %	82,5 %	-	+	+ (1/2)	+
	5B	82,7 %	88,29 %	82,76 %	-	+	+	+
	5I	81,9 %	89,4 %	72,1 %	-	+	+	+
	6F	95,87 %	97,5 %	91,28 %	-	+	+	+
	6G	94,71 %	97,25 %	90,38 %	-	+	+	+
ICI-M	1C	83,5 %	94,8 %	92,6 %	-	+	+	+
	1K	87,6 %	86,9 %	88,2 %	-	+	+	+
	4A	91,2 %	94,8 %	90,5 %	-	+ (1/2)	+ (1/2)	+
	4E	93 %	93 %	83 %	-	+ (1/2)	+ (1/2)	+
	7E	97,1 %	98,01 %	96,57 %	-	+	+	+
	7L	91,11 %	92,01 %	85,24 %	-	+	+	+

Tableau 10 : Contrôle qualité des clones hiPSC dérivés à partir des échantillons de patients de la cohorte gMEDICO

La pluripotence est vérifiée grâce au pourcentage d'expression des facteurs de transcription impliqués dans la pluripotence, OCT3-4, SOX2 et NANOG. La capacité de différenciation est contrôlée par RT-qPCR en quantifiant l'expression de gènes de pluripotence (OCT4, NANOG, SOX2, LIN28, ZFP42 et DNMT3B) et des gènes spécifiques de chacun des trois feuillets de développement (ectoderme (ALDHA1 et NCAM), mésoderme (BRACHYURY et COL2A1) et endoderme (FOXA2 et AFP)). + : expression des deux marqueurs ; - : pas d'expression des deux marqueurs ; + (1/2) : expression d'un seul des deux marqueurs.

1.2. Caractérisation morphologique et moléculaire des hiPSC-CM

Comme détaillé dans l'introduction, il existe une grande variabilité entre les clones hiPSC, même lorsqu'ils sont dérivés d'un même donneur (Yun et *al.*, 2024). Ces variations concernent des aspects cruciaux comme la différenciation cellulaire, la morphologie et l'expression génique. L'utilisation de protocoles non standardisés pour la différenciation peut augmenter cette variabilité (Volpato & Webber, 2020). Afin de limiter les causes possibles de variabilité au cours de la différenciation des hiPSC en cardiomyocytes (hiSPC-CM), nous avons utilisé des kits de différenciation développés par la société STEMCELL™ Technologies, nous permettant d'utiliser des milieux standardisés et contrôlés (Figure 26.A). La méthode d'obtention des hiPSC-CM est décrite dans la partie Matériel et Méthodes (Section 1.2).

Entre 8 et 10 jours après le début de la différenciation, nous observons des battements, en moyenne 33 ± 7 battements par minute (bpm) (n=9 puits provenant de n=3 différenciations du clone Sain (E-CT6)). Une purification métabolique est réalisée uniquement lorsque les cultures présentent des zones de cellules non différenciées en cardiomyocytes, visibles au

microscope. Ces zones non différenciées ne battent pas, et la morphologie des cellules est différente de celle des cardiomyocytes. La purification métabolique repose sur le fait que seuls les cardiomyocytes sont capables d'adapter leur métabolisme, passant d'un métabolisme glycolytique à un métabolisme oxydatif utilisant le lactate comme principale source d'énergie. En modifiant le milieu de culture pour remplacer le glucose par du lactate, les cellules non différenciées, incapables de s'adapter à ces conditions, entrent en apoptose et meurent. Ce processus permet ainsi de purifier la culture en conservant uniquement les cardiomyocytes différenciés. Ces zones non différenciées ont été principalement retrouvées dans les hiPSC-CM différenciées à partir des clones de patients. (Figure 26. A)

Dans les cultures d'hiPSC-CM, nous voyons que les cardiomyocytes exprimant la troponine T (TNNT2) ont un aspect strié, révélant la mise en place des sarcomères. De plus, le marqueur de prolifération Ki67 (protéine nucléaire Ki67 présente uniquement dans les cellules qui se divisent activement) est quant à lui exprimé dans très peu de cellules, ce qui indique que les cellules différenciées en cardiomyocytes ne prolifèrent plus (Figure 26.B). Sur ces immunomarquages, nous observons que les hiPSC-CM expriment les chaînes légères de la myosine, atriale (MLC2a) ou ventriculaire (MLC2v), ou les deux isoformes (Figure 26.C). Les résultats présentés ont été réalisés sur une différenciation du clone Sain en cardiomyocytes mais ils sont représentatifs de l'ensemble des clones.

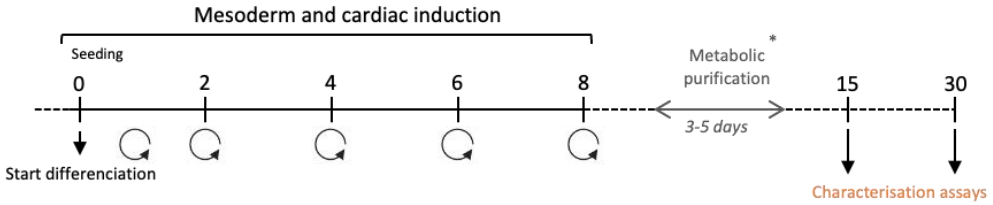
Quinze jours après le début de la différenciation, les cellules sont dissociées et remises en culture sur différents supports de culture qui serviront à réaliser l'ensemble des expériences (caractérisation et traitement par l'IFN-γ) sur chacune des différenciations. Une partie des cellules est utilisée pour effectuer un premier contrôle qualité de la différenciation en quantifiant par cytométrie en flux l'expression de la troponine T2. Dans nos conditions, 80 ± 16 % des hiPSC-CM expriment TNNT2. De même, après 28-35 jours de différenciation, les hiPSC-CM battent en moyenne à 15 ± 4 bpm (n=9 puits provenant de 2 différenciations indépendantes du clone Sain). Le syncytium formé par les hiPSC-CM au cours de la différenciation est complètement désorganisé lors du passage et du réensemencement des cellules au jour 15, ce qui explique la diminution de la fréquence des battements observés dans les cultures. Les hiPSC-CM sont à nouveau étudiés par cytométrie en flux afin de caractériser les sous-populations de cardiomyocytes, en quantifiant notamment la chaîne lourde de la myosine (MYH) ainsi que ses chaînes légères atriale, MLC2a, et ventriculaire, MLC2v (Figure 26.F). Pour l'ensemble des différenciations de chacun des clones (clones Sain, Non-ICI-M et ICI-M), on observe que 80 ± 16 % des hiPSC-CM expriment TNNT2 et 77 ± 16 % des hiPSC-CM co-expriment TNNT2 et MYH. À partir de cette population de cardiomyocytes ($TNNT2^+/MYH^+$), nous avons recherché les sous-populations atriales et/ou ventriculaires : 54 ± 19 % des hiPSC-CM co-expriment MLC2a ($TNNT2^+/MYH^+/MLC2a^+$) contre 52 ± 26 % qui co-expriment MLC2v ($TNNT2^+/MYH^+/MLC2v^+$). De plus, 39 ± 24 % des hiPSC-CM co-expriment les deux isoformes de la chaîne légère de la myosine. On observe de l'hétérogénéité dans le pourcentage de ces sous-populations atriales ou ventriculaires, et notamment pour l'expression de MLC2v qui est significativement moins exprimée dans le clone Sain que dans

les clones des groupes Non-ICI-M et ICI-M ($p < 0,01$ et $p < 0,0001$ respectivement). On observe également plus de cellules exprimant les deux isoformes de la chaîne légère de la myosine dans les clones Non-ICI-M et ICI-M que dans le clone E-CT6 (Sain) ($p < 0,05$ et $p < 0,01$ respectivement).

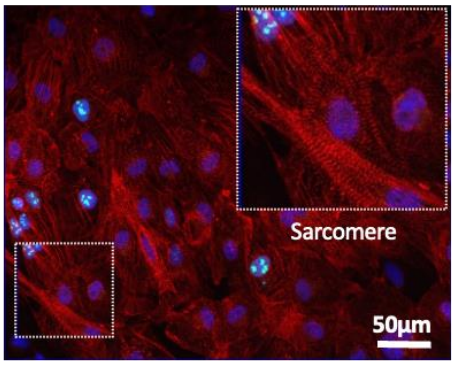
Cependant, pour certaines différenciations, si on observe que toutes les cellules expriment la troponine T2, on distingue deux populations : une population qui exprime faiblement TNNT2, et une population qui exprime fortement TNNT2 (Figure 27). Lorsque les hiPSC sont correctement différenciées en cardiomyocytes (battements qui apparaissent en 8-9 jours après le début de la différenciation), la majorité des cellules expriment fortement la TNNT2 (environ 90 % avec une Mean Fluorescence Intensity, MFI, de 489 718, en bleu), et elles co-expriment MLC2a (56 %, en bleu) et/ou MLC2v (6 % et 1% respectivement, en bleu) (Figure 27.A). Lorsque le processus de différenciation est moins efficace (apparition tardive des battements), on observe deux populations de cellules qui expriment TNNT2 (Figure 27.B). L'analyse de ces sous-populations d'hiPSC-CM montre que les cellules qui expriment faiblement TNNT2 (66 % avec une MFI de 8529, en vert) n'expriment pas MLC2a et très faiblement MLC2v (12 %, en vert) *vs* les cellules qui expriment fortement TNNT2 (29 % avec une MFI de 1 312 113, en bleu) expriment principalement MLC2a (environ 16 %, en bleu) (Figure 27.B). Ces sous-populations sont également observées dans les cultures pour lesquelles nous avons réalisé des purifications métaboliques, ce qui nous permet de dire que ce sont bien des cardiomyocytes, même si ces cellules expriment faiblement la TNNT2, car ils ont pu adapter leur métabolisme au changement du glucose par le lactate, mais que la différenciation n'a pas été efficace. Grâce à ce travail de caractérisation, j'ai défini des critères de différenciation et, pour la suite de mes travaux, je n'ai utilisé que les différenciations où l'expression de TNNT2 était élevée dans au moins 80 % des hiPSC-CM.

En résumé, j'ai établi des conditions expérimentales permettant d'obtenir des cultures de cardiomyocytes différenciés à partir de clones hiPSC pour lesquelles on observe des battements réguliers et spontanés. Ces hiPSC-CM expriment différents marqueurs cardiomyocytaires spécifiques (TNNT2 / MYH / MLC2a et MLC2v), cela quel que soit le clone hiPSC étudié. J'ai établi des critères de sélection des différenciations (apparition des battements au 8ème jour de différenciation et au moins 80% des cellules expriment fortement TNNT2 à jour 30) qui, s'ils ne sont pas atteints, me permettent d'écarter les cultures de cellules jugées mal ou peu différenciées. De plus, le marquage de la troponine T2 montre l'organisation des sarcomères et celui de la myosine, exprimée dans de nombreuses cellules, témoigne du bon état de maturation des hiPSC-CM. Cependant, nous avons remarqué que nous avons majoritairement des cardiomyocytes de type atriaux, contrairement à ce que nous laissait supposer le kit de différenciation de ce fournisseur.

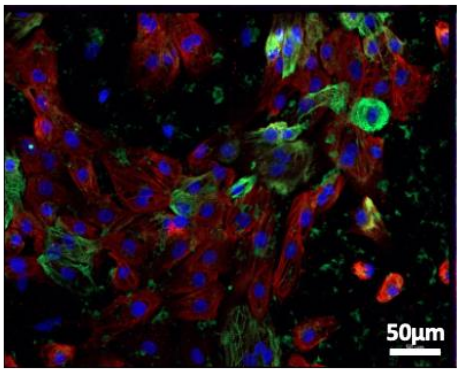
A



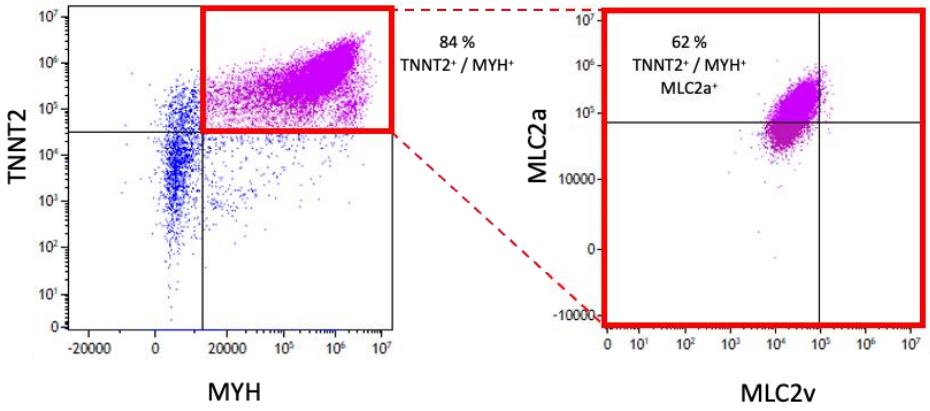
B TNNT2 Ki67 DAPI



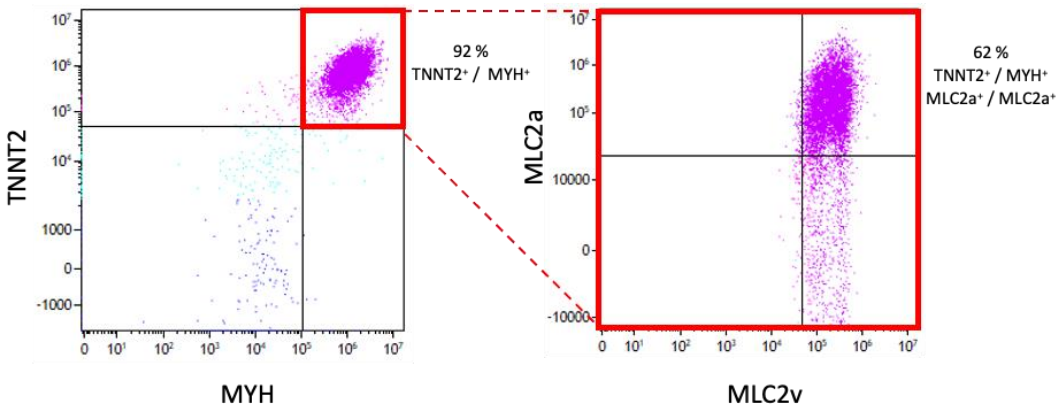
C MLC2a MLC2v DAPI



D hiPSC-CM – E-CT6 – D30



E hiPSC-CM – 3D – D30



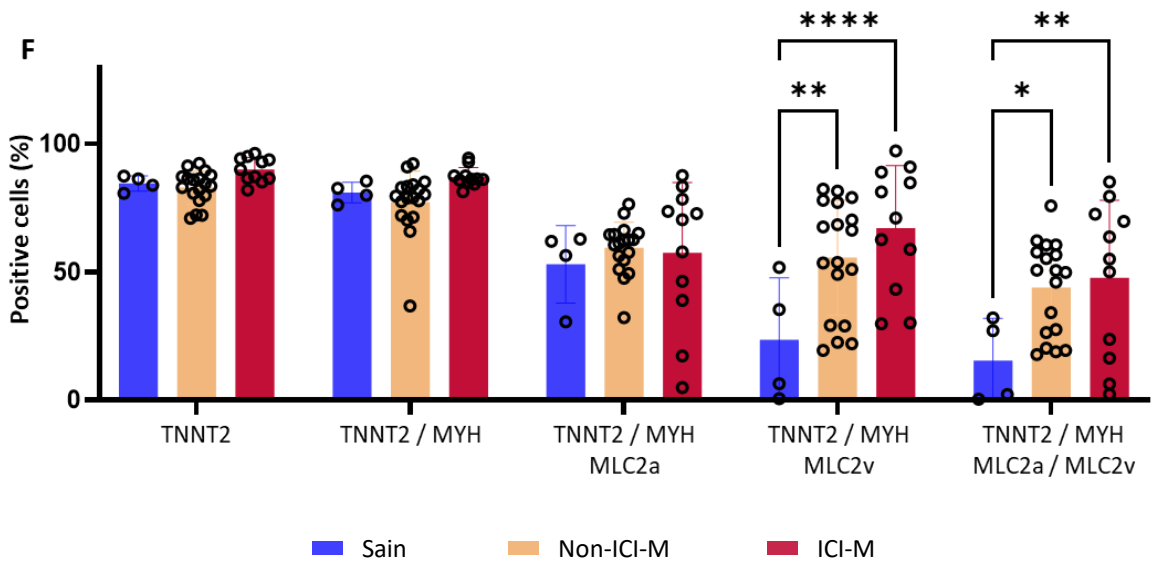


Figure 26 : Caractérisation des hiPSC différenciées en cardiomyocytes

(A) Protocole de différenciation et d'utilisation des hiPSC-CM. Les flèches circulaires représentent les changements de milieux. Pour les hiPSC-CM avec de nombreuses zones de cellules non différenciées, une étape de purification métabolique de 3 à 5 jours est réalisée avant la dissociation. Après 15 jours de différenciation, les cellules sont dissociées pour caractérisation et/ou remise en culture sur différents supports. **(B)** et **(C)** Immunomarquages d'hiPSC-CM différenciés à partir du clone Sain montrant que la majorité des cellules expriment TNNT2 et présentent une organisation en sarcomères **(B)**. Les chaînes légères atriales (MLC2a) et ventriculaires (MLC2v) de la myosine sont également exprimées dans un grand nombre de cellules **(C)** tandis que Ki67 est exprimé dans très peu de noyaux **(B)**. Les images sont réalisées avec un grossissement x10. **(D)** et **(E)** Exemples des processus d'analyse par cytométrie en flux pour une différenciation du clone Sain **(D)**, et une différenciation du clone 3D (Non-ICI-M) **(E)**. **(F)** Pourcentage de cellules exprimant les différents marqueurs spécifiques des cardiomyocytes, ce qui permet de définir des sous-populations : 77 ± 16 % des hiPSC-CM de chacun des clones (Sain, Non-ICI-M et ICI-M) co-expriment la troponine T2 et la chaîne lourde de la myosine (MYH). Au sein de cette population ($TNNT2^+/MYH^+$), 54 ± 19 % des hiPSC-CM expriment la chaîne légère de la myosine atriale (MLC2a) et 52 ± 26 % des hiPSC-CM expriment la chaîne légère de la myosine ventriculaire (MLC2v). Par ailleurs, 39 ± 24 % des cellules co-expriment les 4 marqueurs ($TNNT2^+/MYH^+/MLC2a^+/MLC2v^+$). Une analyse ANOVA à deux facteurs suivie d'un test de Tukey pour effectuer les corrections multiples a été réalisée afin de comparer les niveaux d'expression entre les différenciations. Les hiPSC-CM différenciés à partir du clone Sain expriment moins MLC2v comparé aux hiPSC-CM des clones Non-ICI-M et ICI-M ($p < 0,01$ et $p < 0,0001$ respectivement). De ce fait, la co-expression des 4 marqueurs est plus importante dans les hiPSC-CM des groupes Non-ICI-M et ICI-M que dans le clone Sain ($p < 0,05$ et $p < 0,01$ respectivement). Les expériences de cytométrie sont fondées sur : n=2 différenciations du clone Sain, n=9 différenciations issues de 3 clones (3-4 différenciations / clone) du groupe Non-ICI-M et n=6 différenciations issues de 3 clones (1-3 différenciations / clone) du groupe ICI-M.

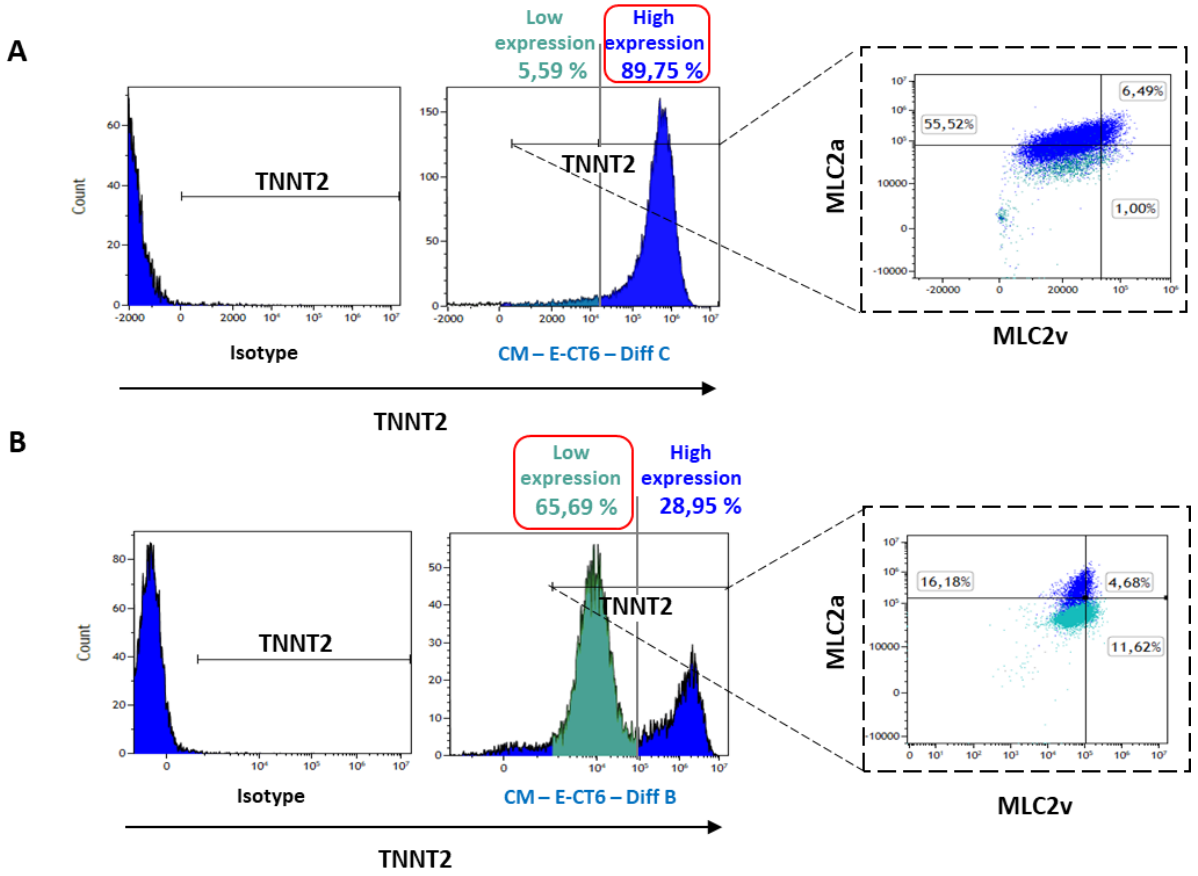


Figure 27 : Évaluation de la qualité de la différenciation d'hiPSC en cardiomyocyte

(A) et **(B)** Exemples d'analyse de sous-populations d'hiPSC-CM. **(A)** Différenciation C du clone hiPSC Sain (E-CT6) en cardiomyocytes : on observe une population majoritaire (bleu : 90 %) qui exprime fortement TNNT2, 55 % des cellules exprimant MLC2a, et 6,5 % des cellules co-exprimant MLC2a et MLC2v. **(B)** Différenciation B du clone hiPSC Sain (E-CT6) en cardiomyocytes : on observe deux populations : une qui exprime faiblement TNNT2 (vert : 66 %) et une qui exprime fortement TNNT2 (bleu : 29 %), les cellules exprimant MLC2a (bleu : 16 %) étant celles qui expriment fortement TNNT2. On observe ici l'hétérogénéité entre deux différenciations indépendantes du clone Sain (E-CT6).

1.3. Caractéristique morphologique et moléculaire des hiPSC-EC

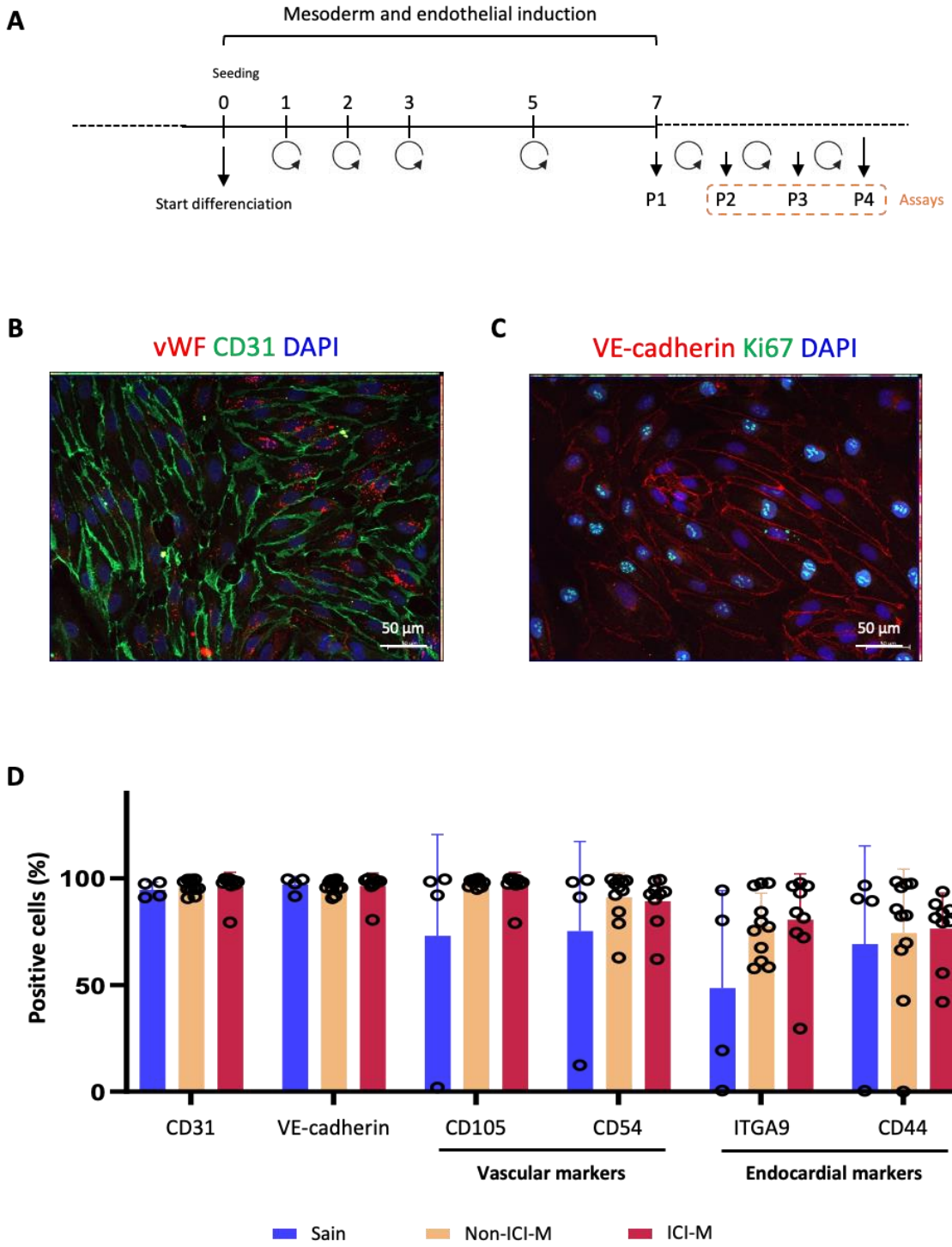
Comme pour les cardiomyocytes, afin de limiter au maximum les sources de variations au cours de la différenciation d'hiPSC en cellules endothéliales (hiPSC-EC), nous avons utilisé des kits de différenciation développés par la société STEMCELL™ Technologies (Figure 28.A). La méthode d'obtention des hiPSC-EC est décrite dans la partie Matériel et Méthodes (Section 1.3).

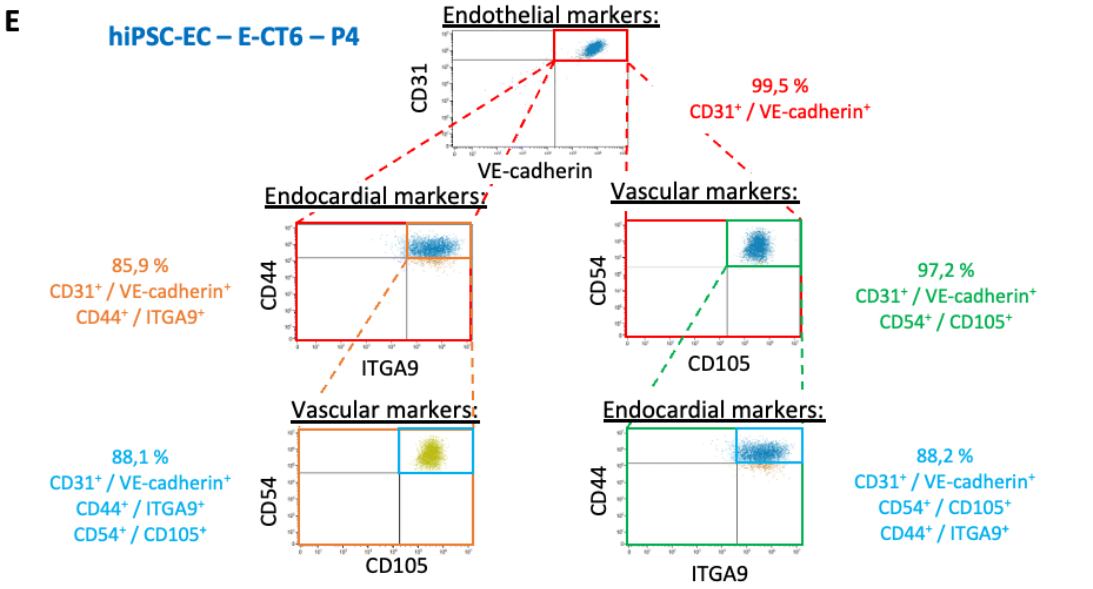
La morphologie et l'organisation des cellules hiPSC-EC dans les cultures ont été caractérisées par immunomarquage au 4ème passage. Les résultats présentés ci-dessous ont été obtenus à partir d'une différenciation du clone E-CT6 (Sain) en hiPSC-EC et sont représentatifs de l'ensemble des différenciations effectuées, quel que soit l'origine du clone. Les protéines membranaires platelet and endothelial cell adhesion molecule 1 (CD31/PECAM1) et VE-cadhérine sont fortement exprimées au niveau des membranes plasmiques cellulaires. Leur marquage montre l'organisation en réseau des hiPSC-EC. Au niveau intracellulaire, on observe autour des noyaux le facteur de von Willebrand (vWF). Ce facteur est stocké dans les corps de Weibel-Palade qui sont spécifiquement localisés dans les cellules endothéliales vasculaires où il joue un rôle dans la coagulation. Au niveau des noyaux, on observe également l'expression de la protéine nucléaire Ki67 présente uniquement dans les cellules qui se divisent activement. (Figure 28.B et 28.C)

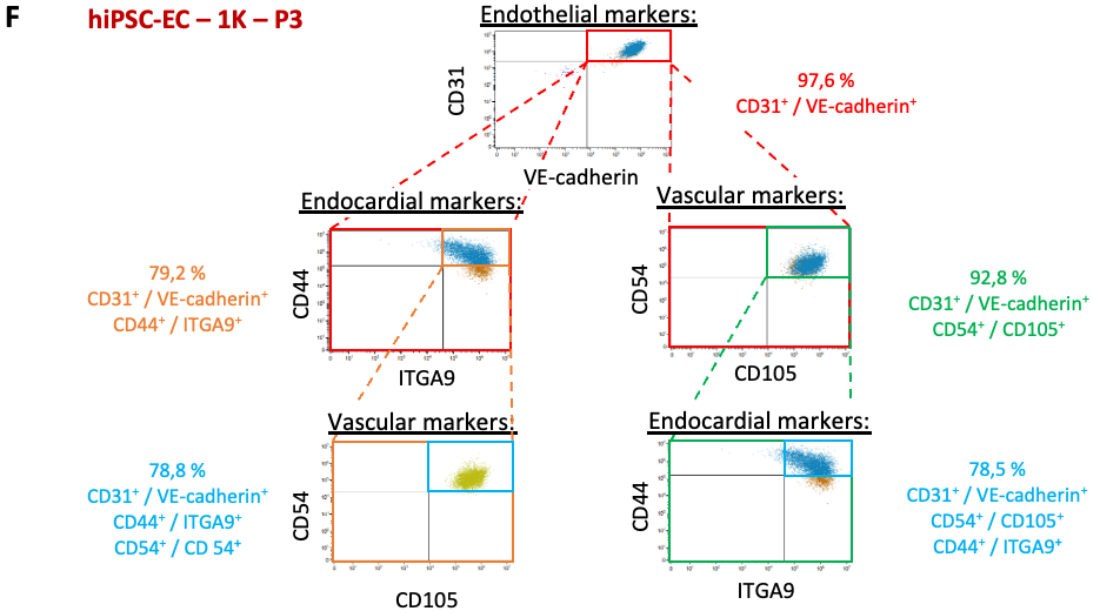
Pour caractériser la qualité des hiPSC-EC obtenues, j'ai quantifié par cytométrie en flux, dès la fin du protocole de différenciation (du 2ème au 4ème passage), l'expression de deux marqueurs spécifiques des cellules endothéliales : CD31 et VE-cadhérine. Sur la base de ce critère, tous les essais de différenciation montrent que les hiPSC-EC expriment CD31 (96 ± 5 %) et la VE-cadhérine (96 ± 4 %), cela quel que soit le clone étudié (Figure 28.D). Nous concluons de l'ensemble de ces résultats que la méthode de différenciation des hiPSC en cellules endothéliales est efficace.

Pour approfondir la caractérisation des hiPSC-EC de chacune des différenciations, j'ai également quantifié l'expression de marqueurs spécifiques vasculaires (CD105 (endogline) et CD54 (présent dans les capillaires sanguins)) ou endocardiques (ITGA9 (intégrine-α-9) et CD44 (présent dans la valve aortique)). Les hiPSC-EC expriment très fortement les marqueurs vasculaires (93 ± 20 % exprimant CD105 et 88 ± 19 % exprimant CD54) *vs* les marqueurs endocardiques qui sont exprimés par une plus faible proportion de cellules (74 ± 26 % exprimant ITGA9 et 74 ± 28 % exprimant CD44). Le profil des cellules endothéliales différenciées à partir d'hiPSC semble être légèrement plus vasculaire qu'endocardique. (Figure 28.D)

Pour identifier des sous-populations de cellules endothéliales ($CD31^+$/$VE\text{-}cadhérine^+$), j'ai recherché la co-expression des marqueurs soit vasculaires, soit endocardiques, soit de l'ensemble des marqueurs testés. Les marqueurs vasculaires sont plus fortement exprimés par les hiPSC-EC (85 ± 25 % co-expriment CD105 et CD54) que les marqueurs endocardiques (56 ± 26 % co-expriment ITGA9 et CD44). L'ensemble des 6 marqueurs est co-exprimé dans 54 ± 26 % des hiPSC-EC, reflétant le caractère immature de ces différenciations. Une analyse ANOVA à deux facteurs a été réalisée afin de comparer les niveaux d'expression et il n'y a pas de différence significative d'expression entre les différents clones hiPSC (Sain, ICI-M et Non-ICI-M). (Figure 28.G)


A
Mesoderm and endothelial induction
Seeding
0
1
2
3
5
7
Start differenciation
P1
P2
P3
P4
Assays
B
vWF CD31 DAPI
50 µm
C
VE-cadherin Ki67 DAPI
50 µm
D
Positive cells (%)
100
50
0
CD31
VE-cadherin
CD105
CD54
ITGA9
CD44
Vascular markers
Endocardial markers
Sain
Non-ICI-M
ICI-M


E
hiPSC-EC – E-CT6 – P4
Endothelial markers:
CD31
VE-cadherin
99,5 %
CD31⁺ / VE-cadherin⁺
Endocardial markers:
85,9 %
CD31⁺ / VE-cadherin⁺
CD44⁺ / ITGA9⁺
CD44
ITGA9
Vascular markers:
CD54
CD105
97,2 %
CD31⁺ / VE-cadherin⁺
CD54⁺ / CD105⁺
Vascular markers:
88,1 %
CD31⁺ / VE-cadherin⁺
CD44⁺ / ITGA9⁺
CD54⁺ / CD105⁺
CD54
CD105
Endocardial markers:
CD44
ITGA9
88,2 %
CD31⁺ / VE-cadherin⁺
CD54⁺ / CD105⁺
CD44⁺ / ITGA9⁺


F
hiPSC-EC – 1K – P3
Endothelial markers:
CD31
VE-cadherin
97,6 %
CD31⁺ / VE-cadherin⁺
Endocardial markers:
79,2 %
CD31⁺ / VE-cadherin⁺
CD44⁺ / ITGA9⁺
CD44
ITGA9
Vascular markers:
CD54
CD105
92,8 %
CD31⁺ / VE-cadherin⁺
CD54⁺ / CD105⁺
Vascular markers:
78,8 %
CD31⁺ / VE-cadherin⁺
CD44⁺ / ITGA9⁺
CD54⁺ / CD 54⁺
CD54
CD105
Endocardial markers:
CD44
ITGA9
78,5 %
CD31⁺ / VE-cadherin⁺
CD54⁺ / CD105⁺
CD44⁺ / ITGA9⁺

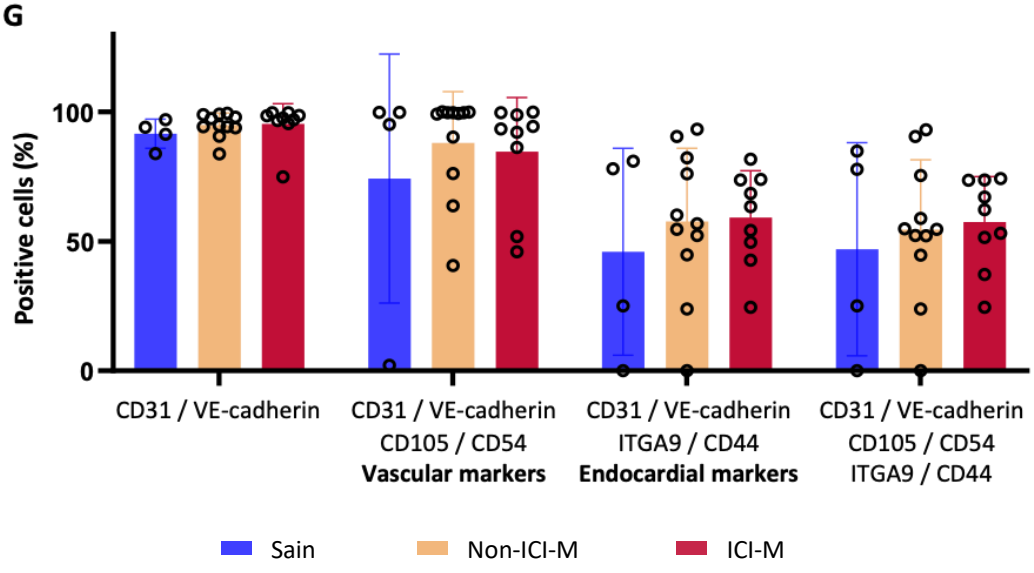

G
Positive cells (%)
100
50
0
CD31 / VE-cadherin
CD31 / VE-cadherin
CD105 / CD54
Vascular markers
CD31 / VE-cadherin
ITGA9 / CD44
Endocardial markers
CD31 / VE-cadherin
CD105 / CD54
ITGA9 / CD44
Sain
Non-ICI-M
ICI-M

Figure 28 : Caractérisation des hiPSC différenciées en cellules endothéliales.
(A) Protocole de différenciation et d'utilisation des hiPSC-EC. Les flèches circulaires représentent les changements de milieu, P1 - P2 - P3 et P4 correspondent aux différents passages et les hiPSC-EC sont caractérisées par cytométrie en flux de P2 à P4, et par immunomarquage à P4. **(B)** et **(C)** Immunomarquages d'hiPSC-EC différenciées à partir du clone Sain montrant que la majorité des cellules expriment CD31 et le facteur de von Willebrand (vWF), ainsi que la VE-cadhérine et Ki67. Les hiPSC-EC s'organisent en réseau. Les images sont réalisées avec un grossissement x10. **(D)** Pourcentage de cellules exprimant les marqueurs endothéliaux CD31 et VE-cadhérine, les marqueurs vasculaires CD105 et CD54 et les marqueurs endocardiques ITGA9 et CD44. Les hiPSC-EC expriment CD31 (96 ± 5 % des cellules) et la VE-cadhérine (96 ± 4 %). L'expression des marqueurs vasculaires (CD105 : 93 ± 20 % ; CD54 : 88 ± 19 %) est plus élevée que l'expression des marqueurs endocardiques (ITGA9 : 74 ± 26 %; CD44 : 74 ± 28 %). Il n'y a pas de différence significative d'expression entre les clones (Sain, Non-ICI-M et ICI-M). **(E)** et **(F)** Exemples des processus d'analyse par cytométrie en flux pour une différenciation du clone E-CT6 (Sain) **(E)** et une différenciation du clone 1K (ICI-M) **(F)**. **(G)** Pourcentage de cellules co-exprimant les différents marqueurs endothéliaux permettant de définir des sous-populations : 95 ± 6 % des hiPSC-EC co-expriment CD31/VE-cadhérine. Dans cette population ($CD31^+$/VE-$cadhérine^+$), 85 ± 25 % expriment les marqueurs vasculaires (CD105 et CD54) et 56 ± 26 % expriment les marqueurs endocardiques (ITGA9 et CD44), les 6 marqueurs étant co-exprimés dans 54 ± 26 % des hiPSC-EC. Une analyse ANOVA à deux facteurs suivie d'un test de Tukey pour effectuer les corrections multiples a été réalisée afin de comparer les niveaux d'expression : il n'y a pas de différence significative d'expression entre les clones (Sain, Non-ICI-M et ICI-M). L'ensemble des expériences de cytométrie a été réalisé avec : n=4 différenciations du clone Sain, n=11 différenciations issues de 5 clones (1-3 différenciations / clone) du groupe Non-ICI-M et n=9 différenciations issues de 4 clones (1-3 différenciations / clone) du groupe ICI-M.

En résumé, les hiPSC-EC différenciées à partir des clones hiPSC de différents clones (Sain, Non-ICI-M et ICI-M) (*i*) expriment majoritairement des marqueurs spécifiques endothéliaux (CD31 et VE-cadhérine), (*ii*) prolifèrent et (*iii*) s'organisent en réseau afin de recréer un endothélium. Des sous-populations expriment uniquement des marqueurs vasculaires (CD105 et CD54), mais la majorité des cellules expriment à la fois les marqueurs vasculaires et les marqueurs endocardiques, ce qui implique un caractère encore immature de ces cellules endothéliales. On ne note pas de différence statistiquement significative entre les clones mais les hiPSC-EC différenciées à partir du clone Sain (E-CT6) présentent une plus grande variabilité dans l'expression des différents marqueurs endothéliaux que les hiPSC-EC différenciés à partir des clones des groupes Non-ICI-M et ICI-M.

1.4. Conclusions sur l'établissement des modèles cellulaires

Nous pouvons conclure que nos protocoles de différenciation sont efficaces et reproductibles, tant entre les différentes différenciations qu'entre les clones des différents donneurs pour la majorité des clones dont nous disposons. En effet, certains clones ne permettaient pas d'avoir un pourcentage de cellules différenciées en CM (3M, 4A, 5B, 5I) ou en EC (1C, 3M) suffisant pour permettre leur étude, et d'autres ne se sont pas du tout différenciés (7L). Ce point sera discuté dans le Chapitre discussion. Les hiPSC-CM et hiPSC-EC expriment de manière appropriée les marqueurs spécifiques de leur lignée respective, démontrant la qualité du protocole. Nous observons des populations cellulaires présentant des sous-types distincts : les hiPSC-CM se différencient en sous-populations atriales et/ou ventriculaires tandis qu'une majorité des hiPSC-EC expriment à la fois des marqueurs vasculaires et endocardiques. Les caractéristiques de chacune de ces populations obtenues sont généralement trouvées de façon reproductible entre les différenciations, même si une plus grande variabilité des hiPSC-EC différenciées à partir du clone Sain a été observée *vs* les groupes Non-ICI-M et ICI-M. Les causes possibles seront abordées dans la discussion générale.

2. Analyse transcriptomique de la réponse à l'IFN-γ des cardiomyocytes et des cellules endothéliales, provenant d'un clone hiPSC généré chez une patiente ayant déclaré une myocardite immuno-médiée

Lors de mon master 2 et au début de ma thèse (2020-2022), nous n'avions pu générer de clones hiPSC que pour une seule patiente ayant déclaré une myocardite immuno-médiée (MIM), du fait des difficultés à inclure les patients durant la pandémie de COVID-19 et de la rareté de l'incidence de la myocardite immuno-médiée, moins de 2 % des patients étant atteints. J'ai alors réalisé une étude transcriptomique par *microarray* comparant le clone hiPSC d'une personne saine (PS-E-CT6) et un clone hiPSC d'une patiente de la cohorte gMEDICO (ICI-M-1K) (Tableau 9). Il n'y a pas de prévalence de sexe dans la MIM induite par les ICI, il n'était donc pas aberrant d'utiliser des hiPSC provenant d'un donneur sain (le seul contrôle dont nous disposions) et de les comparer avec ceux d'une patiente du centre de cardio-oncologie.

Le clone 1K a été généré à partir de fibroblastes cutanés d'une femme de 89 ans traitée par immunothérapie anti-PD-1, pour un carcinome épidermoïde pulmonaire métastasique. Cette patiente avait été hospitalisée pour suspicion de myocardite après la première administration d'immunothérapie. Le diagnostic de la patiente a été confirmé ensuite par une élévation de la troponine et des anomalies à l'IRM sans altération de la fonction cardiaque, ce qui nécessita un traitement par corticothérapie et l'arrêt de l'immunothérapie.

Nous avons réalisé 3 différenciations indépendantes des hiPSC, en cardiomyocytes et en cellules endothéliales, que nous avons traitées par 10 ng/ml d'IFN-γ pendant 72h. Nous avons choisi cette concentration et cette durée du traitement pour recréer la condition inflammatoire chronique observée lors de la MIM. Le choix a été motivé par les données de la littérature qui indiquent une augmentation de l'expression de PD-L1 dans des cellules cardiaques après traitement par l'IFN-γ (Cosper et *al.*, 2012; Eppihimer et *al.*, 2013; Grinnemo et *al.*, 2019).

Les échantillons ont été obtenus avec l'aide de Thi Thom Tran, doctorante qui m'a initiée à la culture des hiPSC et à leur différenciation.

2.1. Échantillons

Dans cette analyse transcriptomique à grande échelle par microarray, j'ai comparé huit groupes d'échantillons comme indiqué sur la figure 29 : des hiPSC-CM dérivés du clone PS-E-CT6 non traités (E-CT6-CM-CTRL) ou traités par l'IFN-γ (E-CT6-CM-IFN) ; des hiPSC-EC dérivées du clone PS-E-CT6 non traitées (E-CT6-EC-CTRL) ou traitées par l'IFN-γ (E-CT6-EC-IFN) ; des hiPSC-CM dérivés du clone ICI-M-1K non traités (1K-CM-CTRL) ou traités par l'IFN-γ (1K-CM-IFN) ; des hiPSC-EC dérivées du clone ICI-M-1K non traitées (1K-EC-CTRL) ou traitées par l'IFN-γ (1K-EC-IFN). Dans cette analyse, j'ai cherché à identifier des effets spécifiques et des effets communs aux différents groupes, en fonction (*i*) du traitement (IFN-γ *vs* CTRL), (*ii*) de l'origine du clone hiPSC (ICI-M *vs* Sain) et (*iii*) du type cellulaire (EC *vs* CM).

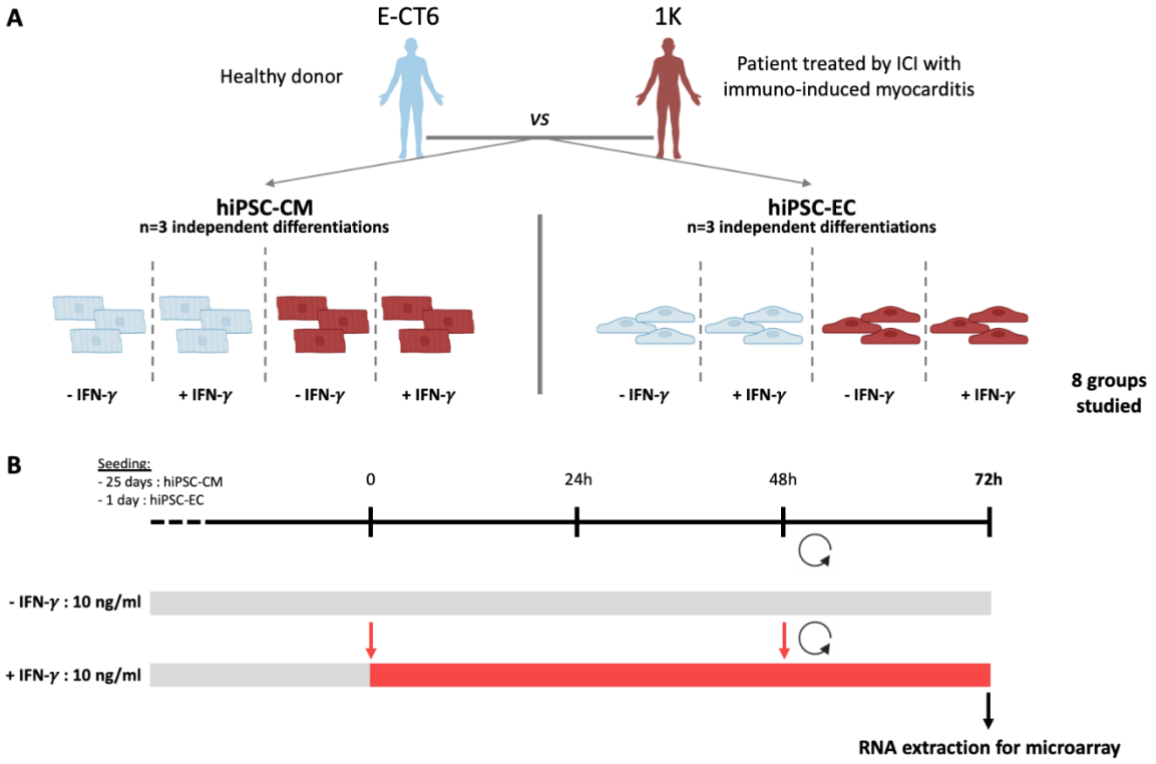


Figure 29 : Protocole expérimental de l'étude transcriptomique.
(A) Deux clones hiPSC ont été utilisés : un provenant d'un donneur sain (E-CT6, PS) et un provenant d'une patiente de la cohorte gMEDICO ayant déclaré une myocardite immuno-médiée suite à une immunothérapie par ICI (anti-PD-1) (1K, ICI-M). Pour chaque clone, 3 différenciations indépendantes en hiPSC-CM et en hiPSC-EC ont été réalisées. Les cellules ont été traitées (+ IFN-γ) ou non (- IFN-γ) par 10 ng/ml d'IFN-γ pendant 72h. **(B)** Les hiPSC-CM ont été ensemencés et maintenus en culture 25 jours pour qu'ils atteignent un phénotype plus mature au moment du traitement. Les hiPSC-EC ont été ensemencées 24h avant le traitement. Les flèches rouges indiquent l'ajout d'IFN-γ dans le milieu de culture, et les flèches circulaires indiquent un changement de milieu. Après 72h, les échantillons ont été isolés afin d'extraire les ARN et de réaliser le microarray.

Afin de comparer les 4 groupes d'échantillons de chaque type cellulaire (hiPSC-CM et hiPSC-EC) pour identifier les gènes différentiellement exprimés, j'ai effectué deux tests SAM multi-classes (Tusher et *al.*, 2001). Certains gènes sont représentés sur les puces par plusieurs sondes, j'ai donc supprimé les doublons afin de calculer le nombre de gènes différentiellement exprimés (DEG). Dans les hiPSC-CM, 789, 3 774 et 7 901 gènes ont été identifiés différentiellement exprimés entre les 12 échantillons avec des FDR appliqués à 0 %, 1 % et 5 % respectivement (Tableau 11). Dans les hiPSC-EC, 2 210, 6 788 et 11 341 gènes ont été identifiés comme différentiellement exprimés entre les 12 échantillons, avec des FDR appliqués à 0 %, 1 % et 5 % respectivement (Tableau 11).

FDR	**Nombre de sondes (nombre de gènes)**	
	hiPSC-CM	**hiPSC-EC**
0 %	1 029 (789)	2 885 (2 210)
1 %	4 716 (3 774)	8 783 (6 788)
5 %	10 043 (7 901)	15 058 (11 341)

Tableau 11 : Nombre de sondes et gènes différentiellement exprimés identifiés par les analyses SAM multi-classes, dans les cardiomyocytes (hiPSC-CM) et dans les cellules endothéliales (hiPSC-EC) avec un FDR à 0 %, 1 % et 5 %.

Pour chacune des analyses statistiques, un clustering hiérarchique à deux dimensions, basé sur la corrélation de Pearson, a été effectué afin de regrouper d'une part, les échantillons, et d'autre part, les sondes, pour les gènes ayant le même profil d'expression. Quatre clusters ont été identifiés dans les hiPSC-CM ainsi que dans les hiPSC-EC : sous-expression et surexpression de gènes par le traitement à l'IFN-γ ; sous-expression et surexpression de gènes dans les cellules différenciées à partir du clone de patient (ICI-M-1K) comparé au clone Sain (PS-E-CT6).

Pour chaque type cellulaire, j'ai recherché les processus biologiques et les voies de signalisation associées aux gènes différentiellement exprimés (DEG) par le traitement à l'IFN-γ d'une part, et par la cardiotoxicité d'autre part. Tous les DEG des deux analyses SAM multi-classes ont été utilisés. J'ai choisi un FDR de 0 % pour ces deux analyses du fait du grand nombre de DEG identifiés dans cette condition, pourtant la plus stringente. J'ai utilisé g:profiler pour réaliser l'étude d'enrichissement fonctionnel des différentes listes de gènes différentiellement exprimés. Les termes GO (Gene Ontology) et les voies KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) enrichis après un test de correction de Benjamini-Hochberg avec un seuil < 0,05 ont été identifiés.

2.2. Effet du traitement par l'IFN-γ dans les hiPSC-CM

2.2.1. Gènes différentiellement exprimés

Quatre groupes d'échantillons ont été comparés : les cardiomyocytes provenant de la personne saine, traités ou non (E-CT6-CM-CTRL ; E-CT6-CM-IFN) et les cardiomyocytes de la patiente ayant déclaré une myocardite, traités ou non (1K-CM-CTRL ; 1K-CM-IFN). Le test SAM multi-classes permet d'identifier 1 029 sondes représentant 789 gènes différentiellement exprimés avec un FDR 0 %. D'après le clustering hiérarchique, tous les échantillons sont correctement classés et les 4 conditions sont distinguables (Figure 30.A). Notons que les échantillons contrôles (E-CT6-CM-CTRL et 1K-CM-CTRL) sont regroupés ensemble, tout comme les échantillons traités (E-CT6-CM-IFN et 1K-CM-IFN).

Les sondes sont organisées en 4 clusters, permettant d'observer 4 types de réponses des hiPSC-CM. Les clusters 1 et 3 regroupent les gènes dans les hiPSC-CM traités par l'IFN-γ *vs* la condition non traitée (qu'ils proviennent du clone E-CT6 (Sain) ou du clone 1K (ICI-M)), respectivement 6 gènes sous-exprimés et 254 gènes sur-exprimés. Les clusters 2 et 4 regroupent les gènes dans les hiPSC-CM provenant du clone ICI-M-1K *vs* le clone PS-E-CT6 (qu'ils aient ou non été traités par l'IFN-γ), respectivement 256 gènes surexprimés et 273 gènes sous-exprimés (Figure 30.A).

2.2.2. Enrichissement fonctionnel

<u>Gènes différentiellement exprimés par le traitement par l'IFN-γ</u>

Avec seulement 6 gènes sous-exprimés par l'IFN-γ, aucune annotation fonctionnelle significative n'a pu être identifiée pour le cluster 1.

Concernant le cluster 3, regroupant les 254 gènes surexprimés par l'IFN-γ, l'analyse d'enrichissement fonctionnel identifie 496 termes GO et voies KEGG. Parmi ces annotations, on retrouve notamment les termes GO liés aux processus immunitaires (132 gènes), à la réponse à l'IFN-γ (27 gènes), à l'apoptose (41 gènes), et à l'inflammasome NLRP3 (3 gènes). (Tableau 12)

<u>Gènes différentiellement exprimés dans le clone 1K (ICI-M) par rapport au clone E-CT6 (Sain)</u>

Le cluster 4, qui regroupe quant à lui les 273 gènes sous-exprimés dans les hiPSC-CM du clone 1K (traités ou non par l'IFN-γ), est associé à un seul terme GO et à deux voies KEGG, tous trois liés à la fonction ribosomale (6 gènes).

Bien que le cluster 2 regroupe 256 gènes surexprimés dans les hiPSC-CM du clone 1K (ICI-M) par rapport au clone E-CT6 (Sain) (traités ou non par l'IFN-γ), seulement 10 termes GO ressortent significatifs de l'analyse. Ces termes sont associés aux processus synaptiques (30 gènes) ou aux jonctions cellulaires (35 gènes).

En conclusion de cette analyse dans les hiPSC-CM, on observe l'activation de la réponse immunitaire, de l'apoptose, et la mise en place de l'inflammasome NLRP3 en réponse au traitement par l'IFN-γ. Ces résultats sont cohérents avec la littérature (Didié et *al.*, 2017; Seko et *al.*, 1990). La comparaison des clones ICI-M-1K et PS-E-CT6 montre la dérégulation de la fonction des cardiomyocytes de manière spécifique dans les hiPSC-CM de la patiente avec une surexpression des gènes impliqués dans l'activité des synapses et dans les jonctions cellulaires, ce qui pourrait se traduire par une propagation altérée des signaux entre les cardiomyocytes, ou avec d'autres types de cellules cardiaques comme les fibroblastes. On observe également une sous-expression de gènes codant pour des composants des ribosomes, ce qui pourrait entraîner une diminution de la synthèse protéique.

2.3. Effet du traitement par l'IFN-γ dans les hiPSC-EC

2.3.1. Gènes différentiellement exprimés

Quatre groupes d'échantillons ont été comparés : les cellules endothéliales provenant de la personne saine, traitées ou non (E-CT6-EC-CTRL ; E-CT6-EC-IFN) et les cellules endothéliales provenant de la patiente ayant déclaré une myocardite, traitées ou non (1K-EC-CTRL ; 1K-EC-IFN). Le test SAM multi-classes a permis d'identifier 2 885 sondes qui représentent 2 210 gènes différentiellement exprimés avec un FDR 0 %. Les échantillons sont correctement classés, les 4 conditions analysées sont distinguables, et classées comme pour les hiPSC-CM : les échantillons contrôles (E-CT6-EC-CTRL et 1K-EC-CTRL) sont regroupés ensemble, et les échantillons traités (E-CT6-EC-IFN et 1K-EC-IFN) également (Figure 30.B).

Les sondes correspondant aux gènes différentiellement exprimés sont organisées en 4 clusters. Les clusters 1 et 4 regroupent les gènes dans les hiPSC-EC traitées par l'IFN-γ *vs* la condition non traitée (qu'ils proviennent du clone E-CT6 (Sain) ou du clone 1K (ICI-M)), respectivement 269 gènes sous-exprimés et 698 gènes surexprimés. Les clusters 2 et 3 regroupent les gènes dans les hiPSC-EC provenant du clone 1K (ICI-M) *vs* celles provenant du clone E-CT6 (Sain) (qu'ils aient été ou non traitées par l'IFN-γ), respectivement 519 gènes surexprimés et 748 gènes sous-exprimés (Figure 30.B).

2.3.2. Enrichissement fonctionnel

Gènes différentiellement exprimés par le traitement par l'IFN-γ

Le cluster 1 regroupe 269 gènes sous-exprimés par l'IFN-γ et il est associé à 29 termes GO correspondant notamment à la communication cellulaire (83 gènes).

Le cluster 4 regroupe les 698 gènes surexprimés par l'IFN-γ associés à 711 termes GO et voies KEGG. Parmi ces annotations, on retrouve notamment les termes GO correspondant aux processus immunitaires (244 gènes), à la réponse à l'IFN-γ (37 gènes), à l'apoptose (104 gènes), et à l'inflammasome AIM2 (4 gènes). De plus, de nombreuses voies de signalisation sont enrichies notamment MAPK (48 gènes), JAK-STAT (17 gènes) ainsi que NF-κB (14 gènes). (Tableau 12)

Gènes différentiellement exprimés dans le clone 1K (ICI-M) par rapport au clone E-CT6 (Sain)

Bien que le cluster 3 regroupe 748 gènes sous-exprimés dans les hiPSC-EC du clone 1K (traités ou non par l'IFN-γ), seuls 32 termes GO ressortent significatifs de l'analyse. Ces termes sont principalement associés à la signalisation intercellulaire (51 gènes) et à la sécrétion (33 gènes).

Le cluster 2, qui regroupe quant à lui les 519 gènes surexprimés dans les hiPSC-EC du clone 1K (traités ou non par l'IFN-γ), est associé à 121 termes GO et voies KEGG significatifs. Ces annotations concernent l'adhésion cellulaire (77 gènes), la production de cytokines (45 gènes) et les processus apoptotiques (74 gènes). (Tableau 13)

En conclusion de cette analyse dans les hiPSC-EC, on observe une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la communication cellulaire, et une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la réponse immunitaire, l'apoptose, ainsi que l'activation de l'inflammasome AIM2 en réponse au traitement par l'IFN-γ. Ces résultats sont cohérents avec la littérature (Eppihimer et *al.*, 2013; Valenzuela, 2023). On observe également l'augmentation de l'expression des gènes composants de différentes voies de signalisation intracellulaires : JAK-STAT / MAP Kinases et NF-κB. La comparaison des clones 1K-ICI-M et E-CT6-PS montre une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la sécrétion et la signalisation intracellulaire de manière spécifique dans les hiPSC-EC de la patiente ayant déclaré une myocardite. On observe également une hausse de l'expression des gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire, la production de cytokines et l'apoptose ce qui pourrait corresponde à une altération de la fonction de la barrière endothéliale *via* l'activation de la mort cellulaire programmée et la mise en place du recrutement des cellules immunitaires grâce à l'augmentation de l'expression des protéines d'adhésion.

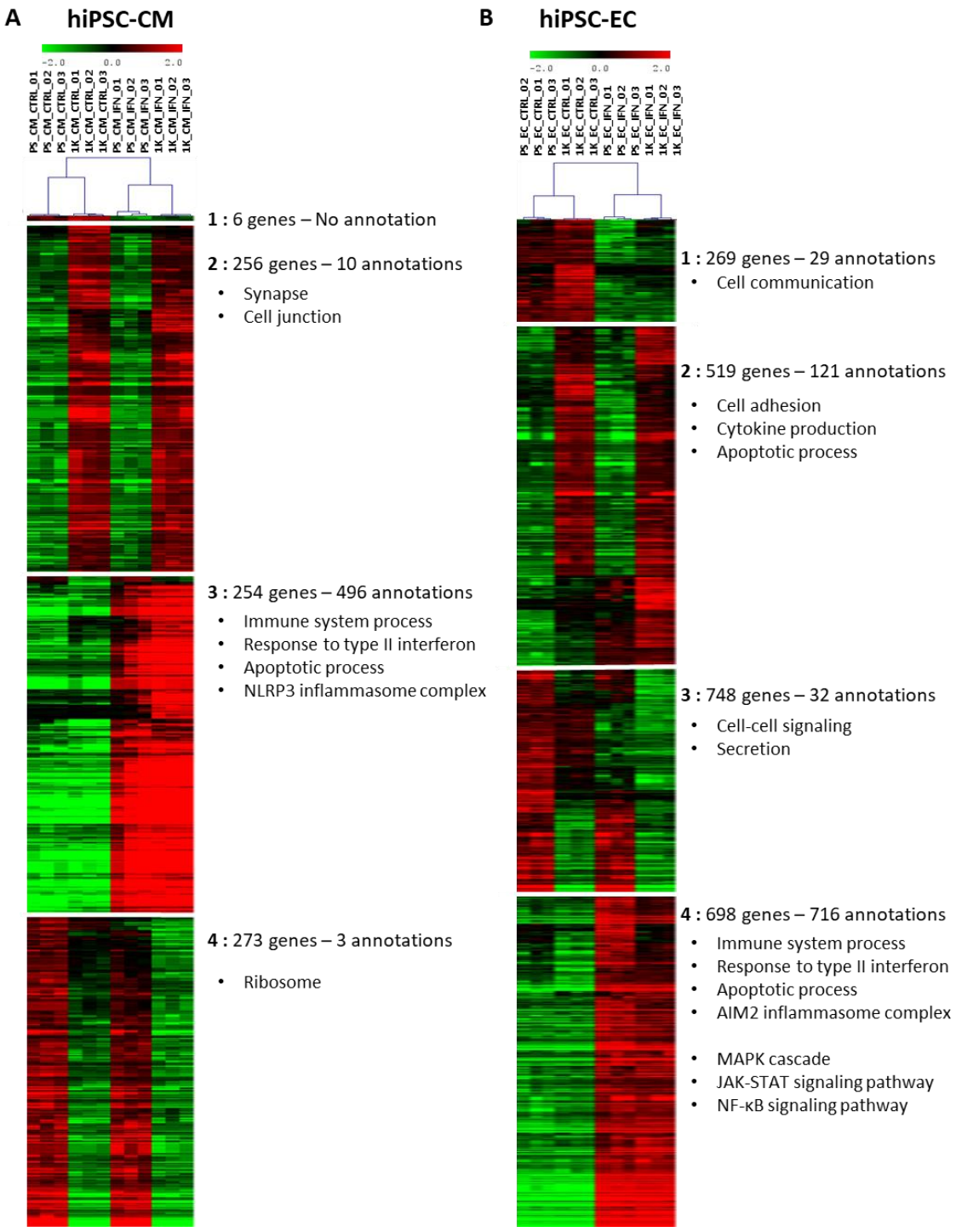


Figure 30 : Profils d'expression génique dans les hiPSC-CM et hiPSC-EC traités par l'IFN-γ

Un clustering hiérarchique a été réalisé après une analyse SAM multi-classes, 10 000 permutations avec un FDR à 0 % dans les hiPSC-CM **(A)** et dans les hiPSC-EC **(B)**. Quatre clusters sont identifiés pour chaque type cellulaire : les gènes sous-exprimés et les gènes surexprimés par l'IFN-γ, quel que soit le clone hiPSC (hiPSC-CM : clusters 1 et 3 respectivement ; hiPSC-EC : clusters 1 et 4 respectivement) ; les gènes sous-exprimés et les gènes surexprimés dans le clone de la patiente ayant déclaré une myocardite immuno-médiée (1K) par rapport à la personne saine (E-CT6), qu'ils aient ou non été traités par l'IFN-γ (hiPSC-CM : clusters 4 et 2 respectivement ; hiPSC-EC : clusters 3 et 2 respectivement). Pour chaque cluster : le nombre de gènes différentiellement exprimés ainsi que les principales annotations fonctionnelles identifiées à l'aide de g:profiler sont indiqués.

		p-value		Nb of genes	
Term ID	**Term name**	**CM**	**EC**	**CM**	**EC**
Immune system and pro-inflammatory molecules					
GO:0002376	immune system process	1,21E-67	1,42E-78	132	244
GO:0006952	defense response	2,05E-61	1,05E-69	108	189
GO:0019882	antigen processing and presentation	4,54E-29	2,28E-29	28	38
GO:0034097	response to cytokine	2,94E-30	3,19E-43	59	112
GO:0001816	cytokine production	3,14E-23	1,33E-31	48	89
GO:0019221	cytokine-mediated signaling pathway	7,54E-19	1,88E-31	36	72
GO:0140888	interferon-mediated signaling pathway	7,97E-15	2,44E-11	18	22
GO:0034341	response to type II interferon	1,92E-24	7,51E-24	27	37
GO:0032609	type II interferon production	2,17E-05	2,39E-12	11	24
GO:0034612	response to tumor necrosis factor	1,43E-04	8,63E-09	14	29
GO:0032615	interleukin-12 production	1,78E-04	6,96E-05	8	12
GO:0032635	interleukin-6 production	-	2,09E-06	-	20
GO:0070555	response to interleukin-1	-	3,63E-04	-	16
GO:0045321	leukocyte activation	1,48E-14	5,39E-28	42	93
GO:0007159	leukocyte cell-cell adhesion	6,98E-10	1,35E-19	24	52
GO:0098609	cell-cell adhesion	3,50E-03	9,36E-08	25	59
Inflammasome					
GO:0005764	lysosome	1,71E-02	5,14E-05	19	43
GO:0005765	lysosomal membrane	3,46E-05	3,11E-06	18	33
GO:0061702	canonical inflammasome complex	9,87E-05	6,16E-04	5	6
GO:0032612	interleukin-1 production	1,30E-04	5,55E-09	10	20
GO:0072559	NLRP3 inflammasome complex	1,24E-02	-	3	-
GO:0140970	AIM2 inflammasome complex assembly	2,82E-02	1,26E-02	3	4
Cell death					
GO:0070269	pyroptosis	4,04E-08	1,81E-05	9	10
GO:0012501	programmed cell death	4,29E-07	1,25E-14	48	113
GO:0030155	regulation of cell adhesion	4,99E-06	1,05E-16	27	68
GO:0006915	apoptotic process	3,58E-04	8,60E-12	41	104
GO:0043067	regulation of programmed cell death	-	1,41E-13	-	93
Metabolism and devlopment					
GO:0019222	regulation of metabolic process	1,30E-02	8,03E-08	95	246
GO:0001944	vasculature development	-	2,15E-04	-	44
Signaling pathways					
GO:0043122	regulation of canonical NF-kappaB signal transduction	1,51E-12	4,28E-13	23	36
GO:0007249	canonical NF-kappaB signal transduction	2,04E-11	9,17E-14	23	39
GO:0051092	positive regulation of NF-kappaB transcription factor activity	3,58E-02	5,53E-08	8	20

GO:0000165	MAPK cascade	-	2,48E-06	-	48
KEGG pathways					
KEGG:04612	Antigen processing and presentation	1,07E-22	9,42E-21	22	28
KEGG:05330	Allograft rejection	6,80E-16	3,97E-17	14	19
KEGG:05416	Viral myocarditis	5,42E-13	2,86E-13	15	21
KEGG:04621	NOD-like receptor signaling pathway	7,08E-12	8,63E-12	21	32
KEGG:04514	Cell adhesion molecules	3,80E-09	3,85E-06	17	22
KEGG:04620	Toll-like receptor signaling pathway	2,59E-05	1,44E-02	11	13
KEGG:04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	2,29E-02	1,74E-07	13	34
KEGG:05332	Graft-versus-host disease	-	3,42E-16	-	19
KEGG:05320	Autoimmune thyroid disease	-	4,19E-12	-	18
KEGG:04668	TNF signaling pathway	-	1,02E-08	-	22
KEGG:04217	Necroptosis	-	2,06E-03	-	18
KEGG:04064	NF-kappa B signaling pathway	-	2,20E-03	-	14
KEGG:04630	JAK-STAT signaling pathway	-	1,01E-02	-	17

Tableau 12 : Annotations fonctionnelles des gènes surexprimés par l'IFN-γ dans les hiPSC-CM et les hiPSC-EC

Les termes GO (Gene Ontology) et les voies KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) ont été identifiés par g:profiler avec une correction de Benjamini-Hochberg avec un seuil $< 0,05$.

		p-value		Nb of genes	
Term ID	**Term name**	**CM**	**EC**	**CM**	**EC**
Cell adhesion					
GO:0007155	cell adhesion	-	1,65E-07	-	77
GO:0098609	cell-cell adhesion	-	9,05E-06	-	53
GO:0030155	regulation of cell adhesion	-	1,13E-03	-	42
GO:0007159	leukocyte cell-cell adhesion	-	2,56E-02	-	25
Immune system and pro-inflammatory molecules					
GO:0001816	cytokine production	-	6,06E-05	-	45
GO:0006954	inflammatory response	-	1,39E-04	-	46
GO:0006952	defense response	-	2,89E-04	-	77
GO:0032635	interleukin-6 production	-	1,30E-03	-	16
GO:0034097	response to cytokine	-	3,83E-03	-	46
GO:0032640	tumor necrosis factor production	-	1,71E-02	-	15
Cell death					
GO:0006915	apoptotic process	-	2,61E-02	-	74
GO:0043067	regulation of programmed cell death	-	4,49E-02	-	61
KEGG pathways					
KEGG:04010	MAPK signaling pathway	-	1,64E-02	-	20

Tableau 13 : Annotation fonctionnelle pour les gènes surexprimés par la cardiotoxicité dans les hiPSC-CM et les hiPSC-EC

Les termes GO (Gene Ontology) et les voies KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) ont été identifiés par g:profiler avec une correction de Benjamini-Hochberg avec un seuil < 0,05.

2.4. Identification des processus biologiques spécifiques ou communs aux hiPSC-CM et aux hiPSC-EC

Après le traitement par l'IFN-γ, on observe des réponses communes aux hiPSC-CM et aux hiPSC-EC comme l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la réponse immunitaire et dans l'apoptose. On note aussi des spécificités pour chaque type cellulaire, comme l'augmentation de l'expression des gènes en lien avec l'inflammasome NLRP3 dans les hiSPC-CM *vs* l'inflammasome AIM2 dans les hiPSC-EC.

Si l'on considère le critère de cardiotoxicité, on observe des modulations de la fonction de chacun des types cellulaires avec une augmentation de l'expression des gènes codant pour des composants synaptiques dans les hiPSC-CM et pour des protéines d'adhésion cellulaire et des cytokines dans les hiPSC-EC. On observe également une diminution de la production protéique dans les hiSPC-CM et une diminution de la sécrétion dans les hiPSC-EC.

Pour approfondir la comparaison des réponses entre hiPSC-CM et hiPSC-EC, au traitement par l'IFN-γ d'une part et à la cardiotoxicité d'autre part, j'ai réalisé 4 diagrammes de Venn à partir des listes de gènes différentiellement exprimés provenant des deux analyses SAM multi-classes.

À partir de ces listes de gènes, j'ai à nouveau réalisé une étude d'enrichissement fonctionnel grâce à g:profiler afin d'identifier les termes GO et les voies KEGG enrichis après une correction de Benjamini-Hochberg avec un seuil < 0,05.

2.4.1. Effet du traitement par l'IFN-γ

<u>Gènes sous-exprimés par l'IFN-γ</u>

Les gènes sous-exprimés par l'IFN-γ dans les hiPSC-CM (cluster 1) et les hiPSC-EC (cluster 1) ont été comparés. Sur un total de 272 gènes, seuls 2 gènes (*loc101930246* (ARN non codant) et *TNFRSF10D*, un des récepteurs du TNF) sont communs aux hiPSC-CM et aux hiPSC-EC (Figure 31.A). Quatre gènes (*linc01534* (ARN non codant), *SOCS2* (codant pour un régulateur négatif de la voie JAK-STAT en réponse aux cytokines), *LONRF2* (codant pour une protéine impliquée dans l'ubiquitination) et *ZNF165* (codant pour un facteur de transcription)) sont spécifiques des hiPSC-CM. Aucune annotation fonctionnelle n'est associée à ces gènes.

Les 268 gènes sous-exprimés spécifiquement dans les hiPSC-EC sont principalement impliqués dans la communication cellulaire (82 gènes), comme déjà présenté dans l'analyse précédente (Figure 31.A).

Gènes surexprimés par l'IFN-γ

Les gènes surexprimés par l'IFN-γ dans les hiPSC-CM (cluster 3) et les hiPSC-EC (cluster 4) ont été comparés. Sur 765 gènes, 66 gènes sont spécifiques des hiPSC-CM, 511 gènes sont spécifiques des hiPSC-EC et 188 gènes sont communs aux deux types cellulaires.

De nombreuses annotations fonctionnelles sont identifiées pour la liste de gènes communs aux 2 types cellulaires dont les processus immunitaires (communs : 120 gènes, hiPSC-CM : 12 gènes, hiPSC-EC : 124 gènes), la réponse à l'IFN-γ (communs : 22 gènes, hiPSC-CM : 5 gènes, hiPSC-EC : 15 gènes) ou encore la pyroptose (communs : 8 gènes, hiPSC-CM : 1 gènes, hiPSC-EC : 9 gènes). Parmi les gènes communs, on retrouve des gènes codant pour des protéines du MHC de classe I (i.e. *HLA-C*, *HLA-F*, *HLA-G*) et de classe II (*i.e. HLA-DRA*, *HLA-DMA*), des molécules d'adhésion (*ICAM1*), des chemokines (*i.e.* CXCL9, CXCL10, *CXCL11*), des composants de l'inflammasome (*i.e. P2X7*, *GSDMD*, *NLRC5* et *GBP1/2/3/4/5*), des caspases (*i.e. CASP1/4/10*) et le point de contrôle immunitaire *PD-L1*. (Figure 31.B)

Les gènes associés aux processus biologiques spécifiques des hiPSC-CM codent par exemple pour une protéine d'adhésion (*CEACAM1*) et des cytokines (*i.e. CCL21/25*). (Figure 31.B)

Pour les hiPSC-EC, l'analyse met en évidence le point de contrôle *PD-L2*, des cytokines pro-inflammatoires (*i.e. CCL2/5*, *IL-1B*), des récepteurs immunitaires (*i.e. TLR2*, *AIM2*). Des termes GO spécifiques des cellules endothéliales sont également identifiés tels que la production d'interleukine 6 (13 gènes) et différentes voies de signalisation dont la voie des MAP kinases (39 gènes, dont des cytokines (*i.e. CCL5, CCL7 et CCL8*)) (Figure 31.B).

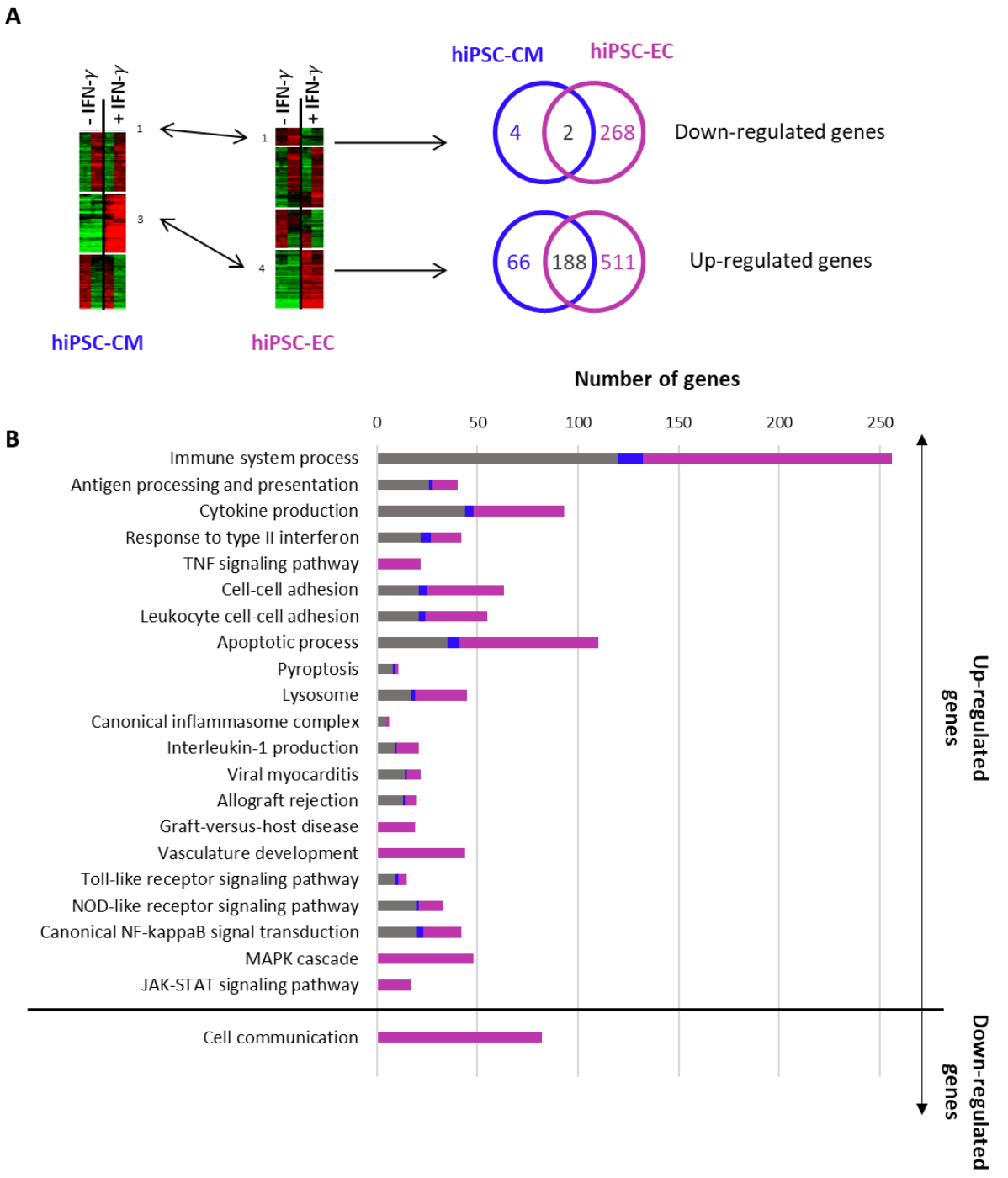


Figure 31 : Gènes dérégulés et annotations fonctionnelles communes ou spécifiques des hiPSC-CM et hiPSC-EC en réponse au traitement par l'IFN-γ

(A) Les diagrammes de Venn indiquent le nombre de gènes différentiellement exprimés (DEG) communs (gris) et spécifiques des hiPSC-CM (bleu) et des hiPSC-EC (violet). **(B)** Principaux termes GO (processus biologiques) et voies KEGG identifiés lors de l'analyse d'enrichissement fonctionnel réalisée avec g:profiler. L'histogramme représente le nombre de gènes communs (gris), et spécifiques aux hiPSC-CM (bleu) et hiPSC-EC (violet) pour chaque processus biologique ou voie de signalisation.

Comme attendu, on retrouve des processus biologiques communs à partir des gènes surexprimés par le traitement par l'IFN-γ dont les processus immunitaires, la réponse à l'IFN de type II, l'apoptose ou encore la pyroptose. En accord avec la littérature, l'IFN-γ induit la surexpression de *MHC-I*, *MHC-II*, *ICAM1*, *PD-L1* et celle de certains composants et régulateurs de l'inflammasome à la fois dans les cardiomyocytes et dans les cellules endothéliales (Didié et *al.*, 2017; Eppihimer et *al.*, 2013; Seko et *al.*, 1990; Valenzuela, 2023). Malgré de nombreux gènes communs aux deux types cellulaires associés à ces processus biologiques, on retrouve des spécificités pour chaque type cellulaire, principalement dans les cellules endothéliales. Des processus biologiques sont enrichis dans les hiPSC-EC après traitement par l'IFN-γ, notamment la production d'interleukine 6 et la voie des MAP kinases.

2.4.2. Effet du critère de cardiotoxicité

Gènes sous-exprimés par le critère de cardiotoxicité

Les gènes sous-exprimés dans les hiPSC-CM (cluster 4) et les hiPSC-EC (cluster 3) dans le clone ICI-M-1K par rapport au clone PS-E-CT6, donc ceux associés au critère de cardiotoxicité, ont été comparés. Sur un total de 697 gènes, 178 gènes sont spécifiques des hiPSC-CM, 441 gènes sont spécifiques des hiPSC-EC et 78 gènes sont communs aux deux types cellulaires (Figure 32.A).

Un seul terme GO est associé aux gènes communs aux deux types cellulaires : ribosome cytosolique (4 gènes codant pour des sous-unités ribosomales). Aucune annotation fonctionnelle n'est identifiée pour les gènes spécifiques des hiPSC-CM. Concernant les gènes spécifiques des hiPSC-EC, on trouve des termes GO associés à la communication cellulaire (118 gènes dont le facteur de von Willebrand et des molécules pro-inflammatoires (*i.e. IL-16* et *CXCL12*)). (Figure 32.B)

Gènes surexprimés par le critère de cardiotoxicité

Les gènes surexprimés dans les hiPSC-CM (cluster 2) et les hiPSC-EC (cluster 2) dans le clone ICI-M-1K par rapport au clone PS-E-CT6, donc ceux associés au critère de cardiotoxicité, ont été comparés. Sur un total de 598 gènes, 150 gènes sont spécifiques des hiPSC-CM, 325 gènes sont spécifiques des hiPSC-EC et 123 gènes sont communs aux deux types cellulaires (Figure 32.A).

Les gènes différentiellement exprimés dans les deux types cellulaires codent pour des molécules de liaison principalement retrouvées sur la membrane des vésicules (65 gènes). Concernant les gènes spécifiques des hiPSC-CM, on obtient 4 termes GO associés à la matrice extracellulaire (11 gènes codant principalement pour des collagènes). Concernant les gènes spécifiques des hiPSC-EC, les termes GO sont associés notamment à la réponse inflammatoire

(43 gènes dont un inhibiteur de NF-κB (*NFKBIA*) ou un régulateur de l'inflammasome NLRP3 (*TXNIP*)), la voie des MAP kinase (33 gènes) ou encore les processus apoptotiques (69 gènes dont *NFKBIA*, *TXNIP* et la caspase-7 (*CASP7*)). (Figure 32.B)

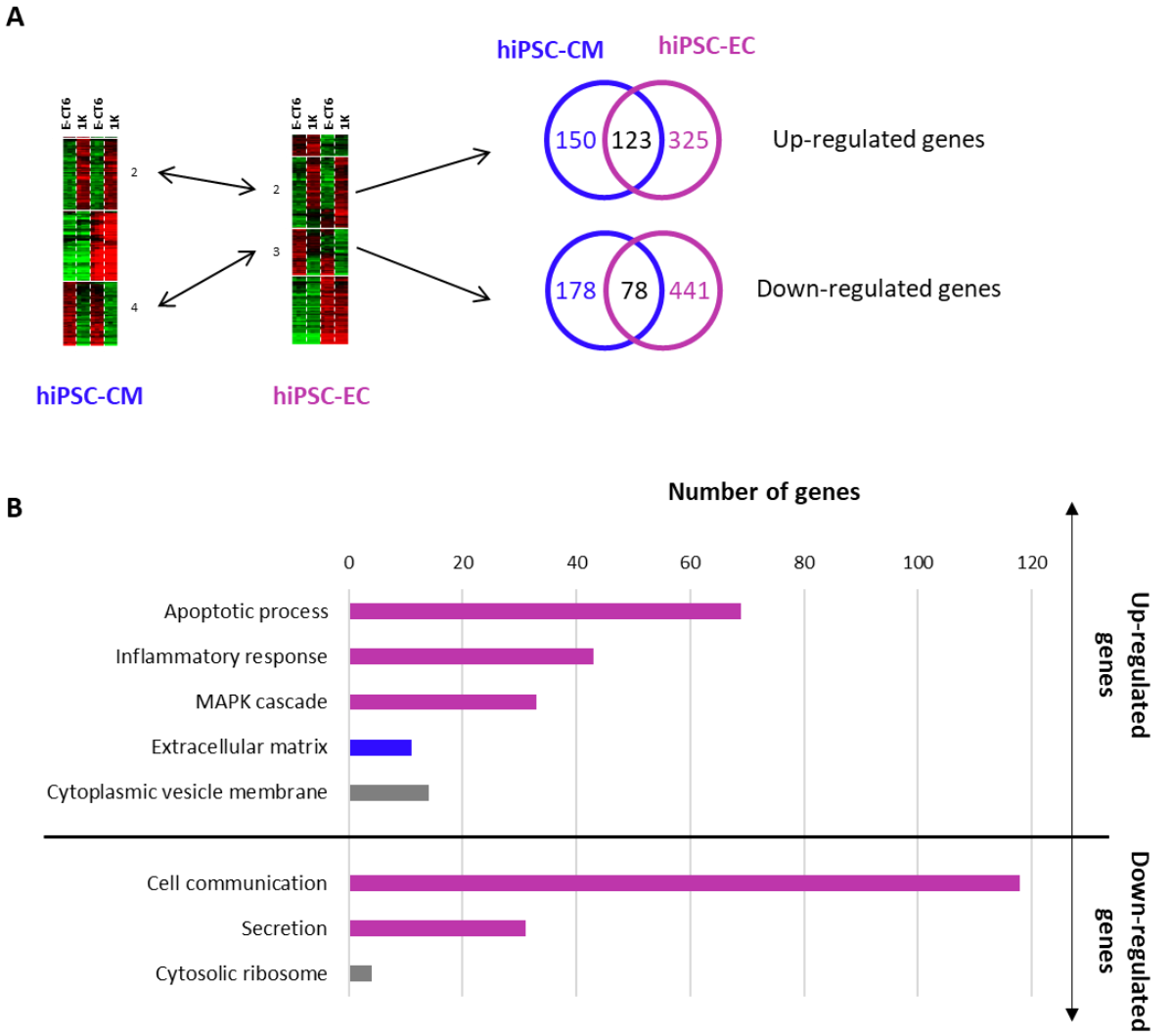


Figure 32 : Gènes dérégulés et annotations fonctionnelles communes ou spécifiques des hiPSC-CM et hiPSC-EC associés au critère de cardiotoxicité

(A) Les diagrammes de Venn indiquent le nombre de gènes différentiellement exprimés (DEG) communs (gris) et spécifiques des hiPSC-CM (bleu) et hiPSC-EC (violet). **(B)** Principaux termes GO (processus biologiques) et voies KEGG identifiés lors de l'analyse d'enrichissement fonctionnel réalisée avec g:profiler. L'histogramme représente le nombre de gènes communs (gris), et spécifiques aux hiPSC-CM (bleu) et hiPSC-EC (violet) pour chaque processus biologiques ou voies de signalisation. Pour rappel, le clone issu du donneur sain est le clone E-CT6, et le clone issu de la patiente ICI-M est le clone 1K. Les processus biologiques associés aux listes de DEG concernent majoritairement les hiPSC-EC et sont associés à la réponse immunitaire et les processus apoptotiques.

À partir des gènes communs aux hiSPC-CM et hiPSC-EC différentiellement exprimés et associés au critère de cardiotoxicité, on trouve uniquement l'augmentation de l'expression des gènes codant pour des protéines membranaires vésiculaires. Pour ce qui est des DEG spécifiques des hiPSC-CM, on observe une augmentation de l'expression de gènes codant pour différents collagènes suggérant un remodelage des cardiomyocytes. Pour ce qui est des DEG spécifiques hiPSC-EC, on observe une diminution de l'expression des gènes associés à la communication cellulaire dont celui codant pour le facteur de von Willebrand, cela traduisant une altération possible de la structure endothéliale. On observe également l'activation de différents processus biologiques associés à la réponse inflammatoire et à l'apoptose, ainsi que celle des voies NF-κB et des MAP kinases.

2.5. Conclusion de l'étude transcriptomique

Cette première étude comparant deux clones hiPSC, le premier provenant d'une personne saine (PS-E-CT6) et le second d'une patiente ayant déclaré une myocardite suite au traitement par ICI (ICI-M-1K), a été réalisée afin d'étudier la réaction cardiotoxique induite par l'immunothérapie de type ICI. Nous avions deux objectifs principaux (i) étudier l'effet de l'IFN-γ sur des cellules cardiaques dérivées de ces clones et (ii) identifier des pistes potentielles pour mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de la MIM, alors que les connaissances sur le sujet restent très limitées. Pour cela, j'ai recherché les régulations transcriptomiques spécifiques et communes en fonction : du traitement (IFN-γ *vs* CTRL), de l'origine du clone hiPSC (ICI-M *vs* Sain) et du type cellulaire (EC *vs* CM).

Une majorité de gènes sont régulés positivement par l'IFN-γ dans les deux types cellulaires et pour les 2 clones étudiés. Ces gènes sont impliqués dans la réponse immunitaire et inflammatoire, la sécrétion de cytokines, l'adhésion cellulaire, l'apoptose et l'inflammasome. Les voies de signalisation associées incluent notamment les voies NOD-like, Toll-like, NF-κB, JAK-STAT et la présentation d'antigènes. Suite au traitement par l'IFN-γ, l'augmentation de l'expression de certains gènes codant pour PD-L1, MHC-I, pour les protéines de la famille des GBP, des régulateurs de l'inflammasome, ont déjà été observé dans différents modèles cellulaires ou dans des modèles animaux, et tout cela sera discuté dans la discussion.

La comparaison des réponses entre le clone de la personne saine et le clone de la patiente ayant déclaré une MIM a mis en évidence des gènes dont l'expression est directement associée à la cardiotoxicité. Il est à noter que nous n'avons pas retrouvé de différence directement liée au sexe des donneurs (un homme sain et une patiente) dans nos résultats. Le critère sexe est important dans les maladies cardiovasculaires. Les femmes non ménopausées semblent protégées contre ces maladies, tout comme contre les infections et l'inflammation. La patiente étant âgée de 89 ans au moment du prélèvement, cette différence liée au sexe n'avait plus lieu. Ces résultats directement associés à la cardiotoxicité sont très

intéressants car ils étayent notre approche consistant à utiliser les clones hiPSC des patients comme modèle *in cellulo* mimant les processus liés *in vivo* à la MIM. Il nous reste néanmoins à séquencer les clones hiPSC utilisés pour cette étude qui sera prochainement soumise pour publication.

Ces résultats suggèrent que, dans le cadre de la réaction de cardiotoxicité, la dysfonction myocardique est fortement associée à des altérations des caractéristiques endothéliales, soit par une dysfonction directe de l'endothélium, soit par une influence indirecte de l'endothélium sur l'activité des cardiomyocytes. La comparaison des gènes différentiellement exprimés dans les deux types cellulaires montre une régulation génique plus importante dans les hiPSC-EC suite au traitement par l'IFN-γ, cela dans les échantillons du clone E-CT6 (Sain) et du clone 1K (ICI-M). Une des différences observées entre les hiPSC-CM et les hiPSC-EC est la nature de l'inflammasome associé : NLRP3 dans les hiPSC-CM *vs* AIM2 dans les hiPSC-EC. De plus, dans les hiPSC-EC, on observe une surexpression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire dont ceux codant pour des récepteurs (*PD-L2*, *TLR2*) et des cytokines pro-inflammatoires (*CCL2*, *CCL5* et *IL-1B*). On observe aussi une régulation plus importante associée au critère de cardiotoxicité dans les hiPSC-EC par rapport aux hiPSC-CM, avec notamment une surexpression de gènes participants à la mise en place de l'inflammasome NLRP3 (*NFKBIA*, *TXNIP*) et dans l'apoptose (*CASP7*). Ces résultats, qui seront repris dans la Discussion, nous ont amenés à analyser plus en détail les réponses au traitement par l'IFN-γ de ces deux types cellulaires, et plus particulièrement l'implication de l'inflammasome NLRP3 dans ce processus.

3. Article : Demonstration of Predominant Role of hiPSC-Derived Endothelial Cells in ICI-induced Myocarditis

Les résultats de l'analyse du microarray ont montré une augmentation de la transcription des gènes codant pour des composant et des régulateurs de l'inflammasome ainsi qu'une différence de réponse suite au traitement par l'IFN-γ entre les cardiomyocytes et les cellules endothéliales. De récentes études transcriptomiques en cellules uniques sur des échantillons de patients (PBMC et biopsies endomyocardiques) ont confirmé l'implication de l'IFN-γ dans le développement des myocardites induites par les ICI, mais elles ont également permis d'identifier l'implication d'autres cytokines pro-inflammatoires dont les interleukines 1β, 2 et 6, mais également CCL5 (RANTES), le granzyme B (GZMB) et le TNF-α. Dans cette étude, nous avons analysé la réponse des hiPSC différenciées en cardiomyocytes et en cellules endothéliales au traitement par l'IFN-γ, mais aussi par un cocktail de molécules inflammatoires contenant, en plus de l'IFN-γ, les cytokines identifiées dans le développement des myocardites induites par les ICI : IL-1β, -2, -6, CCL5, GZMB et TNF-α. J'ai réalisé ce travail sur le clone Sain (E-CT6).

Cette étude a été réalisée avec l'aide d'Isaure Firoaguer, que j'ai formée à la culture des hiPSC, à la différenciation des hiPSC-EC, à la cytométrie et à la qPCR depuis son stage de M2 en 2023.

Differential Inflammatory Responses of hiPSC-derived Endothelial Cells and Cardiomyocytes to Cytokines Implicated in ICI-Induced Myocarditis

Running Title: Endothelial Vulnerability in ICI-Myocarditis Inflammation

Samantha Conte [a,b,c], Isaure Firoaguer[a,b,c], Simon Lledo [a,b,c], Thi Thom Tran [a,b,c], Claire El Yazidi [b,d], Stéphanie Simoncini [a], Zohra Rebaoui [a,b,c], Claire Guiol [a], Christophe Chevillard [b,c,e], Régis Guieu [a], Denis Puthier [b,c,e,f,g], Franck Thuny [a,b,c,h], Jennifer Cautela [a,b,c,h] and Nathalie Lalevée [a,b,c]

[a] Aix Marseille Univ, INSERM, INRAE, C2VN, Marseille, France
[b] MarMaRa Institute, Marseille, France
[c] ICI Institute, Marseille, France
[d] Aix Marseille Univ, INSERM, MMG, Marseille, France
[e] Aix Marseille Univ, INSERM, TAGC, Marseille, France
[f] Turing Centre for Living systems, Marseille, France
[g] Transcriptomics and Genomics Marseille Luminy (TGML), Marseille, France
[h] Aix-Marseille Univ, University Mediterranean Center of Cardio-Oncology, Unit of Heart Failure and Valvular Heart Diseases, Department of Cardiology, North Hospital, Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille, Marseille, France

Total word count: 8193

Financial support:
This work received support from Fédération Française de Cardiologie (research funding 2018); Fédération Française de Cardiologie & Fondation Coeur et Recherche (Heart and Cancer 2020 funding); French Ministry of Higher Education and Research. (PhD Fellowships for TTT et SC); PACA-INSERM South Region (Emploi Jeune Doctorant for ZR); French government under the France 2030 investment plan, as part of the Initiative d' Excellence d' Aix-Marseille Université - A*MIDEX (AMX-19-IET-007) through the Marseille Maladies Rares Institute (MarMaRa) (for SC, SL, TTT, DP, LN); the Aix-Marseille University Excellence Initiative - A*MIDEX (Health Chair CMA-CGM for SL). This work has no relationships with industry.

Address for correspondence:
Nathalie LALEVEE
C2VN (AMU - INSERM 1263 - INRAE 1260)
Aix-Marseille Université - Campus Santé Timone -Faculté de Pharmacie
27, Bd Jean Moulin, 13005 Marseille
Tél. +33(0) 491.835 549
E-mail address: nathalie.lalevee@univ-amu.fr

Tweet summarizing:
hiPSC-derived models show that endothelial cells, not cardiomyocytes, are more vulnerable to cytokines seen in ICI-myocarditis. Findings highlight NLRP3 inflammasome activation and suggest endothelial dysfunction as a key driver of ICI-M pathogenesis.
#Immune-mediatedMyocarditis, #CardiacIPSC, #Inflammasome

Abstract

Background: Inflammatory cytokines, particularly interferon-γ (IFN-γ), are markedly elevated in the peripheral blood of patients with immune checkpoint inhibitor-induced myocarditis (ICI-M). Endomyocardial biopsies from these patients also show GBP-associated inflammasome overexpression. While both factors are implicated in ICI-M pathophysiology, their interplay and cellular targets remain poorly characterized.
Objectives: To elucidate how ICI-M-associated cytokines affect the viability and inflammatory responses of endothelial cells (ECs) and cardiomyocytes (CMs), using human induced pluripotent stem cell (hiPSC)-derived models.
Methods: ECs and CMs were differentiated from the same hiPSC line derived from a healthy donor. Cells were exposed either to IFN-γ alone or to an inflammatory cytokine cocktail (CCL5, GZMB, IL-1β, IL-2, IL-6, IFN-γ, TNF-α). We assessed large-scale transcriptomic changes via microarray and evaluated inflammatory, apoptotic, and cell death pathways at cellular and molecular levels.
Results: hiPSC-EC were highly sensitive to cytokine exposure, displaying significant mortality and marked transcriptomic changes in immunity- and inflammation-related pathways. In contrast, hiPSC-CM showed limited transcriptional changes and reduced susceptibility to cytokine-induced death. In both cell types, cytokine treatment upregulated key components of the inflammasome pathway, including regulators (*GBP5*, *GBP6*, *P2X7*, *NLRC5*), a core component (*AIM2*), and the effector *GSDMD*. Increased GBP5 expression and CASP-1 cleavage mirrored the findings found elsewhere in endomyocardial biopsies from ICI-M patients.
Conclusions: This hiPSC-based model reveals a distinct cellular sensitivity to ICI-M-related inflammation, with endothelial cells showing heightened vulnerability. These findings suggest a central role for endothelial dysfunction in the pathogenesis of ICI-induced myocarditis.

Keywords: Inflammatory cytokines; hiPSC-EC; hiPSC-CM; Immune-mediated myocarditis; Inflammasome; Apoptosis

Introduction

Aberrant cytokine release by activated immune cells, particularly in the context of cancer immunotherapy, is a critical driver of immune-mediated myocarditis. Pro-inflammatory cytokines secreted by leukocytes and other immune effector cells, orchestrate inflammatory cascades that underlie both autoimmune and cardiovascular pathologies [1]. The advent of immune checkpoint inhibitors (ICIs) has revolutionized cancer therapy by reactivating the immune system ability to recognize and attack tumors. These monoclonal antibodies inhibit receptor-ligand interactions that suppress T cell activation, thereby enhancing immune responses. However, disruption of immunological self-tolerance can lead to side effects such as inflammation and immune-related adverse events (irAEs) [2]. Among these, cardiovascular disorders such as vasculitis, pericarditis, arrhythmias, and myocarditis represent severe complications, often associated with high mortality [3,4]. In cases of ICI-induced myocarditis, specific pathogenic immune cell subsets exhibiting distinct transcriptional profiles, including upregulation of chemokines like CCL5, CCL4, and CCL4L2, have been identified [5]. Elevated circulating levels of TNF-α, IFN-γ, GM-CSF, IL-1α, IL-1β, and IL-6, have also been reported in cancer patients with irAEs [6–8]. However, their utility in monitoring ICI-induced myocarditis remains limited [6,9].

The diagnosis of ICI-induced myocarditis currently relies on endomyocardial biopsy and the detection of myocardial immune cell infiltrates. However, the underlying pathophysiological mechanisms remain poorly understood [10,11]. Patients receiving ICI therapy exhibit varying grades of inflammatory infiltrate, which may or may not be accompanied by cardiomyocyte loss [12]. Transcriptomic analyses of myocardial biopsies from patients with ICI-induced myocarditis showed transcriptional changes including the upregulation of IFN-γ-responsive pathways. In particular, guanylate-binding proteins GBP5 and GBP6 were significantly increased at both the RNA and protein levels [13]. IFN-γ is known to promote PD-L1 expression

on cardiac cells as a compensatory mechanism to limit excessive $CD8^+$ T cell activity [14,15]. These findings point toward a potential involvement of the NOD-like receptor family, pyrin domain-containing 3 (NLRP3) inflammasome in the pathogenesis of ICI-induced myocarditis, a mechanism that appears distinct from that observed in viral myocarditis [13].

GBP proteins play a pivotal role in promoting the assembly of the NLRP3 inflammasome. Inflammasomes are sensory complexes that detect infections or tissue damage and initiate inflammatory responses by activating caspase-1, which in turn triggers the maturation and secretion of interleukins IL-1β and IL-18 [16]. In healthy myocardial tissue, the low expression level of NLRP3 components is insufficient to support inflammasome assembly or activation. The initial step in NLRP3 activation requires transcriptional priming, often mediated by NF-κB signaling in response to stimuli such as pro-inflammatory cytokines [17,18]. Within the heart, activation of the NLRP3 inflammasome in monocytes, fibroblasts, and endothelial cells leads to robust secretion of IL-1β. In contrast, activation within cardiomyocytes primarily results in IL-18 release and induction of pyroptosis, a form of inflammatory cell death driven by caspase-1 activation [19].

Previous studies have highlighted key mechanisms underlying immune toxicity, including the release of pro-inflammatory cytokines by ICI-activated T cells within myocardial tissue [5,6,8,10,12,13,20]. However, the diagnosis of immune-related myocarditis remains particularly challenging, and a deeper understanding of its pathophysiology is essential to improve both diagnostic accuracy and therapeutic strategies. While preclinical models have proven invaluable in addressing cardiovascular side effects of ICI therapy, they poorly enable to address the specific mechanisms driving immune-related myocarditis [21]. Moreover, only a limited number of studies have explored the cellular and molecular basis of ICI-induced myocarditis in humans. This is largely due to practical and ethical limitations: large-scale collection of fresh human cardiac tissue is not feasible, and primary human cardiomyocytes are

difficult to access. Additionally, endomyocardial biopsies, although informative, are invasive, carry procedural risks, and suffer from low diagnostic sensitivity, further limiting in-depth mechanistic investigations.

Recent advances in the generation of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) and their differentiation into cardiac cells offer a scalable and human-relevant alternative to traditional models [22,23]. Despite this progress, cellular models specifically tailored to study immune-mediated myocarditis remain scarce, and research has predominantly focused on the cardiomyocyte component, often neglecting the multicellular complexity of the myocardium. Recently, Jensen et al., developed and characterized a tissue culture–based model of myocarditis using hiPSC-derived cardiomyocytes and PBMCs from multiple healthy donors. Upon exposure to ICIs, this model enabled to reproduce key pathological features such as cardiomyocyte necrosis, sarcomere disruption, and arrhythmogenic changes, offering new avenues to investigate disease mechanisms in a controlled and reproducible human-based system [24].

To our knowledge, no cellular model of myocarditis has been developed to simultaneously address both cardiomyocyte and endothelial cell properties. Yet, endothelial cells play a critical role in the inflammatory response and are known to exhibit high apoptotic priming throughout life, making them particularly vulnerable to inflammatory insults [25,26]. As a consequence, endothelial toxicity represents a key feature of anticancer therapies, with specific vascular-damaging effects [26]. In the context of immune-mediated myocarditis, a deeper understanding of the mechanistic alterations occurring within the endocardial and microvascular endothelium is essential, particularly in relation to immune cells infiltration and local cytokine release. Preserving or restoring endothelial integrity could prove crucial in mitigating cardiac damage. This study aims to explore the transcriptional and cell death responses induced by inflammatory cytokines, primarily IFN-γ, which are found at elevated levels in both myocardial biopsies and

peripheral blood of patients with ICI-induced myocarditis. By assessing markers of inflammation, apoptosis, and pyroptosis, we also directly compared the effects of cytokine exposure on endothelial cells and cardiomyocytes derived from the same hiPSC clone enabling assessment of cell-type-specific responses.

Methods

Biologic samples and cell culture

The human induced pluripotent stem cell (hiPSC) clone ECT-06 was established by the cell reprogramming and differentiation facility (MaSC) of the Marseille Medical Genetics Institute (MMG-UMR 1251), from skin fibroblasts from a healthy male donor (aged 69). After characterization, fibroblasts were deposited in a human cell biobank under the reference AG16102 (https://www.coriell.org/0/Sections/Search/Sample_Detail.aspx?Ref=AG16102&Product=CC). iPSC clone was derived from primary fibroblasts generated after transfection of different vectors by electroporation (pCXCLE-hOCT3/4-shp53-F (Addgene ref 27077), pCXLE-hSK (Addgene, ref 27078, encoding *SOX2* and *KLF4*), pCXLE-hUL (Addgene,ref 27080, encoding *L-Myc* and *LIN28*). Human iPS (hiPSC) colonies were picked 4 to 6 weeks after transfection based on their ES cell-like morphology. Colonies were grown and expanded in mTeSR1 medium (StemCells) on Matrigel (Corning) coated dishes. The ECT-06 clone was fully characterized using classical procedures recommended by the ISCCR, such as expression of pluripotency markers, absence of expression of the reprogramming transgenes, phosphatase alkaline staining and karyotype for checking the absence of chromosomal abnormalities.

hiPSC were cultured in mTeSR1 medium (STEMCELL Technologies) on Matrigel-coated plates. Cells were dissociated every 5–6 days using Versene (ThermoFisher Scientific). Prior to differentiation, cells were dissociated with Gentle Cell Dissociation reagent (STEMCELL Technologies) supplemented with RevitaCell (ThermoFisher Scientific). HiPSC-derived

cardiomyocytes (hiPSC-CM) were generated using the STEMdiff™ Ventricular Cardiomyocyte Differentiation and Maintenance Kit (STEMCELL Technologies) according to the manufacturer's instructions. At day 15 of differentiation (D15), cells were dissociated and cultured in Maintenance medium (STEMCELL Technologies) on Matrigel. hiPSC-derived endothelial cells (hiPSC-EC) were generated using the STEMdiff™ Endothelial Differentiation Kit (STEMCELL Technologies). Following differentiation, hiPSC-EC were dissociated weekly using TrypLE and cultured on 0.01% gelatin in MV2 medium supplemented with 25 ng/mL VEGF. Assays were performed on hiPSC-CM at day 28 of differentiation (D28) and on hiPSC-EC at passage 4. AC16 cells (Merck) were cultured in DMEM/F-12 medium (ThermoFisher Scientific) supplemented with 12.5% FBS. Dissociation was performed using TrypLE (ThermoFisher Scientific). Human cardiac microvascular endothelial cells (HCMEC) were cultured in MV2 medium (PromoCell) and dissociated with Accutase (ThermoFisher Scientific).

Cell treatment

Cells were treated with pro-inflammatory molecules either by single treatment with IFN-γ (10 ng/mL, Miltenyi Biotec) for 48h or 72h, or by CCL5 (10 ng/mL, BioLegend), IL-1β (10 ng/mL, BioLegend), IL-2 (2 ng/mL, Miltenyi Biotec), IL-6 (10 ng/mL, BioLegend) for 48h, or by a combined cytokine cocktail including CCL5, IL-1β, IL-2, IL-6, IFN-γ (same concentrations) as well as GZMB (5 ng/mL, Merck) and TNF-α (5 ng/mL, Miltenyi Biotec) for 48h. Camptothecin (3 µg/mL, Merck) was used at as a positive control for caspase activation.

RNA extraction

Total RNA was extracted using the RNeasy® Mini Kit (QIAGEN) after homogenization with QIAshredder columns (QIAGEN). RNA was treated with DNase I (QIAGEN) following the manufacturer's instructions. The concentration of RNA was determined by reading the absorbance at 260 nm using a NanoDrop (ND-1000, ThermoScientific). The ratio of A260/280 in all the RNA samples ranged from 1.8 to 2.0. The quality was confirmed using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) with Agilent RNA 6000 Nano Chips. Samples with a RIN higher than 8 were used in microarray or qPCR experiments.

Microarray

Gene expression was measured using a SurePrint G3 Human Gene Expression v3 8x60K Microarray Kit (Agilent Technilogies) containing 629,976 oligonucleotide probes representing 44,782 genes. Total RNAs (200 ng) were labelled with cyanine 3-CTP using a Low RNA Input Quick Amp Labelling, One color Kit according to the manufacturer's protocol (Agilent Technologies, CA, USA). For each reaction, the cRNA yield and specific activity of cRNA were determined using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer. Only the cRNAs with yields of > 0.9 μg and specific activities > 6.0 pmol of dye per microgram of cRNA were used for hybridization. The labelled cRNAs were hybridized to microarray slides (eight arrays per slide) following the Agilent One-Color microarray-based gene expression analysis protocol (Agilent Technologies). The slides were scanned (8 × 60K array slides at 3 μm resolution) using an Agilent DNA microarray scanner (G2505C) and colour setting set to Agilent G3_GX_1 protocol. The scanned images were analysed using Feature Extraction Software 10.5 (Agilent). In total, 12 raw data files (3 arrays for hiPSC-CM CTRL and 3 arrays for hiPSC-CM IFN, 3 arrays for hiPSC-EC CTRL and 3 arrays for hiPSC-EC IFN) were obtained using the Agilent Feature Extraction Software. The raw intensities were exported in Excel format and converted in logarithmic scale (base 2). Quantile normalisation was applied using RStudio to correct for

global intensity and dispersion. Then, a stringent filtering was applied to retain only the probes that showed a signal above background in all three technical replicates of at least one experimental condition (CTRL or IFN), for any cell type. After removal of internal control probes (spike-ins), this resulted in 128 retained probes in hiPSC-CM and 995 retained probes in hiPSC-EC. To detect significant variation in gene expression between groups (hiPSC-CM CTRL *vs* IFN and hiPSC-EC CTRL *vs* IFN), the significance analysis of microarrays (SAM) method was used, with 10,000 permutations applied and a false discovery rate (FDR) set to 0%. Hierarchical clustering of differentially expressed genes (DEGs) was achieved using the TM4 Microarray Software Suite V4.9 (http://mev.tm4.org. Distance was computed based on Pearson's correlation coefficient and agglomerative criteria was set to "average". Cell type-related differences in common and specific DEGs with IFN-γ stimulation were assessed through list comparisons performed in Excel. For biological interpretation of the gene expression data, functional enrichment analyses of up- and down-regulated genes were performed using g:profiler [27]. Biological processes, cellular components and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways were considered significantly enriched when adjusted p-value (Benjamini-Hochberg) was below 0.05.

Cell Viability Assays

Cell viability was assessed using the Deep Blue Cell Viability™ kit (BioLegend) according to the manufacturer's instructions. Fluorescence was measured using a GloMax® Discover system (Promega) (excitation: 520 nm; emission: 580–640 nm).

Real-Time Quantitative PCR (qPCR)

Reverse transcription was performed using the SuperScript® VILO™ Master Mix kit (ThermoFisher Scientific). qPCR reactions were performed using the Power SYBR Green Master Mix® (Thermo Fisher Scientific) on a StepOne Plus Real-Time qPCR system (Applied Biosystems). Data were analyzed with StepOne software v2.3 (Applied Biosystems). All the primers used have an efficiency of between 95 and 105% (Supplemental table). Expression levels were normalized using the geometric mean of RPL13A and YWHAZ as reference genes. -ΔCT values were calculated for statistical analysis.

Flow Cytometry

hiPSC-derived CM and EC differentiation was characterized by quantifying specific proteins: Troponin T2 and myosin heavy chain for hiPSC-CM, and CD31 and VE-Cadherin for hiPSC-EC. hiPSC-CM were fixed and permeabilized using the eBioscience™ Transcription Factor Staining Buffer Set (ThermoFisher Scientific). Samples with >80% positive cells for specific markers were used for studies. Expression of MHC-I (Miltenyi Biotec), MHC-II (Miltenyi Biotec), and PD-L1 (Miltenyi Biotec) was quantified. Cell viability was monitored using ViaKrome 808 Fixable Viability Dye (Beckman Coulter) for hiPSC-CM, and Viobility 405/452 Fixable Dye (Miltenyi Biotec) for hiPSC-EC, AC16, HCAEC, and HCMEC. Caspase-3/-7 activity was measured using the CellEvent™ Caspase-3/7 kit (ThermoFisher Scientific) in living and dying cells identified using the LIVE/DEAD™ Fixable Dead Cell Stain Kit (ThermoFisher Scientific).

Immunofluorescence Staining

hiPSC-EC and hiPSC-CM were seeded on Lab-Tek 8 chambers coated using 0.1% gelatin and matrigel, respectively. Cells were fixed using 4% paraformaldehyde (PFA), permeabilized using 0.2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich), and blocked using bovine serum albumin (Merck). hiPSC-EC were characterised using primary antibodies against CD31 (Polyclonal rabbit IgG, 1:200, Proteintech) and vWF (Monoclonal mouse IgG, 1:100, Proteintech). hiPSC-CM were characterised using primary antibodies against TNNT2 (Monoclonal mouse IgG1, 1:200, ThermoFisher Scientific) and Ki67 (Polyclonal rabbit IgG, 1:500, PA5-16785, ThermoFisher Scientific). hiPSC-EC and hiPSC-CM treated using IFN-γ or cytokine cocktail, we addressed two inflammasome-related proteins: Caspase-1/p20/p10 (rabbit polyclonal IgG, 1:100, Proteintech) and GBP5 (rabbit polyclonal IgG, 1:200, Proteintech). Secondary antibodies used were Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG (1:1000, Thermo Fisher Scientific) and Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (1:1000, Thermo Fisher Scientific). Images were acquired using a Zeiss Axio Observer microscope and analysed using ZEN Blue software (v3.7.97.03000, Carl Zeiss).

Statistical analysis

Data are expressed as mean ± standard deviation (SD). Significant differences between groups were determined using an unpaired t-test, with Welch's correction applied when appropriate, using GraphPad Prism software (GraphPad Prism 9.0, La Jolla, CA, USA). A p-value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Characterization of hiPSC-derived EC and CM

To investigate how inflammatory molecules from the immune infiltrate affect cardiac cells, we used the same hiPSC clone from a healthy donor to generate both endothelial cells and cardiomyocytes, minimizing potential biases associated with donor variability or the use of primary cardiac cell lines and cultures. We first characterized the subpopulations obtained after differentiation. In the hiPSC-derived endothelial cell (hiPSC-EC) cultures, most cells (90±5%) expressed CD31 and VE-cadherin. All of these also expressed endoglin (CD105) and CD54, a capillary-specific marker of vascular ECs (Figure 1A). The cells displayed a typical spindle shape and network organization. Immunostaining confirmed CD31 localization at the plasma membrane and cytosolic expression of vWF, a vascular endothelial marker (Figure 1B). The endocardium, which interfaces with both the bloodstream and sub-endocardial conducting cells, plays a critical role in immune cell infiltration during immune-mediated myocarditis, leading to conduction disorders. Among the hiPSC-EC subpopulations, approximately 60% expressed endocardial markers such as CD44 (aortic valve component) and integrin α9 (ITGA9) (Figure 1A). In hiPSC-derived cardiomyocyte (hiPSC-CM) cultures, spontaneous beating was observed 8–10 days post-differentiation (33±7 bpm, N=9). The majority (85±3%) expressed TNNT2, and most $TNNT2^{+}$ cells (81±4%) also expressed myosin heavy chain (MYH), indicating a high degree of maturation. Among MYH^{+} cells, 53±15% expressed atrial myosin light chain, 23±24% expressed the ventricular form, and 15±17% co-expressed both (Figure 1C). Morphologically, the cells showed syncytial organization and prominent sarcomeres. Only a few $Ki67^{+}$ cells remained undifferentiated (Figure 1D).

Transcriptomic effect of IFN-γ in hiPSC-derived cardiac cells

IFN-γ is a cytokine released during inflammation that activates multiple signaling pathways, including Toll-like receptor (TLR) and MHC-associated immune pathways. In myocarditis, IFN-γ induces PD-L1 overexpression. To mimic this inflammatory environment, we treated hiPSC-EC and hiPSC-CM with IFN-γ (10 ng/ml, 72h).

We analyzed transcriptomic changes post-treatment. In hiPSC-EC, we identified 1201 differentially expressed genes (DEGs): 863 upregulated and 338 downregulated (Figure 2A, B; Supplemental Table – Gene lists). In contrast, hiPSC-CM showed only 91 DEGs, with 90 upregulated and 1 downregulated gene, none associated with significant biological processes (Figure 2A, B and Supplemental Table – Gene lists). Both cell types shared 80 upregulated DEGs related to immune processes (Figure 2A, B and Supplemental Table – FunctAnnot – Common Up-reg genes). In hiPSC-EC, enriched biological processes included immune responses, IFN-γ signaling, inflammasome activation, cell death, metabolism, and inflammatory signaling (Figure 2C). Cell death, apoptosis, proliferation, development, and migration processes were also specific to ECs (Figure 2C). Downregulated genes in ECs were mainly linked to cell adhesion and communication (Supplemental Table – FunctAnnot – EC Down-reg genes).

We then focused on three main biological processes (Figure 3): immunity/inflammation, cell death, and adhesion. Most transcriptional changes occurred in hiPSC-EC. For immunity/inflammation, *Programmed Cell Death 1 Ligand 1 and 2* (*PD-L1/PD-L2*) and *Interleukin 1 Receptor* (*IL-1R*) were upregulated. *IL-1R* is associated with the *Mitogen-Activated Protein Kinase* (*MAPK pathway*). We also observed overexpression of *Major Histocompatibility Complex I and II* (*MHC-I/II*) and *Toll-Like Receptor 4* (*TLR4*), linked to *Nuclear Factor-kappa B* (*NF-κB*) signaling, and upregulation of the *Janus Kinase Signal Transducer and Activator of Transcription* (*JAK/STAT*) pathway. These pathways converge to

activate *Interferon Regulatory Factors* (*IRF*)*1, 7, 8, and 9*, which regulate vascular permeability and promote immune cell infiltration [28].

Infiltration can be also enhanced by overexpression of *Intercellular Adhesion Molecule 1* (*ICAM-1)* and *Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 1* (*CEACAM1)*, which facilitate leukocyte adhesion and transmigration, as well as *Collagen type XIII alpha 1 chain* (COL13A1), potentially contributing to inflammation. These transcriptional changes are indicative of disrupted endothelial function [28] and were associated with increased production of inflammatory cytokines: *C-X-C motif Chemokine ligand 9, 11 and 16* (*CXCL9/11/16*), *C-X3-C motif Chemokine ligand 1* (*CX3CL1*), *C-C motif Chemokine ligand 2 and 8* (*CCL2/8*), *Interleukine alpha* (*IL-1A*), and *Granzyme A* (GZMA).

In hiPSC-CM, transcriptional changes were modest. However, *MHC-I* and *STAT1* were upregulated, activating *IRF8* and *IRF9*, and inducing *CXCL9* expression, suggesting leukocyte migration into the myocardium. *CEACAM1* was also upregulated, though its cardiac role remains unclear [29].

In the analysis of cell death and inflammatory signaling pathways, hiPSC-EC demonstrated a distinct upregulation of *Absent in Melanoma 2* (*AIM2*), a key cytosolic DNA sensor and inflammasome activator. This *AIM2* overexpression, not observed in hiPSC-CM, highlights a potential endothelial-specific immune response to cytoplasmic DNA stress. In addition, hiPSC-EC also showed exclusive increases in *Fibroblast Activated Sequence / Caspase 10* (FAS/CASP10), GBP4, P2RX7, and TXNIP, implicating both apoptotic and inflammasome pathways. In both cell types, several NLRP3-related regulators were upregulated, including *Guanylate-binding proteins* (*GBP*) *1*, *GBP2*, *GBP3*, *GBP5*, and *NLR Family CARD Domain Containing 5* (*NLRC5)*, the latter acting as a shared modulator of NLRP3/AIM2 activity and NF-κB signaling.

This transcriptional priming led to *Caspase 1* (*CASP-1*) overexpression in both cell types. However, expression of downstream inflammasome effectors, *Gasdermin* (*GSDM) B/D* and *Interleukin 1 beta* (*IL-1β*), was restricted to hiPSC-EC (Figure 3). CASP-1 cleaves GSDMD, whose N-terminal domain forms membrane pores, triggering pyroptosis. IL-1β release promotes acute inflammation [30]. These results show that IFN-γ treatment induces activation of inflammation and cell death in both cell types although at the transcriptional level, activation occurs predominantly in hiPSC-EC.

Effect of IFN-γ and Cytokine Cocktail on Cell Mortality and Inflammatory Pathways

To mimic the inflammatory environment found in myocardium from patients with post-ICI immune-mediated myocarditis, we exposed hiPSC-EC and hiPSC-CM to a cocktail of inflammatory cytokines identified in patient plasma/serum and biopsies [5,6,8,9,13]. We first optimized the concentration of each cytokine by evaluating their effects on cell viability and expression of PD-L1 and MHC-I in hiPSC-EC, hiPSC-CM, and AC16 ventricular cardiomyocytes (Supplemental Figures 3 and 4). For each cytokine, we selected the concentration that enhanced PD-L1 and MHC-I expression while maintaining moderate mortality (20–30%). The final cytokine cocktail included: IL-1β, IL-6, CCL5, and IFN-γ (10 ng/ml each), IL-2 (2 ng/ml), and TNF-α and GZMB (5 ng/ml each).

We then compared cellular responses to IFN-γ alone versus the cytokine cocktail. Both treatments induced a trend toward increased PD-L1 and MHC-I expression in hiPSC-EC and hiPSC-CM. However, due to the variability in responses, differences were not statistically significant (Figure 4A, B). We next assessed cell mortality. In hiPSC-EC, IFN-γ alone caused substantial cell death (45±9%), whereas hiPSC-CM remained unaffected. The cytokine cocktail had no effect on hiPSC-CM viability but significantly increased hiPSC-EC mortality (89±7%), nearly doubling that observed with IFN-γ alone (Figure 4C, D). These experiments were also

conducted using AC16 cardiomyocytes and primary cardiac microvascular endothelial cells (HCMEC), confirming similar responses as seen with hiPSC-derived cells (Supplemental Figure 1A, B).

Effect of IFN-γ and Cytokine Cocktail on NLRP3 Inflammasome Regulation

We first examined IFN-γ-induced upregulation of NLRP3 inflammasome-associated transcripts using qRT-PCR, followed by testing with the cytokine cocktail. In hiPSC-EC, *GBP5* and *GBP6* expression increased with IFN-γ; *GBP5* was further upregulated by the cocktail (Figure 5). In hiPSC-CM, IFN-γ induced a trend toward increased *GBP5/GBP6*, with *GBP5* reaching significance after cytokine cocktail treatment (Figure 5).

At the protein level, immunostaining revealed GBP5-positive perinuclear vesicles under control conditions in both cell types. After IFN-γ treatment, 40±16 % of hiPSC-EC and 7±5 % of hiPSC-CM exhibited strong cytosolic GBP5 expression. The cytokine cocktail further increased this effect (73±46% in hiPSC-EC, 17±11 % in hiPSC-CM), coinciding with elevated mortality in hiPSC-EC (Figure 6).

P2X7 mRNA levels increased in hiPSC-EC with IFN-γ, but the cytokine cocktail had no further effect. In hiPSC-CM, IFN-γ increased *P2X7* expression, while the cocktail reduced it (Figure 5). Similar patterns were observed in AC16 cardiomyocytes. In contrast, primary HCMEC endothelial cells consistently upregulated *P2X7* in both conditions (Supplemental Figure 2). Transcriptomic analysis did not detect *P2X7* changes in hiPSC-CM post-IFN-γ (Figure 2), likely due to stringent FDR criteria excluding variable replicates. NLRC5 was upregulated by IFN-γ in both hiPSC-EC and hiPSC-CM, with no additional effect from the cytokine cocktail (Figure 5). *NLRP3* expression remained unchanged regardless of treatment or cell type (Figure 5), consistent with transcriptomic data (Figure 3). *AIM2* was upregulated by IFN-γ in hiPSC-EC and slightly more so with the cytokine cocktail; a similar trend was seen in hiPSC-CM

(Figure 5). *GSDMD* expression increased in both cell types after IFN-γ, with no further change from cytokine cocktail treatment (Figure 5).

Together, these results support the data obtained from the transcriptomic analysis, indicating that most inflammasome-related changes are driven by IFN-γ. Only *AIM2* and *GBP5* were further enhanced by the cytokine cocktail in both cell types. *P2X7* displayed a differential response in hiPSC-CM, with IFN-γ inducing and the cocktail suppressing its expression.

Effect of IFN-γ and Cytokine Cocktail on Caspase Activity

To identify mechanisms of cytokine-induced cell death, particularly in hiPSC-EC, we assessed caspase activation. CASP-1, activated by the NLRP3 inflammasome, drives pyroptosis. Immunostaining showed IFN-γ strongly increased cleaved CASP-1 levels in both hiPSC-EC and hiPSC-CM (139 % and 61 %, respectively), with further elevation in hiPSC-EC after cytokine cocktail exposure (467 %) (Figure 7). Importantly, expression was substantially higher in hiPSC-EC than in hiPSC-CM (Figure 7B).

Apoptosis, a non-inflammatory form of programmed cell death, involves CASP-3/-7. We measured their activity separately in living (membrane intact) and dying (membrane permeable) cells. In hiPSC-CM, basal CASP-3/-7 activity was low (<10%), and IFN-γ did not affect it. However, cytokine cocktail treatment significantly increased activity, reaching 20%, including 12% dying cells, consistent with the modest mortality observed (Figure 4D, Figure 7B).

In hiPSC-EC, CASP-3/-7 activity remained around 20–22% across conditions. However, while IFN-γ had little effect, the cytokine cocktail induced a strong rise in dying cells showing CASP-3/-7 activation, reaching levels comparable to camptothecin treatment, a potent apoptosis inducer via DNA topoisomerase I inhibition (Figure 7B). After cytokine cocktail exposure, 46 ± 20% of hiPSC-EC showed CASP-3/-7 activity, with 89 ± 7% undergoing cell death.

These findings suggest that cytokine-induced death in endothelial cells involves both apoptotic (caspase-dependent) and non-apoptotic (caspase-independent) mechanisms. In contrast, cardiomyocyte death remains limited and is primarily apoptotic when it occurs.

Discussion

In this study, we investigate the responses of cardiomyocytes and endothelial cells to pro-inflammatory cytokines implicated in immune-mediated myocarditis [5,6,8,20,31,32]. To enable an unbiased comparison, both cell types were derived from the same hiPSC clone, eliminating confounders related to genetic background or cell origin and attributing observed differences solely to cell-type-specific cytokine responses. A key advantage of using hiPSC-derived cardiac cells lies in their capacity to reflect cardiac phenotypic diversity. The hiPSC-CM population includes atrial- and ventricular-like subtypes, allowing assessment of chamber-specific responses. Similarly, hiPSC-EC displayed distinct vascular identities. We identified subpopulations expressing markers such as CD105 and CD54, enriched in blood capillaries; ITGA9, specific to endocardial cells; and CD44, notably expressed in the aortic valve [33–35]. This model therefore provides a pathophysiologically relevant platform that partially recapitulates the cellular and tissue-specific features of the human myocardium, supporting investigation into cell-type-specific responses during immune-mediated myocardial inflammation.

To model the inflammatory environment of immune-mediated myocarditis, we designed a cytokine cocktail composed of pro-inflammatory mediators commonly implicated in this condition: IL-1β, IL-2, IL-6, IFN-γ, TNF-α, and granzyme B [6–8]. Among these, IFN-γ emerged as a central cytokine in the context of immune-mediated cardiac inflammation. Finke et al. showed significant upregulation of the IFN-γ response pathway in endomyocardial biopsies from patients with immune-mediated myocarditis. In particular, GBP5 and GBP6 were elevated in these samples compared to viral myocarditis, and absent in biopsies from patients with

dilated cardiomyopathy [13]. The pathogenic role of IFN-γ has been reinforced by multiple studies, both in patient cohorts and preclinical models of immune checkpoint inhibitor (ICI)-induced myocarditis, highlighting its role in cardiac immune toxicity [3,10,14,31,36]. Given its central role, we conducted a focused transcriptomic analysis of hiPSC-derived cardiomyocytes and endothelial cells treated with IFN-γ alone, and compared the responses to those elicited using a cytokine cocktail. Strikingly, the gene expression profiles indicated that IFN-γ was the predominant driver of the transcriptional changes observed.

Our findings demonstrate that endothelial cells are markedly more sensitive than cardiomyocytes to inflammatory cytokines. hiPSC-EC underwent extensive transcriptomic remodeling, especially in response to IFN-γ, whereas hiPSC-CM showed fewer gene expression changes, lower apoptosis rates, and reduced cell death.

In hiPSC-EC, IFN-γ activated key immune and inflammatory pathways, including MAPK, NF-κB, and JAK/STAT cascades, which converge on interferon regulatory factors (IRFs). These regulators influence vascular permeability by modulating inflammatory mediators and endothelial adhesion molecules [37]. Accordingly, we observed upregulation of ICAM-1 and CEACAM1, two key mediators of leukocyte adhesion and transendothelial migration. This pro-inflammatory shift was accompanied by disrupted intercellular communication and increased production of diverse cytokines and chemokines, consistent with an activated endothelial phenotype. Importantly, several of these transcriptional changes mirror those identified in single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) datasets from cardiac biopsies of patients with ICI-M [38]. Specifically, CXCL9, CXCL11, GBP4/5, and STAT1 were enriched in capillary and inflamed endothelial subsets, while STAT1, CX3CL1, and ICAM1 were also upregulated in cardiomyocytes. In ICI-treated $Ldlr^{-/-}$ mice, endothelial VCAM-1 and ICAM-1 were similarly upregulated in the arterial endothelium, potentially facilitating T cell recruitment and accelerating atherosclerotic plaque progression [39]. In another murine model, LAG3 inhibition

led to increased IFN-γ production by T cells within plaques, suggesting that checkpoint blockade amplifies local inflammation and promotes plaque destabilization [40]. These results support the translational relevance of our model, indicating its capacity to mimic critical aspects of immune-mediated endothelial and cardiac dysfunction observed in clinical settings.

Apoptosis is a regulated, non-inflammatory form of cell death mediated primarily by caspase-3 and -7 (CASP-3/-7), which induce cell death via proteolysis of structural and regulatory proteins. In our study, while CASP-3/-7 transcript levels remained unchanged in hiPSC-EC, IFN-γ treatment induced marked upregulation of upstream apoptotic regulators FAS and CASP-10, suggesting activation of the extrinsic death receptor pathway. Despite no increase in CASP-3/-7 activity under IFN-γ alone, cell mortality reached nearly 50%, indicating that caspase activity is not the cause of cell death. Conversely, cytokine cocktail treatment strongly elevated CASP-3/-7 activity, associated with a much higher mortality rate approaching 90%. However, elevated CASP-3/-7 activity was also observed under control conditions, possibly due to mechanical stress (e.g., cell detachment) during sample preparation, which may have activated apoptotic pathways. These results suggest that clinically relevant concentrations of inflammatory cytokines, especially IFN-γ, can inflict significant endothelial injury in myocardial tissues, including the endocardium and microvasculature. This disruption likely contributes to the creation of a pro-inflammatory environment surrounding cardiomyocytes, thereby promoting their functional impairment. In contrast, hiPSC-CM appeared more resilient. IFN-γ induced only modest inflammatory transcriptional changes, without significant increases in CASP-3/-7 activity or cell death. Even under cytokine cocktail exposure, although CASP-3/-7 activity rose, cell mortality remained low. These observations align with the findings of Jensen et al., who showed that hiPSC-CM cultured in a cytokine-rich medium from activated PBMCs (stimulated with anti-CD3/CD28 and ICIs) maintained normal beating frequency and rhythm, without functional impairment [24]. This differential sensitivity between cell types may

reflect intrinsic developmental programs. Somatic cells like cardiomyocytes are primed for apoptosis early in life but acquire resistance in adulthood, limiting caspase-mediated death under stress [41]. In contrast, endothelial cells remain sensitive to apoptosis throughout life, making them particularly vulnerable to inflammatory or cytotoxic insults, including those associated with anticancer therapies [26].

The NLRP3 inflammasome and IL-1 cytokines are central to the development and progression of cardiovascular diseases, including inflammatory heart conditions. NLRP3 activation has been implicated in myocardial injury, adverse remodeling, and heart failure [42]. Regardless of the trigger, viral, autoimmune, or chemotherapy-induced, many inflammatory cardiac diseases converge on NLRP3 activation and the release of pro-inflammatory cytokines such as IL-1β and IL-18. Clinically, NLRP3 activity correlates with disease severity, particularly in cardiac transplant rejection, where its expression rises with the grade of rejection [43]. These findings highlight the potential of the NLRP3-IL-1 axis as both a biomarker and a therapeutic target. Cardiac sarcoidosis illustrates this well. Characterized by non-caseating granulomas infiltrating the heart, it can lead to conduction abnormalities, arrhythmias, and heart failure. Though its cause is unclear, it likely involves an exaggerated immune response in genetically predisposed individuals. Standard treatments rely on glucocorticoids and immunosuppressants, but their long-term efficacy in cardiac involvement is uncertain. Importantly, NLRP3 activation has been detected in myocardial granulomas, suggesting a key role in pathogenesis and supporting IL-1 blockade as a potential targeted therapy for inflammation-driven myocardial damage [43,44].

Given the pivotal role of IFN-γ in inflammasome regulation, we performed transcriptomic analyses in hiPSC-CM and hiPSC-EC. Inflammasome-related transcripts were broadly upregulated in both cell types, with a more pronounced response in hiPSC-EC. Key regulators (*GBP4*, *TXNIP*) and effectors (*GSDMB*, *GSDMD*, *IL-1β*) were induced, highlighting a robust pro-inflammatory response. The purinergic receptor P2X7, a known inflammasome activator,

showed cell-type-specific modulation: in hiPSC-CM, IFN-γ-induced expression was attenuated by the cytokine cocktail, suggesting pathway cross-regulation, whereas this modulation was absent in hiPSC-EC. Previous studies have described the context-dependent regulation of P2X7 by cytokines [45,46].

Across conditions, IFN-γ was the primary driver of inflammasome gene activation. Importantly, *NLRP3* transcript levels remained unchanged, pointing to alternative inflammasome activation. In contrast, *AIM2* emerged as a central mediator: its expression was markedly induced by IFN-γ in hiPSC-EC, further amplified by the cytokine cocktail, and significantly increased in hiPSC-CM. Given its role in sensing cytosolic dsDNA and activating IL-1β, IL-18, and GSDMD, AIM2 likely drives endothelial pyroptosis. This is consistent with reports linking AIM2 to endothelial dysfunction in coronary artery disease [47,48] and inflammation-mediated bone loss following chemotherapy [49]. These findings underscore AIM2 as a key contributor to endothelial inflammatory responses and a potential therapeutic target in inflammation-driven cardiovascular disease.

At the protein level, we observed strong upregulation of GBP5 in both hiPSC-EC and hiPSC-CM following IFN-γ treatment, further amplified by the cytokine cocktail. GBP5 has been reported to be overexpressed in either cardiomyocytes or capillary endothelial cells of patients with immune-mediated myocarditis, depending on the study [13,38]. Despite pronounced GBP5 induction in hiPSC-CM, neither IFN-γ nor the cytokine cocktail led to significant cell death. This aligns with prior observations in murine cardiomyocytes, where NLRP3 activation via CaMKIIδ and NF-κB signaling, induced by angiotensin II, did not cause cytotoxicity. CaMKII-driven transcription of inflammatory genes and inflammasome priming occurred within three hours of exposure, preceding macrophage infiltration [50]. These findings suggest that GBP5 upregulation and early inflammasome activation reflect a priming phase rather than direct toxicity. We assessed CASP-1 activity in both cell types, as it mediates pyroptosis downstream

of NLRP3. In hiPSC-CM, IFN-γ and the cytokine cocktail increased cleavage of CASP-1 compared to controls. In hiPSC-EC, IFN-γ alone induced CASP-1 activation, further enhanced by the cytokine cocktail. This indicates a more pronounced inflammasome response in endothelial cells, consistent with their greater sensitivity to inflammatory stress. These results align with a rat model of myosin peptide–induced myocarditis, where immune cell infiltration and NLRP3 upregulation in cardiac tissue were associated with structural remodeling and electrical alterations in the right ventricular outflow tract. This led to increased arrhythmogenicity via calcium dysregulation and upregulation of inflammatory and Ca^{2+}-handling proteins, including NLRP3 [51].

Similarly, Jensen et al. showed that $CD8^+$ T cells stimulated with αCD3/CD28 impaired hiPSC-CM function, particularly beat period regularity, an effect worsened by ICIs. Interestingly, dexamethasone preserved cardiomyocyte function and viability, whereas IFN-γ neutralization had no protective effect [24].

Altogether, these data support a central role for endothelial injury in the early stages of myocarditis and cytokine-induced cardiotoxicity. Given the pivotal role of the vasculature in maintaining tissue homeostasis, even subtle endothelial dysfunction can profoundly impair organ function.

Study Limitations:

The differentiation of hiPSCs into mature cardiac cell types remains a technically demanding and variable process. To ensure consistency, each differentiation into endothelial cells and cardiomyocytes was stringently characterized by flow cytometry. This step, while essential for quality control, is inherently cell-consuming, particularly for cardiomyocytes, which lack

proliferative capacity. Only cultures that met predefined phenotypic benchmarks, as described in Part 1 of the Results, were included in subsequent experiments. As a result, the number of cells available for analysis was limited throughout the study. To maximize the utility of available material, we first assessed the impact of individual cytokines on cell viability and the expression of PD-L1 and MHC-I in each cell type. We then focused on the combined cytokine cocktail, comparing its effects to IFN-γ alone, which emerged as the dominant modulator across the studied responses.

Conclusion

This study investigated the transcriptional impact of inflammatory cytokines, mainly IFN-γ, on hiPSC-derived cardiac cells in the context of ICI-induced myocarditis. Our findings reveal a marked sensitivity of hiPSC-EC compared to hiPSC-CM, characterized by higher mortality and robust transcriptomic remodeling in immune and inflammatory pathways, including MAPK, NF-κB, and JAK/STAT. Cytokine treatment also activated inflammasome in both cell types. Consistent with observations in endomyocardial biopsies from patients with ICI-induced myocarditis, we observed increased GBP5 protein expression and CASP-1 cleavage following cytokine treatment.

This cellular model offers valuable insight into the early mechanisms of endothelial dysfunction in inflammatory cardiac conditions and its impact on cardiomyocytes. Importantly, data from this healthy donor hiPSC line may serve as a control reference for future studies involving patient-derived hiPSC clones with immune-mediated myocarditis. Such comparative analyses could help identify disease-specific signatures and uncover novel therapeutic targets.

Notably, Burridge et al. previously demonstrated that hiPSC-derived cardiomyocytes from patients with doxorubicin-induced cardiotoxicity recapitulated disease phenotypes and showed transcriptomic changes, including upregulation of stress-related genes [52]. Similarly, our

approach supports the use of patient-specific hiPSC models to dissect the molecular basis of inflammation-driven cardiotoxicity.

Competency in medical knowledge:

Immune checkpoint inhibitors (ICIs) have revolutionized cancer therapy but can lead to severe immune-related adverse events, including myocarditis (ICI-M). This study enhances understanding of ICI-M by identifying endothelial cells, not just cardiomyocytes, as primary targets of cytokine-mediated injury. Using a human hiPSC-derived model, we demonstrate that pro-inflammatory cytokines associated with ICI-M induce inflammasome activation, particularly through AIM2, in endothelial cells. These findings advance current understanding of ICI-M and highlight endothelial dysfunction as a key therapeutic target.

Translational outlook:

Our study identifies endothelial cells as key targets of the inflammatory environment in ICI-induced myocarditis (ICI-M), showing heightened sensitivity to cytokine-induced injury and inflammasome activation. Upregulation of *AIM2*, GBP5, and *GSDMD*, along with caspase-1 activation, closely mirrors findings in patient biopsies, underscoring the translational relevance of our hiPSC-derived model. These results reposition endothelial dysfunction, rather than cardiomyocyte injury alone, as a central mechanism in ICI-M, and highlight AIM2 as a potential therapeutic target. Modulating endothelial inflammasome activation, particularly via AIM2 inhibition, could offer a novel strategy to mitigate cardiac toxicity while preserving antitumor efficacy.

Acknowledgments:

The authors gratefully acknowledge Dr. Emmanuel Fenouillet for his invaluable guidance and insightful feedback throughout the course of this study. His thoughtful comments greatly

contributed to the refinement and quality of this manuscript. The authors also thank the members of the TGML sequencing platform for their high-quality technical support. The platform is supported by grants from Inserm, GIS IBiSA, Aix-Marseille Université, and ANR (ANR-10-INBS-0009-10).

References

1. Haybar H, Bandar B, Torfi E, Mohebbi A, Saki N. Cytokines and their role in cardiovascular diseases. *Cytokine*. 2023;169:156261.

2. Postow MA, Sidlow R, Hellmann MD. Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. *N Engl J Med*. 2018;378:158–168.

3. Hu J-R, Florido R, Lipson EJ, et al. Cardiovascular toxicities associated with immune checkpoint inhibitors. *Cardiovascular Research*. 2019;115:854–868.

4. Escudier M, Cautela J, Malissen N, et al. Clinical Features, Management, and Outcomes of Immune Checkpoint Inhibitor-Related Cardiotoxicity. *Circulation*. 2017;136:2085–2087.

5. Zhu H, Galdos FX, Lee D, et al. Identification of Pathogenic Immune Cell Subsets Associated With Checkpoint Inhibitor–Induced Myocarditis. *Circulation*. 2022;146:316–335.

6. Ali A, Caldwell R, Pina G, et al. Elevated IL-6 and Tumor Necrosis Factor-α in Immune Checkpoint Inhibitor Myocarditis. *Diseases*. 2024;12:88.

7. Varricchi G, Galdiero MR, Tocchetti CG. Cardiac Toxicity of Immune Checkpoint Inhibitors: Cardio-Oncology Meets Immunology. *Circulation*. 2017;136:1989–1992.

8. Lim SY, Lee JH, Gide TN, et al. Circulating Cytokines Predict Immune-Related Toxicity in Melanoma Patients Receiving Anti-PD-1–Based Immunotherapy. *Clinical Cancer Research*. 2019;25:1557–1563.

9. Tsuruda T, Yoshikawa N, Kai M, et al. The Cytokine Expression in Patients with Cardiac Complication after Immune Checkpoint Inhibitor Therapy. *Intern Med*. 2021;60:423–429.

10. Johnson DB, Balko JM, Compton ML, et al. Fulminant Myocarditis with Combination Immune Checkpoint Blockade. *N Engl J Med*. 2016;375:1749–1755.

11. Ganatra S, Neilan TG. Immune Checkpoint Inhibitor-Associated Myocarditis. *The Oncologist*. 2018;23:879–886.

12. Palaskas NL, Segura A, Lelenwa L, et al. Immune checkpoint inhibitor myocarditis: elucidating the spectrum of disease through endomyocardial biopsy. *European J of Heart Fail*. 2021;23:1725–1735.

13. Finke D, Heckmann M, Salatzki J, et al. Comparative Transcriptomics of Immune Checkpoint Inhibitor Myocarditis Identifies Guanylate Binding Protein 5 and 6 Dysregulation. *Cancers*. 2021;13:2498.

14. Tay WT, Fang Y-H, Beh ST, et al. Programmed Cell Death-1: Programmed Cell Death-Ligand 1 Interaction Protects Human Cardiomyocytes Against T-Cell Mediated Inflammation and Apoptosis Response In Vitro. *IJMS*. 2020;21:2399.

15. Rodig N, Ryan T, Allen JA, et al. Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates $CD8^+$ T cell activation and cytolysis. *Eur J Immunol*. 2003;33:3117–3126.

16. Shenoy AR, Wellington DA, Kumar P, et al. GBP5 Promotes NLRP3 Inflammasome Assembly and Immunity in Mammals. *Science*. 2012;336:481–485.

17. Ma Q. Pharmacological Inhibition of the NLRP3 Inflammasome: Structure, Molecular Activation, and Inhibitor-NLRP3 Interaction. *Pharmacological Reviews*. 2023;75:487–520.

18. Paik S, Kim JK, Silwal P, Sasakawa C, Jo E-K. An update on the regulatory mechanisms of NLRP3 inflammasome activation. *Cell Mol Immunol*. 2021;18:1141–1160.

19. Toldo S, Abbate A. The role of the NLRP3 inflammasome and pyroptosis in cardiovascular diseases. *Nat Rev Cardiol*. 2024;21:219–237.

20. Blum SM, Zlotoff DA, Smith NP, et al. Immune responses in checkpoint myocarditis across heart, blood and tumour. *Nature*. 2024;636:215–223.

21. Buehning F, Lerchner T, Vogel J, et al. Preclinical models of cardiotoxicity from immune checkpoint inhibitor therapy. *Basic Res Cardiol*. 2024;120:171–185.

22. Burridge PW, Diecke S, Matsa E, Sharma A, Wu H, Wu JC. Modeling Cardiovascular Diseases with Patient-Specific Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. In: Nagy A, Turksen K, editors. *Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cell Models*.Vol 1353. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York, 2015:119–130.

23. Rabino M, Sommariva E, Zacchigna S, Pompilio G. From bedside to the bench: patient-specific hiPSC-EC models uncover endothelial dysfunction in genetic cardiomyopathies. *Front Physiol*. 2023;14:1237101.

24. Jensen G, Wang X, Kuempel J, et al. Modeling immune checkpoint inhibitor associated myocarditis in vitro and its therapeutic implications. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology Plus*. 2024;10:100122.

25. Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:803–815.

26. Spetz JKE, Florido MHC, Fraser CS, et al. Heightened apoptotic priming of vascular cells across tissues and life span predisposes them to cancer therapy–induced toxicities. *Sci Adv*. 2022;8:eabn6579.

27. Kolberg L, Raudvere U, Kuzmin I, Adler P, Vilo J, Peterson H. g:Profiler—interoperable web service for functional enrichment analysis and gene identifier mapping (2023 update). *Nucleic Acids Research*. 2023;51:W207–W212.

28. Valenzuela NM. JAKinibs prevent persistent, IFNγ-autonomous endothelial cell inflammation and immunogenicity. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2023;325:C186–C207.

29. Wang Y, Chen Y, Yan Y, et al. Loss of CEACAM1, a Tumor-Associated Factor, Attenuates Post-infarction Cardiac Remodeling by Inhibiting Apoptosis. *Sci Rep*. 2016;6:21972.

30. Katkenov N, Mukhatayev Z, Kozhakhmetov S, Sailybayeva A, Bekbossynova M, Kushugulova A. Systematic Review on the Role of IL-6 and IL-1β in Cardiovascular Diseases. *JCDD*. 2024;11:206.

31. Ji C, Roy MD, Golas J, et al. Myocarditis in Cynomolgus Monkeys Following Treatment with Immune Checkpoint Inhibitors. *Clinical Cancer Research*. 2019;25:4735–4748.

32. Zhang H, Lin J, Shen Y, Pan J, Wang C, Cheng L. Protective Effect of Crocin on Immune Checkpoint Inhibitors-Related Myocarditis Through Inhibiting NLRP3 Mediated Pyroptosis in Cardiomyocytes via NF-κB Pathway. *JIR*. 2022;Volume 15:1653–1666.

33. Capon SJ, Uribe V, Dominado N, Ehrlich O, Smith KA. Endocardial identity is established during early somitogenesis by Bmp signalling acting upstream of *npas4l* and *etv2*. *Development*. 2022;149:dev190421.

34. Kopczyńska E, Makarewicz R. Endoglin – a marker of vascular endothelial cell proliferation in cancer. *wo*. 2012;1:68–71.

35. Aneesh Kumar A, Ajith Kumar GS, Satheesh G, et al. Proteomics Analysis Reveals Diverse Molecular Characteristics between Endocardial and Aortic-Valvular Endothelium. *Genes*. 2021;12:1005.

36. Reuben A, Petaccia De Macedo M, McQuade J, et al. Comparative immunologic characterization of autoimmune giant cell myocarditis with ipilimumab. *OncoImmunology*. 2017;6:e1361097.

37. Honda K, Taniguchi T. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:644–658.

38. Blum SM, Zlotoff DA, Smith NP, et al. Immune Responses in Checkpoint Myocarditis Across Heart, Blood, and Tumor. 2023.

39. Poels K, Van Leent MMT, Boutros C, et al. Immune Checkpoint Inhibitor Therapy Aggravates T Cell–Driven Plaque Inflammation in Atherosclerosis. *JACC: CardioOncology*. 2020;2:599–610.

40. Mulholland M, Kritikou E, Katra P, et al. LAG3 Regulates T Cell Activation and Plaque Infiltration in Atherosclerotic Mice. *JACC: CardioOncology*. 2022;4:635–645.

41. Patel P, Karch J. Regulation of cell death in the cardiovascular system. In: *International Review of Cell and Molecular Biology*.Vol 353. Elsevier, 2020:153–209.

42. Zheng Y, Xu L, Dong N, Li F. NLRP3 inflammasome: The rising star in cardiovascular diseases. *Front Cardiovasc Med*. 2022;9:927061.

43. Abbate A, Toldo S, Marchetti C, Kron J, Van Tassell BW, Dinarello CA. Interleukin-1 and the Inflammasome as Therapeutic Targets in Cardiovascular Disease. *Circulation Research*. 2020;126:1260–1280.

44. Kron J, Mauro AG, Bonaventura A, et al. Inflammasome Formation in Granulomas in Cardiac Sarcoidosis. *Circ: Arrhythmia and Electrophysiology*. 2019;12:e007582.

45. Humphreys BD, Dubyak GR. Modulation of P2X7 nucleotide receptor expression by pro- and anti-inflammatory stimuli in THP-1 monocytes. *Journal of Leukocyte Biology*. 1998;64:265–273.

46. Wilson HL, Varcoe RW, Stokes L, et al. P2X receptor characterization and IL-1/IL-1Ra release from human endothelial cells. *British J Pharmacology*. 2007;151:96–108.

47. Du L, Wang X, Chen S, Guo X. The AIM2 inflammasome: A novel biomarker and target in cardiovascular disease. *Pharmacological Research*. 2022;186:106533.

48. Wang B, Yin Q. AIM2 inflammasome activation and regulation: A structural perspective. *Journal of Structural Biology*. 2017;200:279–282.

49. Wang C, Kaur K, Xu C, Abu-Amer Y, Mbalaviele G. Chemotherapy activates inflammasomes to cause inflammation-associated bone loss. *eLife*. 2024;13:RP92885.

50. Willeford A, Suetomi T, Nickle A, Hoffman HM, Miyamoto S, Heller Brown J. CaMKIIδ-mediated inflammatory gene expression and inflammasome activation in cardiomyocytes initiate inflammation and induce fibrosis. *JCI Insight*. 2018;3:e97054.

51. Chin C-G, Chen Y-C, Lin F-J, et al. Targeting NLRP3 signaling reduces myocarditis-induced arrhythmogenesis and cardiac remodeling. *J Biomed Sci*. 2024;31:42.

52. Cejas RB, Petrykey K, Sapkota Y, Burridge PW. Anthracycline Toxicity: Light at the End of the Tunnel? *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2024;64:115–134.

Figure legends

Figure 1: Characterization of hiPSC-derived cardiac cells

(A) Co-expression of endothelial markers in hiPSC-derived cells. The percentage of cells co-expressing CD31, VE-cadherin, CD105 (endoglin), CD54, CD44 and ITGA9 (integrin-α9) is shown as mean ± SD (N=3). (B) Immunofluorescence staining of hiPSC-EC. Expression of the endothelial markers von Willebrand Factor (vWF, red) and CD31 (green) with nuclear staining (DAPI, blue) were studied. (C) Co-expression of cardiomyocyte markers in hiPSC-derived cells. The percentage of cells expressing TNNT2 (Troponin T2), MYH (Myosin Heavy Chain), MLC2a and MLC2v (Myosine Light Chain 2 atrial and ventricular), is shown as mean ± SD (N=2). (D) Immunofluorescence staining of hiPSC-CM. Expression of the cardiomyocyte marker TNNT2 (red) was assessed alongside the proliferation marker Ki67 (green), with DAPI used for nuclear staining (blue). TNNT2 staining reveals the presence of sarcomeres in hiPSC-CM.

Figure 2: Differential Gene Expression and Pathway Enrichment in IFN-γ-treated cells

(A) Venn diagram illustrating upregulated genes in IFN-γ-treated hiPSC-CM (red), hiPSC-EC (blue), and genes common to both cell types. Genes involved in the inflammasome pathway are highlighted in bold. (B) Venn diagram showing downregulated genes in hiPSC-CM (red), in hiPSC-EC (blue), and those shared between the two cell types following IFN-γ treatment. (C) Functional enrichment analysis of upregulated genes in hiPSC-CM (red bars) and in hiPSC-EC (blue bars), categorized by associated biological processes and pathways. (bars represent the number of upregulated genes in each process, with corresponding adjusted p-value).

Figure 3: Inflammation, cell death, and adhesion pathways in IFN-γ-treated cells

The diagram illustrates the regulation of these pathways in hiPSC-CM and in hiPSC-EC following IFN-γ treatment, based on microarray data. ❁ For each gene, transcriptomic variation is shown in hiPSC-CM (left side) and in hiPSC-EC (right side) with red indicating upregulation and grey indicating no significant change. Solid arrows represent direct interactions, while dashed arrows indicate indirect interactions.

Figure 4: PD-L1 and MHC-I expression and cell viability in cytokine-treated cells

(A) Normalized mean fluorescence intensity (MFI) of PD-L1 surface expression in hiPSC-EC (blue) and hiPSC-CM (red) following treatment with IFN-γ, a pro-inflammatory cytokine cocktail compared to untreated controls. The cytokine cocktail included IL-1β, IL-2, IL-6, CCL5, IFN-γ, TNF-α, GZMB at the following concentrations: 10 ng/ml for all except IL-2 (2 ng/mL), TNF-α and GZMB (5 ng/mL each). (B) Normalized MFI of MHC-I surface expression in hiPSC-EC (blue) and hiPSC-CM (red) under the same conditions. (C) Cell viability of hiPSC-EC and (D) hiPSC-CM following treatment with IFN-γ and a pro-inflammatory cytokine cocktail. Viability values are normalized to the untreated control (CTRL).

Data points represent technical replicates. Statistical analysis was performed using t-test with Welch's correction to compare cytokine-treated *vs* control groups, or IFN-γ alone *vs* the full cytokine cocktail. **p < 0,01; Data are presented as mean ± SD (N=3 for hiPSC-EC; N=2 for hiPSC-CM).

Figure 5: Expression of inflammasome-related genes in cytokine-treated cells

Gene expression was assessed in hiPSC-EC (blue) and hiPSC-CM (red) under three conditions: untreated control (CTRL), IFN-γ treatment, and cytokine cocktail treatment. The analysis included inflammasome **regulators** (P2X7, NLRC5, GBP5, GBP6), **components** (NLRP3, AIM2), and the **effector** GSDMD.

Data are expressed as -ΔCt values, normalized to the geometric mean of housekeeping genes RPL13a and YWHAZ. Statistical comparisons were performed using t-test (mean ± SD, N=2-3 independent differentiations): *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 *vs* CTRL; $p < 0.05 for IFN-γ *vs* cytokine cocktail.

Figure 6: GBP5 expression in cytokine-treated cells

(A) Immunofluorescence staining of hiPSC-EC and hiPSC-CM under control (CTRL), IFN-γ, or cytokine cocktail conditions. GBP5 is shown in green; nuclei in blue (DAPI). White arrows indicate cells with increased cytoplasmic GBP5. Scale bar: 100 µm. (B) Quantification of GBP5 expression intensity per cell for hiPSC-EC (left) and hiPSC-CM (right). (C) Quantification of cells with cytoplasmic GBP5 for hiPSC-EC (left) and hiPSC-CM (right).

Data points represent technical replicates. Statistical analysis was performed using t-test with Welch's correction to compare cytokine-treated to control and IFN-γ alone to the cytokine cocktail. *p < 0.05; **p < 0,01; ***p < 0.001; ****p < 0,0001; Data are presented as mean ± SD (N=10 for CTL; N=15 for IFN-γ and cytokine cocktail in hiPSC-EC. N=5 for CTL; N=10 for IFN-γ and cytokine cocktail in hiPSC-CM).

Figure 7: Active caspase-1 expression in cytokine-treated cells

(A) Immunofluorescence staining of hiPSC-EC and hiPSC-CM under three conditions: untreated control (CTRL), IFN-γ treatment, and cytokine cocktail treatment. Active-CASP-1 (cleaved-CASP-1) expression is visualized in green, and nuclei are stained with DAPI (blue). White arrows indicate cells with elevated cytoplasmic cleaved-CASP-1 expression. Scale bar: 100 µm. (B) Quantification of cleaved-CASP-1 expression, based on fluorescence intensity normalized to the total number of cells in the analyzed area, shown for hiPSC-EC (top) and hiPSC-CM (bottom).

Data points represent technical replicates. Statistical analysis was performed using t-test with Welch's correction to compare cytokine-treated to control and IFN-γ alone to the cytokine cocktail. **p < 0,01; ***p < 0.001; ****p < 0,0001; Data are presented as mean ± SD (N=10 for CTL; N=15 for IFN-γ and cytokine cocktail in hiPSC-EC. N=5 for CTL; N=10 for IFN-γ and cytokine cocktail in hiPSC-CM).

Figure 8: Caspase-3/7 activity in cytokine-treated cells

Percentage of caspase-3/7–active cells in living (blue) and dying (grey) populations following IFN-γ-, cytokine cocktail-, or camptothecin (CPT)-treatment. Living cells were defined by intact plasma membrane integrity; dying cells exhibited membrane compromise. CPT: positive control for cell death.

Statistical analysis was performed using t tests: *p < 0.05, **p < 0.01. Bars represent mean ± SD from 2–3 independent differentiations.

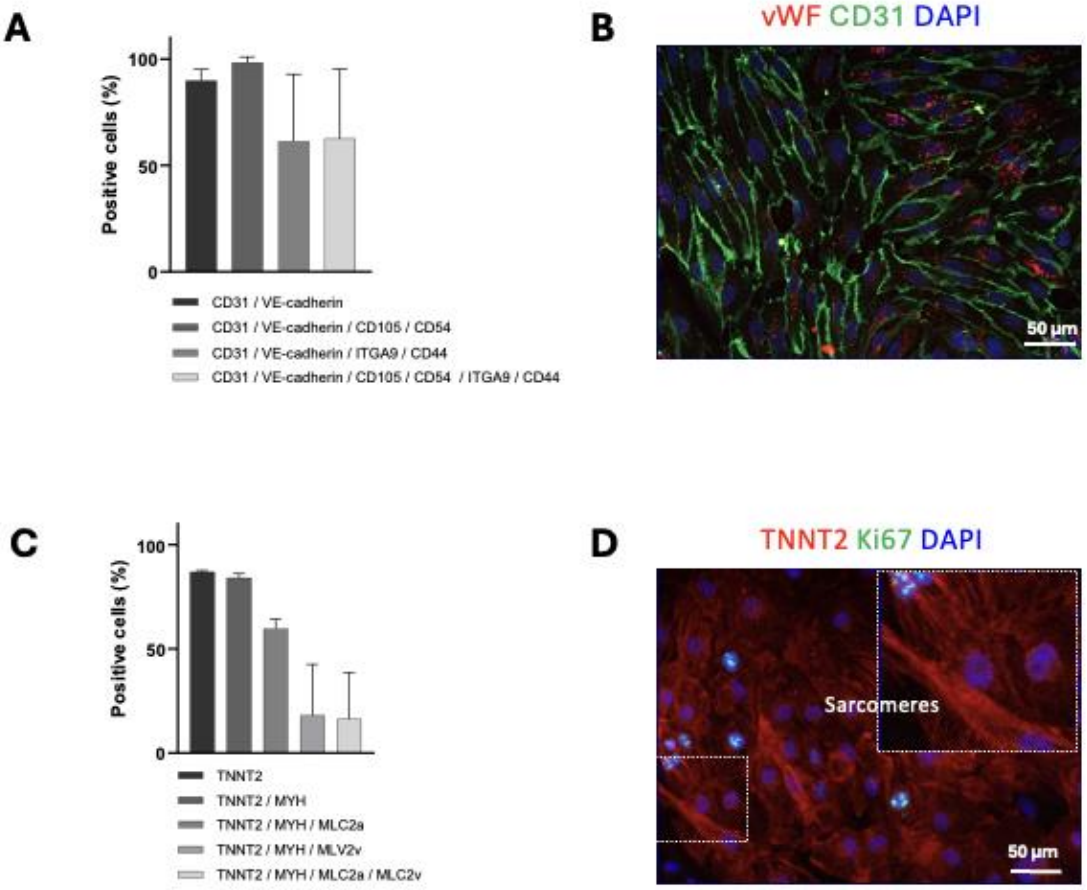

A
Positive cells (%)
100
50
0
CD31 / VE-cadherin
CD31 / VE-cadherin / CD105 / CD54
CD31 / VE-cadherin / ITGA9 / CD44
CD31 / VE-cadherin / CD105 / CD54 / ITGA9 / CD44
B
vWF CD31 DAPI
50 µm
C
Positive cells (%)
100
50
0
TNNT2
TNNT2 / MYH
TNNT2 / MYH / MLC2a
TNNT2 / MYH / MLV2v
TNNT2 / MYH / MLC2a / MLC2v
D
TNNT2 Ki67 DAPI
Sarcomeres
50 µm

Figure 1

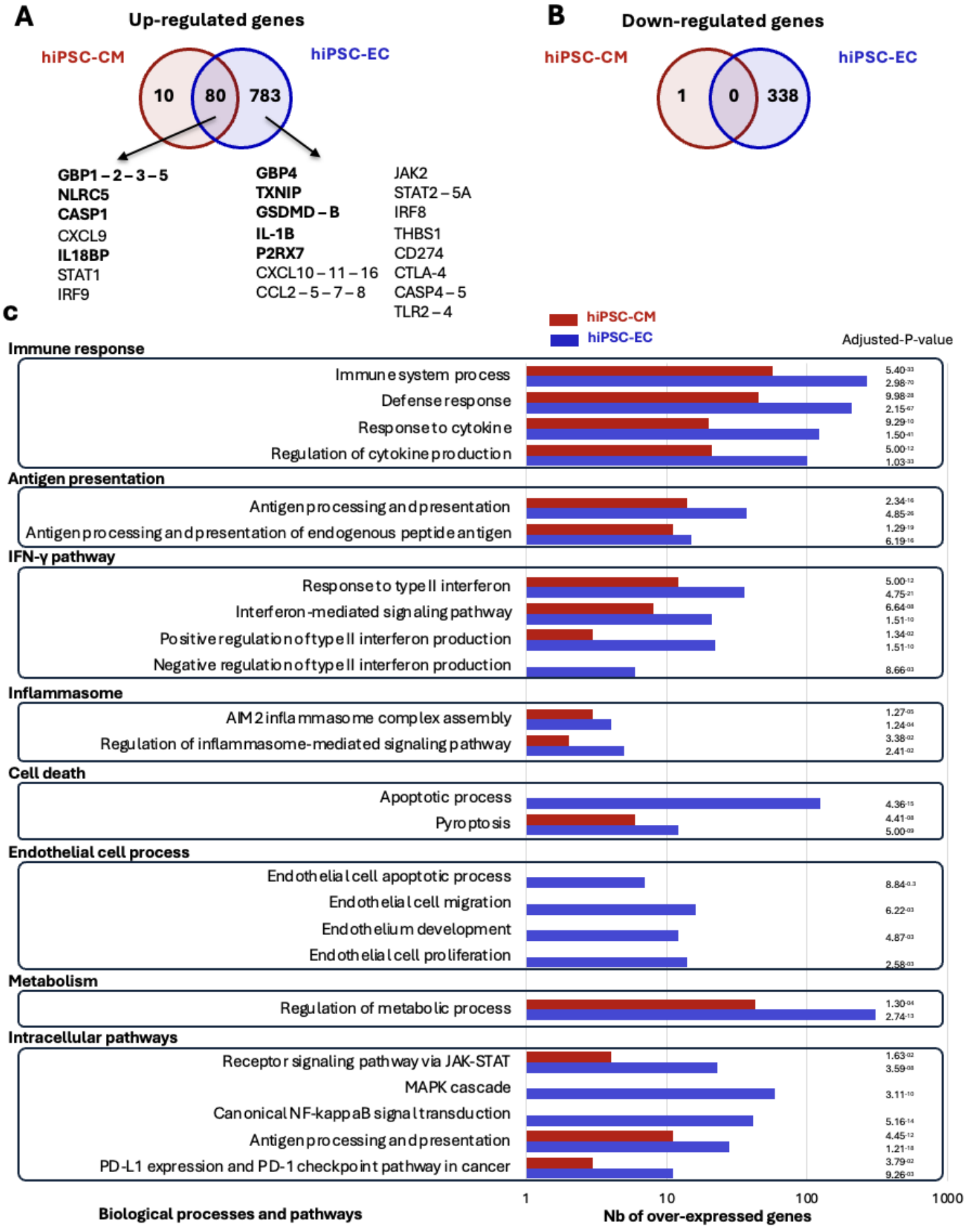

A
Up-regulated genes
hiPSC-CM
hiPSC-EC
10
80
783
GBP1 – 2 – 3 – 5
NLRC5
CASP1
CXCL9
IL18BP
STAT1
IRF9
GBP4
TXNIP
GSDMD – B
IL-1B
P2RX7
CXCL10 – 11 – 16
CCL2 – 5 – 7 – 8
JAK2
STAT2 – 5A
IRF8
THBS1
CD274
CTLA-4
CASP4 – 5
TLR2 – 4
B
Down-regulated genes
hiPSC-CM
hiPSC-EC
1
0
338
C
hiPSC-CM
hiPSC-EC
Adjusted-P-value
Immune response
Immune system process
Defense response
Response to cytokine
Regulation of cytokine production
Antigen presentation
Antigen processing and presentation
Antigen processing and presentation of endogenous peptide antigen
IFN-γ pathway
Response to type II interferon
Interferon-mediated signaling pathway
Positive regulation of type II interferon production
Negative regulation of type II interferon production
Inflammasome
AIM2 inflammasome complex assembly
Regulation of inflammasome-mediated signaling pathway
Cell death
Apoptotic process
Pyroptosis
Endothelial cell process
Endothelial cell apoptotic process
Endothelial cell migration
Endothelium development
Endothelial cell proliferation
Metabolism
Regulation of metabolic process
Intracellular pathways
Receptor signaling pathway via JAK-STAT
MAPK cascade
Canonical NF-kappaB signal transduction
Antigen processing and presentation
PD-L1 expression and PD-1 checkpoint pathway in cancer
1
10
100
1000
Biological processes and pathways
Nb of over-expressed genes

Figure 2

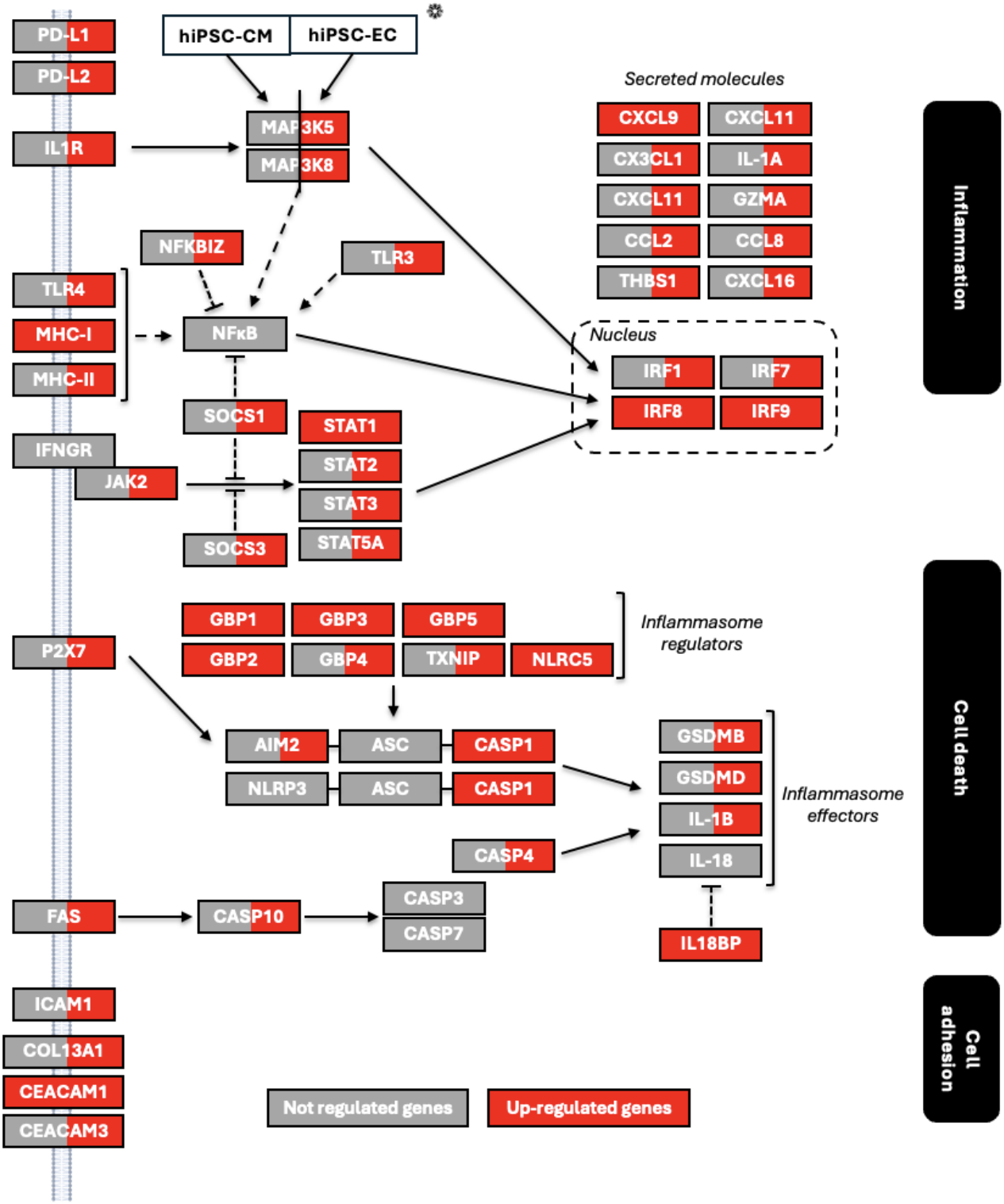

PD-L1
PD-L2
IL1R
TLR4
MHC-I
MHC-II
IFNGR
JAK2
P2X7
FAS
ICAM1
COL13A1
CEACAM1
CEACAM3
hiPSC-CM
hiPSC-EC
MAP3K5
MAP3K8
NFKBIZ
TLR3
NFκB
SOCS1
SOCS3
STAT1
STAT2
STAT3
STAT5A
Secreted molecules
CXCL9
CXCL11
CX3CL1
IL-1A
CXCL11
GZMA
CCL2
CCL8
THBS1
CXCL16
Nucleus
IRF1
IRF7
IRF8
IRF9
GBP1
GBP3
GBP5
GBP2
GBP4
TXNIP
NLRC5
Inflammasome regulators
AIM2
ASC
CASP1
NLRP3
ASC
CASP1
CASP4
GSDMB
GSDMD
IL-1B
IL-18
Inflammasome effectors
CASP10
CASP3
CASP7
IL18BP
Not regulated genes
Up-regulated genes
Inflammation
Cell death
Cell adhesion

Figure 3

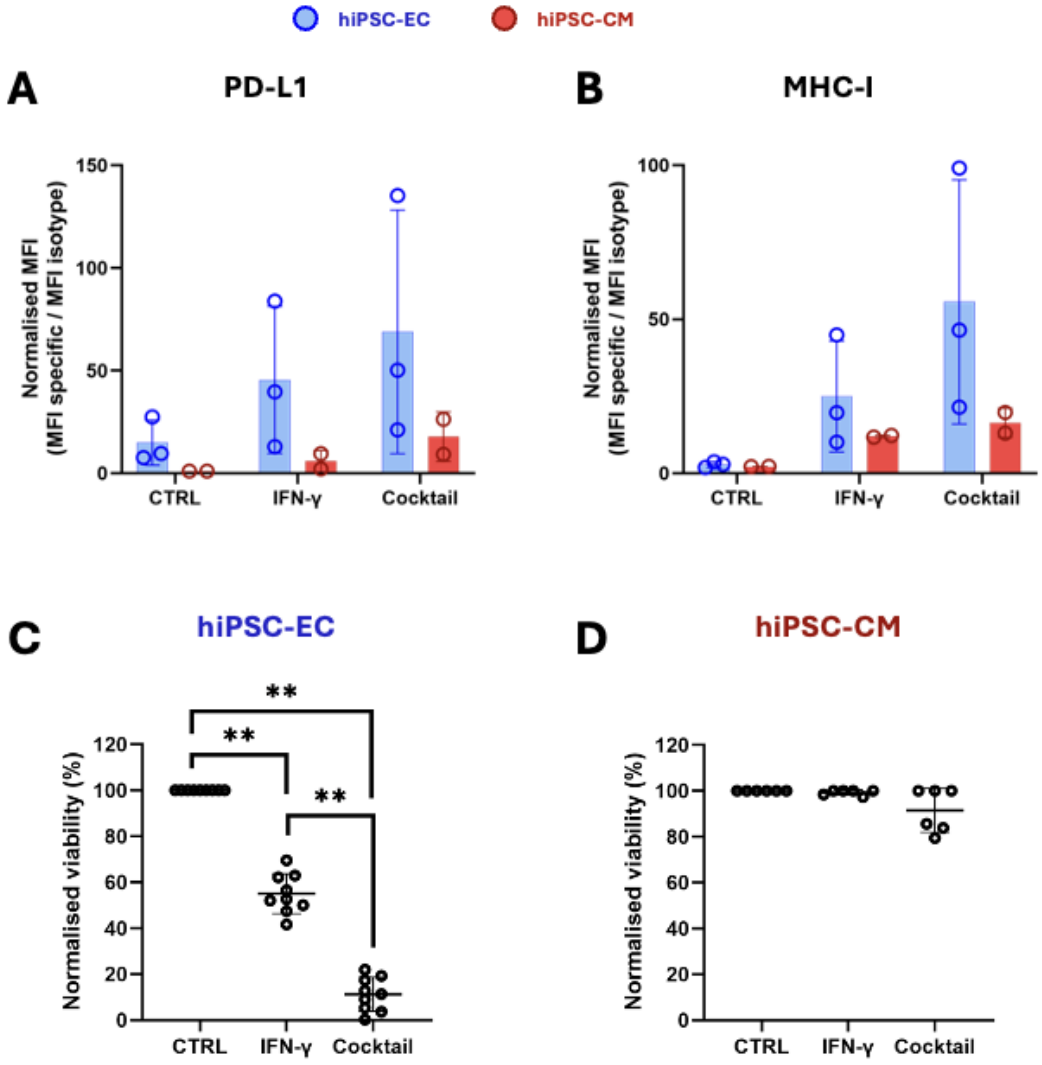

hiPSC-EC
hiPSC-CM
A
PD-L1
Normalised MFI
(MFI specific / MFI isotype)
150
100
50
0
CTRL
IFN-γ
Cocktail
B
MHC-I
Normalised MFI
(MFI specific / MFI isotype)
100
50
0
CTRL
IFN-γ
Cocktail
C
hiPSC-EC
Normalised viability (%)
120
100
80
60
40
20
0
**
**
**
CTRL
IFN-γ
Cocktail
D
hiPSC-CM
Normalised viability (%)
120
100
80
60
40
20
0
CTRL
IFN-γ
Cocktail

Figure 4

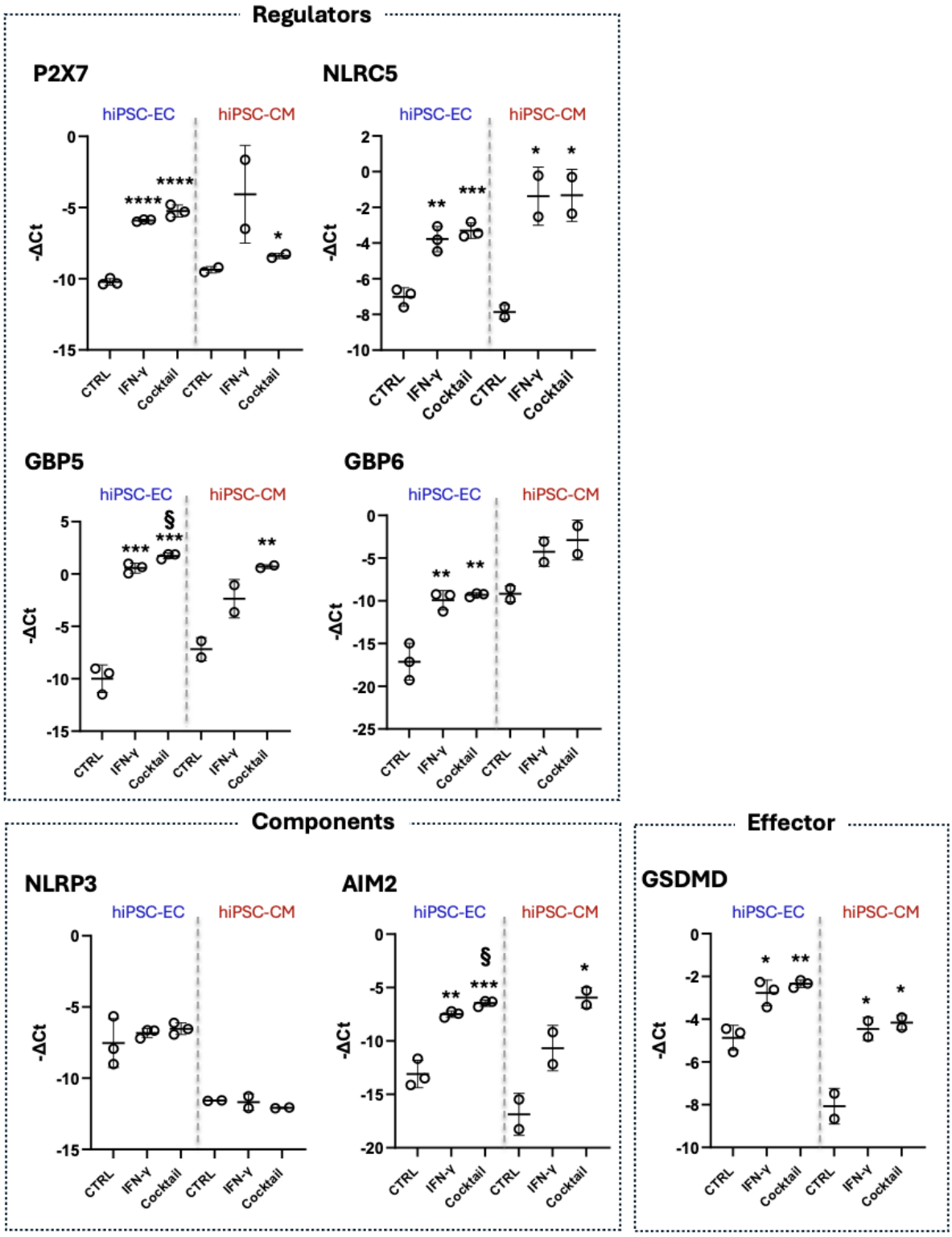

Regulators
P2X7
NLRC5
GBP5
GBP6
Components
NLRP3
AIM2
Effector
GSDMD
hiPSC-EC
hiPSC-CM
-ΔCt
CTRL
IFN-γ
Cocktail

Figure 5

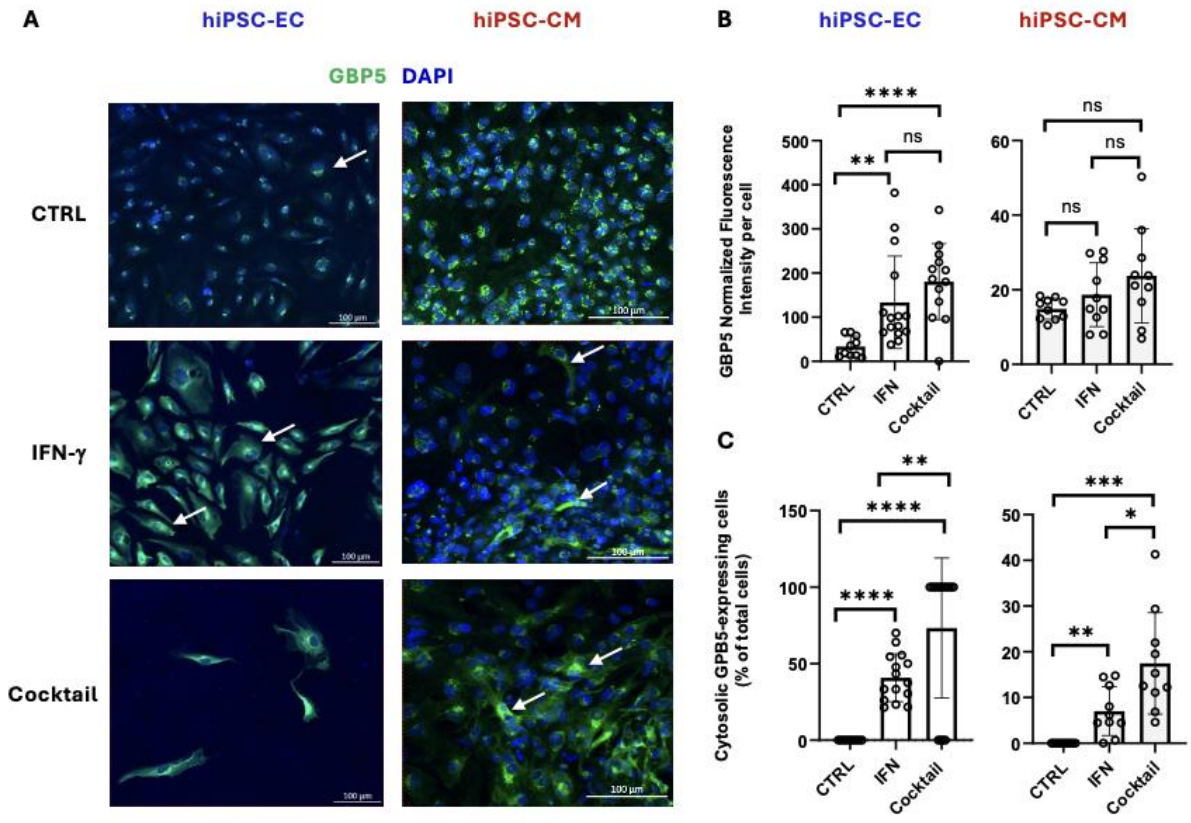

A
hiPSC-EC
hiPSC-CM
GBP5 DAPI
CTRL
IFN-γ
Cocktail
100 µm
B
hiPSC-EC
hiPSC-CM
GBP5 Normalized Fluorescence Intensity per cell
****
**
ns
ns
ns
ns
CTRL
IFN
Cocktail
C
Cytosolic GPB5-expressing cells (% of total cells)
**
****
****
***
*
**

Figure 6

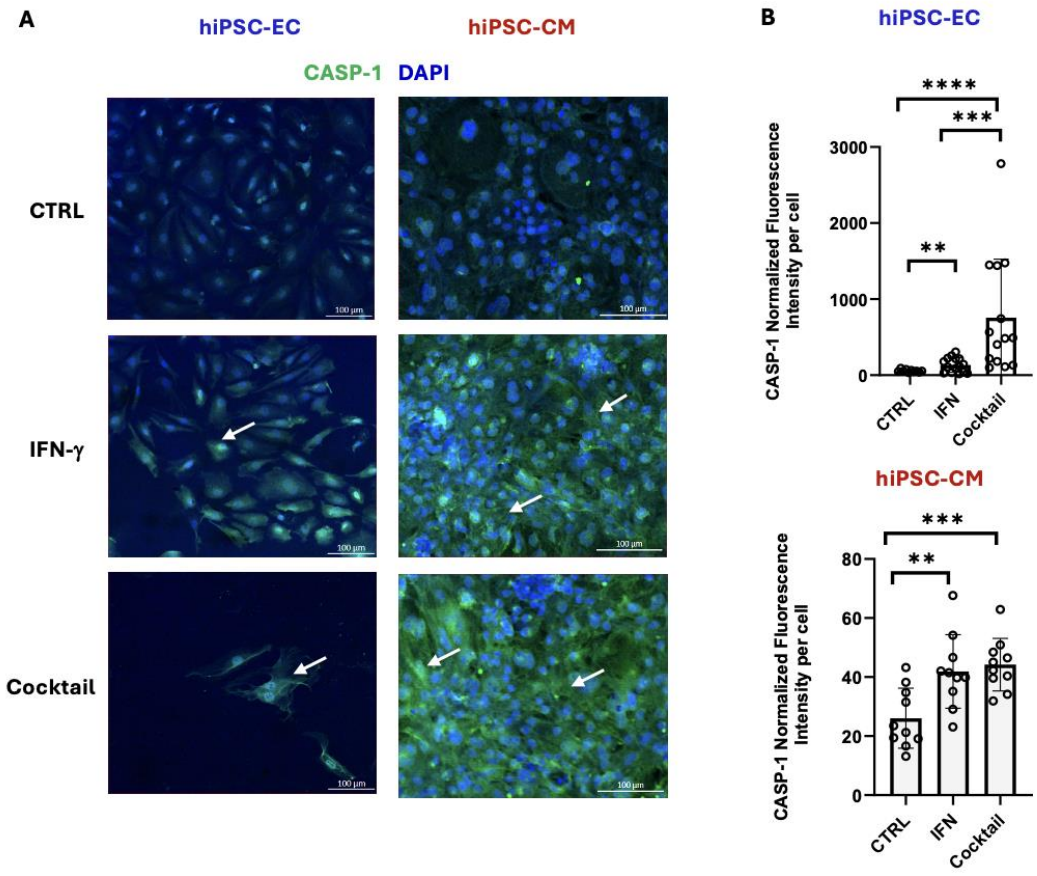

A
hiPSC-EC
hiPSC-CM
CASP-1 DAPI
CTRL
IFN-γ
Cocktail
100 µm
B
hiPSC-EC
CASP-1 Normalized Fluorescence Intensity per cell
3000
2000
1000
0
****
***
**
CTRL
IFN
Cocktail
hiPSC-CM
CASP-1 Normalized Fluorescence Intensity per cell
80
60
40
20
0
***
**
CTRL
IFN
Cocktail

Figure 7

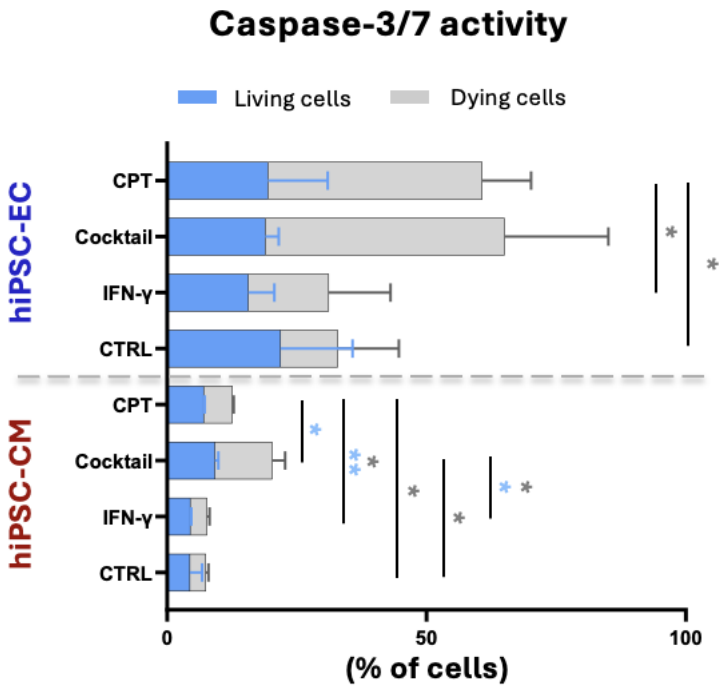
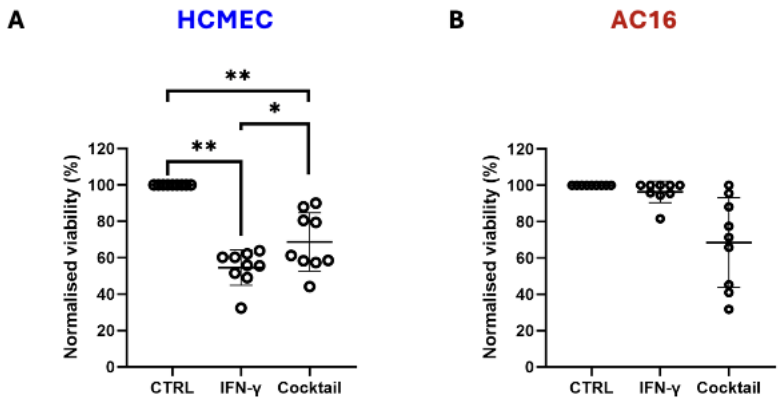

Caspase-3/7 activity
Living cells
Dying cells
hiPSC-EC
CPT
Cocktail
IFN-γ
CTRL
hiPSC-CM
CPT
Cocktail
IFN-γ
CTRL
0
50
100
(% of cells)

Figure 8



Supplementary Figure 1: Effect of IFN-γ and cytokine cocktail treatment on cell viability in HCMEC and AC16 cells.

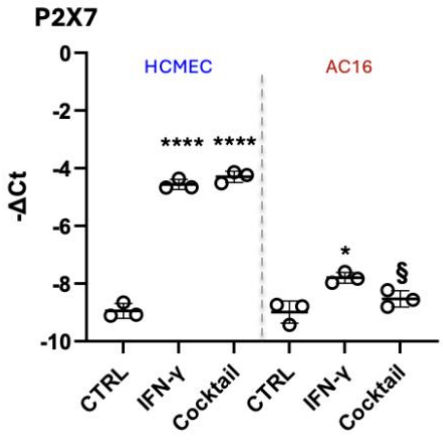
(A) Normalized cell viability of HCMEC and **(B)** AC16 cells following treatment with IFN-γ, cytokine cocktail, or camptothecin (CPT, positive control for cell death), compared to untreated control (CTRL).

Data points represent technical replicates. Statistical analysis was performed using t-test with Welch's correction to compare cytokine treatment *vs* the control group. *$p < 0.05$; **$p < 0,01$. Data are presented as mean ± SD (N=3 for each cell type).

Supplementary table 1: Primers used for qPCR

Gene	Forward	Reverse
AIM2	AAACTCAGCCCCTTGGAACA	TGTGTCCTCGTTTCTAACCCC
GBP5	CTCGGAAAGGAATACAGGCTG	GCCTGGTCAGTCTGTAAT
GBP6	AGTAAAGGCAAAAGAGGTCT	GCTACTGCCTTCTCTCTATC
GSDMD	CCTCAAGCTCATGGTTCTGG	CCCTGTATCTGCCCATCCAT
NLRC5	GCTCTGGTAGGCTGTGGG	ATCTGCAGCCTCCCCATT
NLRP3	ACTGCAAGCTTCAGGTGTTG	TCTGGCTGGAGGTCAGAAGT
P2X7	ACGTTTGCTTTGCTCTGGTG	CCTCTGCTATCCCCTTCACC
RPL13a	CAGGTCCTGGTGCTTGATG	GGCCCAGCAGTACCTGTTTA
YWHAZ	TCAAGAGCAGGGACAATGTTT	ACTCACTGCCTCCCATCATC

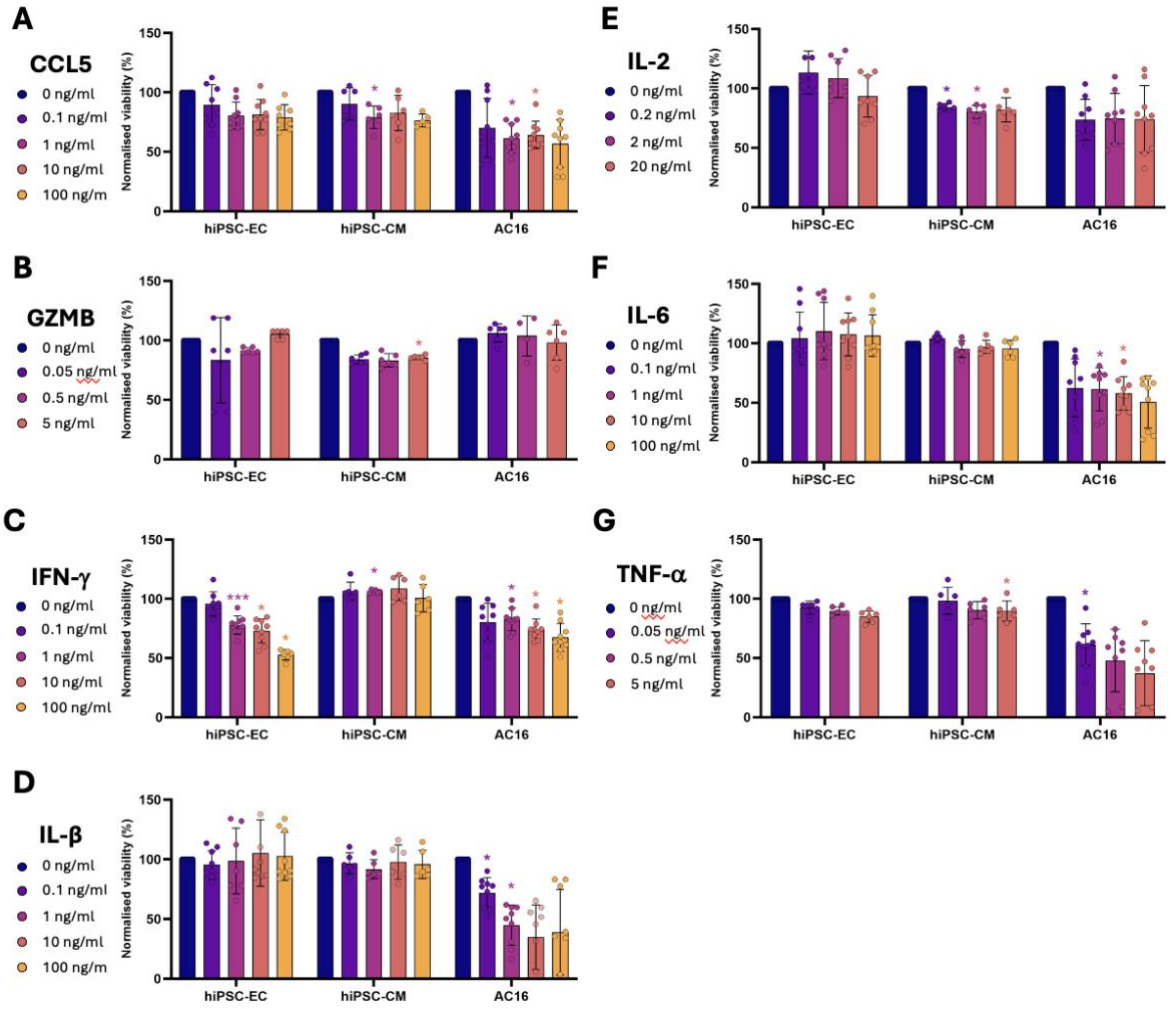
Supplementary Table 2: Differentially expressed genes and functional annotation of hiPSC-CM and hiSPC-EC after IFN-γ treatment. This table presents a list of differentially expressed genes (DEGs) in hiPSC-CM and hiPSC-EC following IFN-γ treatment (microarray data). The corresponding functional annotations were used for enrichment analysis, with red annotations linking to the results presented in Figures 2 and 3. https://amubox.univ-amu.fr/s/FfbKQEZ6xTP5xtH



Supplementary Figure 2: Effect of IFN-γ and cytokine cocktail treatment on *P2X7* expression in HCMEC and AC16 cells.

qPCR analysis was performed to assess P2X7 expression under three conditions: untreated control (CTRL), IFN-γ treatment, and cytokine cocktail treatment.

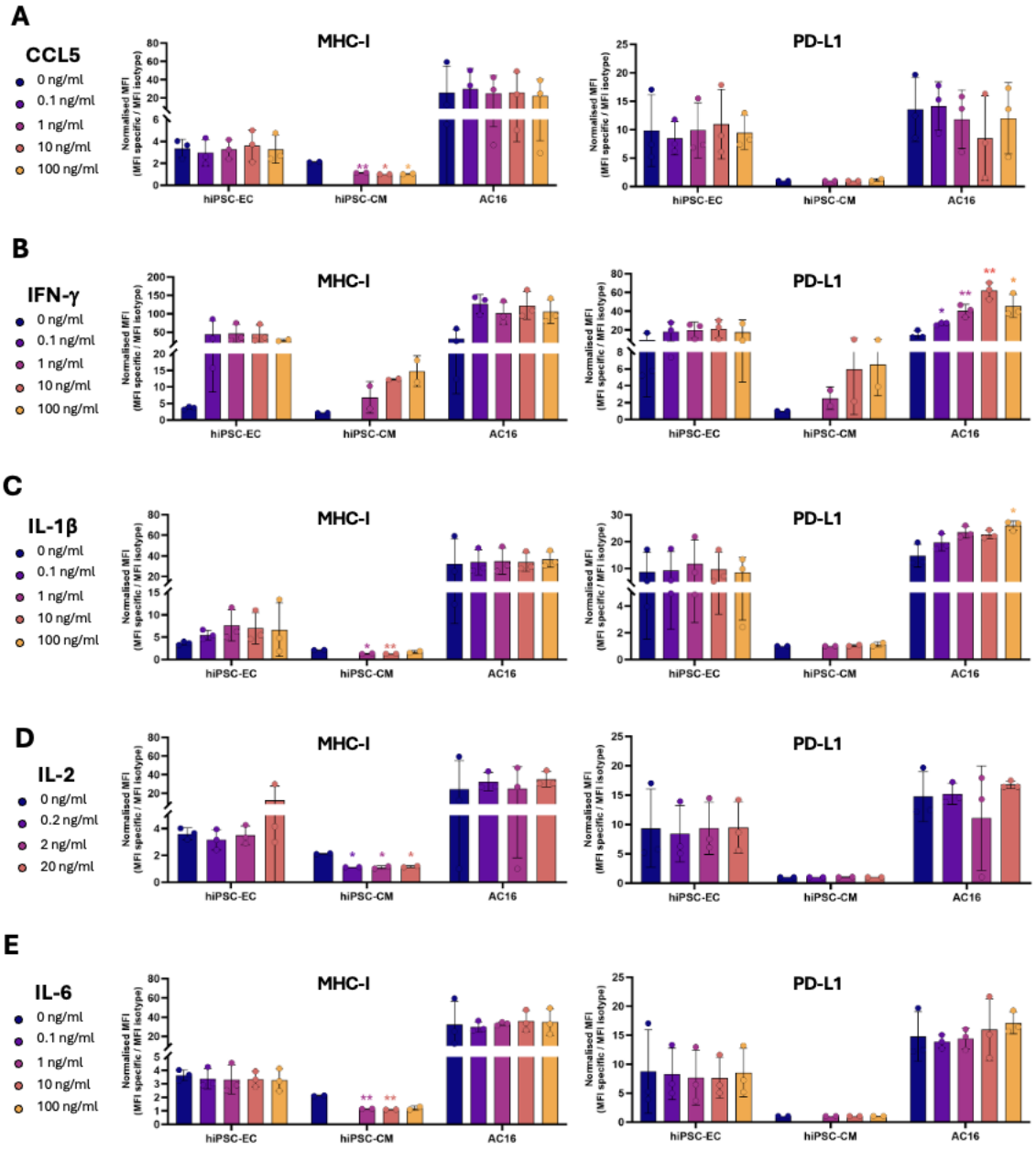
Data are expressed as -ΔCt values, calculated using the geometric mean of the housekeeping genes *RPL13a* and *YWHAZ*. Statistical analysis was performed using t-test with Welch's correction to compare cytokine treatments to the control group (*$p < 0.05$; ****$p < 0,0001$) and IFN-γ to the cytokine cocktail ($^{§}p < 0,05$). Data are shown as mean ± SD (N=3 for each cell type).



Supplementary Figure 3: Dose-dependent effect of cytokine treatment on viability of hiPSC-EC, hiPSC-CM and AC16 cells.

Normalized cell viability of hiPSC-EC, hiPSC-CM, and AC16 cells was assessed after treatment with varying doses of the following cytokines: **(A)** CCL5, **(B)** Granzyme B (GZMB), **(C)** IFN-γ, **(D)** IL-1β, **(E)** IL-2, **(F)** IL-6, and **(G)** TNF-α.

Data points represent technical replicates. Statistical analysis was performed using t-test with Welch's correction to compare each cytokine concentration to the control group (*$p < 0.05$; ***$p < 0{,}0001$). Data are presented as mean ± SD (N=3 for hiPSC-EC and AC16, N=2 for hiPSC-CM).



Supplementary Figure 4: Dose-dependent effect of cytokine treatment on MHC-I and PD-L1 protein expression in hiPSC-EC, hiPSC-CM, and AC16 cells.

Normalized mean fluorescence intensity (MFI) of MHC-I and PD-L1 surface expression was measured in hiPSC-EC, hiPSC-CM, and AC16 cells after treatment with varying doses of the following cytokines: **(A)** CCL5, **(B)** IFN-γ, **(C)** IL-1β, **(D)** IL-2, and **(E)** IL-6.

Data points represent technical replicates. Statistical analysis was performed using t-test with Welch's correction to compare each cytokine concentration to the control group (*$p < 0.05$; **$p < 0.01$). Data are presented as mean ± SD (N=3 for hiPSC-EC and AC16, N=2 for hiPSC-CM).

4. Réponse des hiPSC-CM et des hiPSC-EC à l'IFN-γ : comparaison des clones hiPSC provenant de patients ayant ou non déclaré une myocardite immuno-médiée post-ICI

La génération des clones hiPSC a été continue pendant mes années de thèse, ce qui m'a conduit à disposer de clones provenant de 6 patients, 3 ayant déclaré une MIM et 3 n'ayant pas déclaré de MIM après traitement par ICI. Les caractéristiques de ces clones figurent dans la Section 1.1 de ce chapitre. En nous appuyant sur les résultats de l'étude transcriptomique (Section 2), sur ceux en cours de publication concernant la réponse au cocktail de molécules inflammatoires (Section 3), et sur ceux publiés par (Finke et *al.*, 2021) (comparaison de biopsies endomyocardiques de patients atteints de MIM, de myocardite virale et de cardiomyopathie dilatée), nous avons entrepris d'étudier la signalisation inflammatoire et l'inflammasome NLRP3 dans les cellules endothéliales et les cardiomyocytes différenciés des hiPSC des clones de patients ayant (ICI-M) ou non (Non-ICI-M) déclaré une myocardite suite au traitement par ICI.

Les hiPSC différenciées en cardiomyocytes ou en cellules endothéliales ont été traités avec 10 ng/ml d'IFN-γ pendant 48 heures. Comme décrit dans la littérature, et montré dans les sections 2 et 3, ce traitement permet d'obtenir une réponse inflammatoire dans les hiPSC-CM et hiPSC-EC (Cosper et *al.*, 2012; Didié et *al.*, 2017; Eppihimer et *al.*, 2013; Valenzuela, 2023). J'ai ainsi pu étudier la mise en place de cette inflammation dans les deux types cellulaires cardiaques à la fois à l'échelle des transcrits et au niveau protéique.

Il convient toutefois de noter la nature préliminaire de ces résultats, car je n'ai pas eu le temps de générer 3 différenciations indépendantes pour chacun des types cellulaires et chacun des clones ; et je n'ai pas non plus pu réaliser l'ensemble des expériences sur tous les échantillons.

4.1. Effet de l'IFN-γ sur l'expression de transcrits impliqués dans la réponse inflammatoire

La Figure 33 illustre la signalisation intracellulaire associée à l'inflammasome NLRP3, les transcrits quantifiés dans les hiPSC-CM et hiPSC-EC dérivés des clones de patients ICI-M et non-ICI-M étant mis en évidence (en rouge). Les résultats présentés ci-après sont regroupés soit par composants du complexe inflammasome, soit par éléments régulateurs de l'inflammasome.

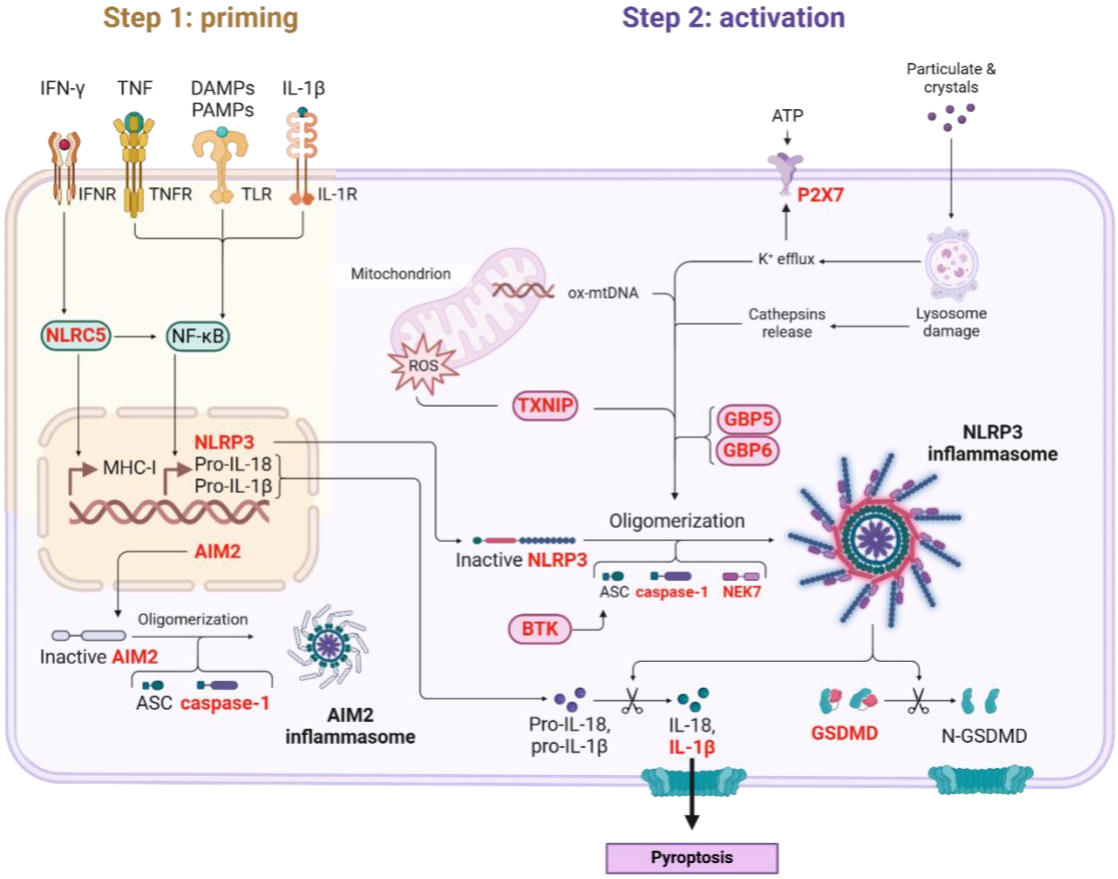


Figure 33 : Induction et activation de l'inflammasome NLRP3
Principaux acteurs de l'induction de la transcription (récepteurs membranaires et facteurs de transcription) et de l'activation (gènes composant le complexe et régulateurs) de l'inflammasome NLRP3. En rouge sont représentés les gènes étudiés par qPCR après le traitement par l'IFN-γ.

4.1.1. Effet de l'IFN-γ sur les hiPSC-CM

Dans cette partie, nous avons étudié la réponse du clone Sain E-CT6, des clones Non-ICI-M 3D et 5B et des clones ICI-M 1K et 4E. Pour chacun des clones, les résultats ont été obtenus *via* 3-4 différenciations indépendantes.

Certaines de ces données ont été obtenues avec l'aide de Thi Thom Tran, également doctorante dans l'équipe.

Composants du complexe inflammasome :

Le traitement par l'IFN-γ induit une surexpression de *CASP1* dans les hiPSC-CM des clones Non-ICI-M et ICI-M ($p < 0,0001$) *vs* la condition contrôle. L'expression d'*IL-1B* n'est pas modifiée quel que soit l'échantillon (Figure 34.A). Concernant *NLRP3*, l'IFN-γ n'induit pas de modification de son expression quel que soit le clone étudié, mais nous observons que, dans les conditions basale et traitée, il est plus fortement exprimé dans le clone Sain que dans les clones de patients Non-ICI-M ($p < 0,01$) et ICI-M ($p < 0,001$). (Figure 34.B)

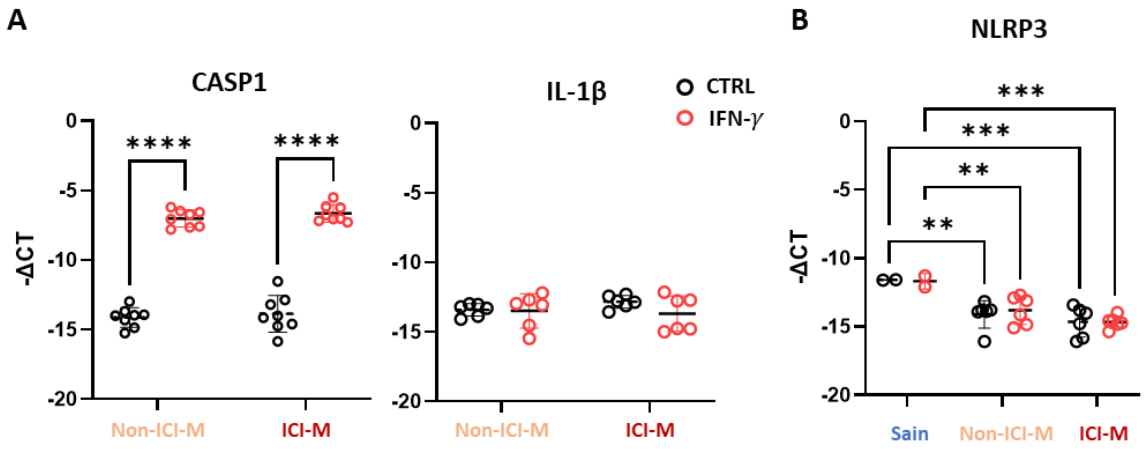


Figure 34 : Expression des transcrits des composants du complexe inflammasome après traitement des hiPSC-CM par l'IFN-γ

(A) La caspase-1 (*CASP1*) est surexprimée par l'IFN-γ dans les hiPSC-CM des deux groupes de patients ($p < 0,0001$) alors que l'interleukine 1β (*IL-1B*) n'est pas régulée. **(B)** Le traitement par l'IFN-γ n'induit pas de modification d'expression de *NLRP3* quel que soit le clone étudié mais, au niveau basal et après traitement, l'expression de *NLRP3* est plus élevée dans le clone Sain que dans les groupes de patients. Les tests statistiques réalisés sont des ANOVA 2 ways suivies d'un test de Tukey pour effectuer les corrections multiples : *$p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Régulateurs de l'inflammasome :

Après traitement par l'IFN-γ, on observe une surexpression de *GBP5*, *GBP6* et *NLRC5* dans les hiPSC-CM quel que soit le clone étudié. Cependant, *GBP5*, *GBP6* et *NLRC5* sont plus fortement exprimés au niveau basal dans le clone Sain comparé aux clones Non-ICI-M ($p < 0,0001$ pour chacun des gènes) et ICI-M ($p < 0,001$ pour chacun des gènes). Après traitement par l'IFN-γ, les expressions de *GBP5* et *GBP6* restent plus élevées dans le clone Sain que dans les clones Non-ICI-M (*GBP5* : $p < 0,01$ et *GBP6* : $p < 0,001$) et ICI-M (*GBP5* : $p < 0,01$ et *GBP6* : $p < 0,001$). L'expression de *NLRC5* est plus élevée dans les hiPSC-CM de la personne saine comparé au groupe Non-ICI-M après traitement ($p < 0,01$). De plus, on observe une expression plus importante de *GBP6* dans le groupe ICI-M comparé au groupe Non-ICI-M après traitement par l'IFN-γ ($p < 0,05$). (Figure 35)

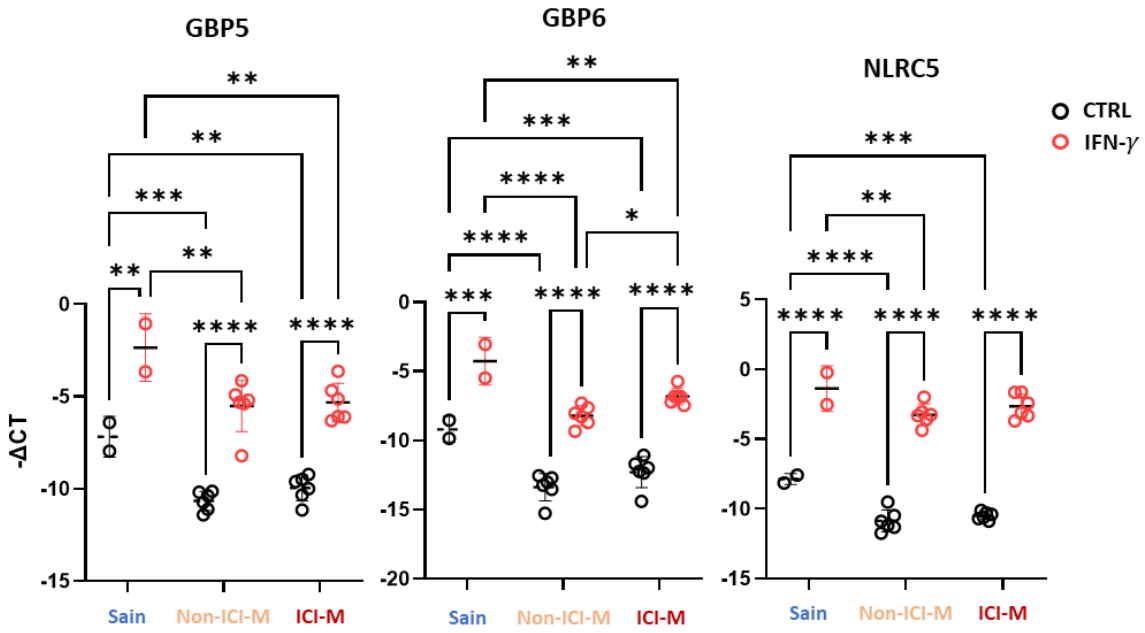


Figure 35 : Expression des transcrits de régulateurs du complexe inflammasome après traitement des hiPSC-CM par l'IFN-γ

Les régulateurs *GBP5*, *GBP6* et *NLRC5* sont surexprimés par le traitement par l'IFN-γ dans l'ensemble des clones étudiés (Sain, Non-ICI-M et ICI-M). On observe des différences de l'expression basale et traitée par l'IFN-γ entre le clone Sain et les clones des patients (Non-ICI-M et ICI-M). Les tests statistiques réalisés sont des ANOVA 2 ways suivies d'un test de Tukey pour effectuer les corrections multiples : *$p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

4.1.2. Effet du traitement par l'IFN-γ sur les hiPSC-EC

Composants du complexe inflammasome :

Après traitement par l'IFN-γ, nous observons la surexpression de la gasdermine D (*GSDMD*) et de *NLRP3* dans les hiPSC-EC de l'ensemble des clones étudiés (Sain, Non-ICI-M et ICI-M ; $p < 0,001$ pour *GSDMD ;* $p < 0,0001$ pour *NLRP3*) *vs* la condition contrôle. Lorsqu'on compare le clone Sain et les groupes de patients entre eux, il n'y a pas de différence d'expression pour *GSDMD* mais nous retrouvons, comme pour les hiPSC-CM, une expression de *NLRP3*, avec ou sans traitement par l'IFN-γ, plus élevée dans le clone Sain que dans les clones des groupes Non-ICI-M ($p < 0,001$ et $p < 0,05$, respectivement) et ICI-M ($p < 0,01$). (Figure 36.A**)**

On observe une surexpression de *CASP1* dans les hiPSC-EC des deux groupes de patients ($p < 0,0001$), tandis qu'*IL-1B* est surexprimé seulement dans le groupe ICI-M ($p < 0,001$) *vs* la condition contrôle. Aucune différence d'expression n'est significative entre les groupes de patients. (Figure 36.B)

Régulateurs de l'inflammasome :

Après traitement par l'IFN-γ, nous observons une surexpression dans les hiPSC-EC des régulateurs *NLRC5*, *GBP5* et *GBP6* quel que soit le clone étudié (Sain, Non-ICI-M ou ICI-M) ($p < 0,0001$ pour chacun des gènes) *vs* la condition contrôle. La comparaison du clone Sain avec les groupes de patients montre que le niveau d'expression basale de *NLRC5* est plus élevé dans le clone Sain que dans les clones des groupes de patients Non-ICI-M et ICI-M ($p < 0,0001$). (Figure 37.A)

L'expression de *BTK* et *Nek7* n'est pas modifiée par l'IFN-γ dans les deux groupes de patients. Alors que *TXNIP* est surexprimé dans les hiPSC-EC du groupe Non-ICI-M ($p < 0,05$) après traitement par l'IFN-γ, cette augmentation de *TXNIP* n'est pas retrouvée dans le groupe ICI-M ($p < 0,05$). (Figure 37.B)

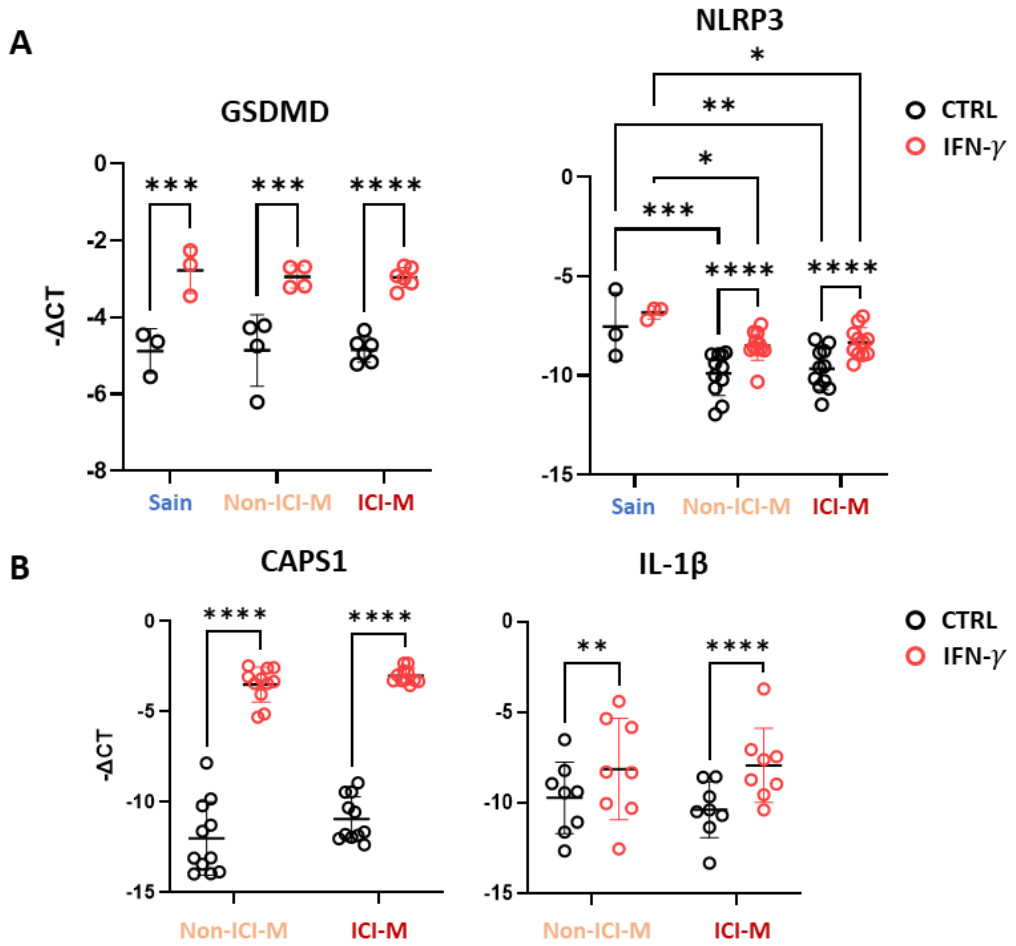


Figure 36 : Expression des transcrits des composants du complexe inflammasome après traitement des hiPSC-EC par l'IFN-γ

(A) *GSDMD* est surexprimé par le traitement par l'IFN-γ dans l'ensemble des clones étudiés (Sain et Non-ICI-M : $p < 0,001$; ICI-M : $p < 0,0001$), sans différence entre le clone Sain et les groupes de patients. *NLRP3* est surexprimé par le traitement par l'IFN-γ dans les clones de patients ($p < 0,0001$) mais pas dans le clone Sain. L'expression basale de *NLRP3* dans le clone Sain est plus forte que dans les clones de patients (Non-ICI-M : $p < 0,001$ et ICI-M : $p < 0,05$), et cette différence est conservée après traitement par l'IFN-γ (Non-ICI-M et ICI-M : $p < 0,05$). **(B)** *CASP1* et *IL-1B* sont surexprimées par le traitement par l'IFN-γ dans les clones de patients (Non-ICI-M et ICI-M : $p < 0,0001$ pour *CASP1* ; Non-ICI-M : $p < 0,01$ et ICI-M : $p < 0,0001$ pour *IL-1B*). L'expression de *GSDMD* a été étudiée dans le clone Sain (n=3 différenciations indépendantes), dans les clones Non-ICI-M 3D (n=2 différenciations indépendantes), 3M, 5I, 6F et 6G (n=1 différenciation indépendante par clone), ainsi que dans les clones ICI-M 1K (n=1 différenciation indépendante), 4A (n=3 différenciations indépendantes) et 7E (n=2 différenciations indépendantes). L'expression de *NLRP3* a été étudiée dans le clone Sain (n=3 différenciations indépendantes), les clones Non-ICI-M 3D (n=5 différenciations indépendantes), 5B (n=2 différenciations indépendantes), 3M, 5I, 6F et 6G (n=1 différenciation indépendante par clone), ainsi que dans les clones ICI-M 1K (n=4 différenciations indépendantes), 4A (n=3 différenciations indépendantes), 4E (n=2 différenciations indépendantes) et 7E (n=2 différenciations indépendantes). L'expression de *CASP1* et *IL-1B* a été étudiée dans les mêmes clones Non-ICI-M et ICI-M que ceux utilisés pour *NLRP3*. Les tests statistiques réalisés sont des ANOVA 2 ways suivies d'un test de Tukey pour effectuer les corrections multiples : *$p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

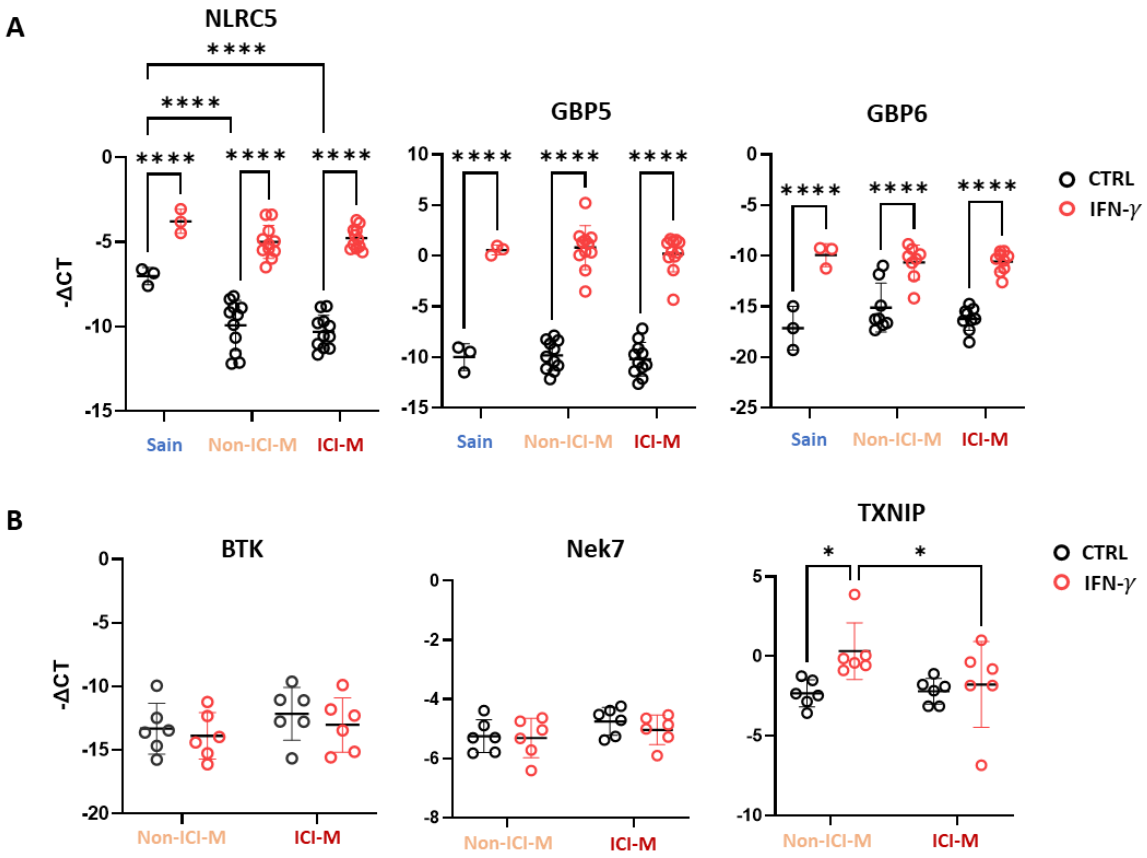


Figure 37 : Expression des transcrits de régulateurs du complexe inflammasome après traitement des hiPSC-EC par l'IFN-γ

(A) *NLRC5*, *GBP5* et *GBP6* sont surexprimés après traitement par l'IFN-γ dans le clone Sain et les deux groupes de patients ($p < 0,0001$). Le niveau d'expression basale de *NLRC5* est plus élevé dans le clone Sain que dans les clones de patients. **(B)** L'expression de *BTK* et *Nek7* n'est pas modifiée après traitement par l'IFN-γ. *TXNIP* est surexprimé par le traitement par l'IFN-γ dans le groupe Non-ICI-M ($p < 0,05$) et le niveau d'expression après le traitement par l'IFN-γ dans le groupe Non-ICI-M est supérieur à celui du groupe ICI-M ($p < 0,05$).

L'expression de *NLRC5*, *GBP5* et *GBP6* a été étudiée dans le clone Sain E-CT6 (n=3 différenciations indépendantes), dans les clones Non-ICI-M 3D (n=5 différenciations indépendantes), 5B (n=2 différenciations indépendantes), 3M, 5I, 6F et 6G (n=1 différenciation indépendante par clone), ainsi que dans les clones ICI-M 1K (n=4 différenciations indépendantes), 4A (n=3 différenciations indépendantes), 4E (n=2 différenciations indépendantes) et 7E (n=2 différenciations indépendantes). L'expression de *BTK*, *Nek7* et *TXNIP* a été étudiée dans le clone Sain E-CT6 (n=3 différenciations indépendantes), les clones Non-ICI-M 3D (n=2 différenciations indépendantes), 3M, 5I, 6F et 6G (n=1 différenciation indépendante par clone), ainsi que dans les clones ICI-M 1K (n=1 différenciation indépendante), 4A (n=3 différenciations indépendantes) et 7E (n=2 différenciations indépendantes). Les tests statistiques réalisés sont des ANOVA 2 ways suivies d'un test de Tukey pour effectuer les corrections multiples : *$p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

4.1.1. Conclusion concernant la modification de l'expression des transcrits

Nous observons que l'IFN-γ augmente globalement l'expression des gènes testés qui composent la voie de l'inflammasome aussi bien dans les cardiomyocytes que dans les cellules endothéliales. Cependant, des différences sont observées entre les hiPSC-CM et les hiPSC-EC. Dans tous les clones, *IL-1B* est surexprimée uniquement dans les hiPSC-EC après traitement par l'IFN-γ. Dans les clones de patients (Non-ICI-M et ICI-M), *NLRP3* est sur-exprimé uniquement dans les hiPSC-EC après traitement par l'IFN-γ. On observe une autre différence d'expression entre le clone Sain et les groupes de patients avec la surexpression de TXNIP dans les hiPSC-EC du groupe Non-ICI-M. Les effets de l'IFN-γ sur l'expression de ces transcrits dans les hiPSC-CM et les hiPSC-EC, dérivés du clone Sain et des deux groupes de patients, sont résumés dans la Figure 37.

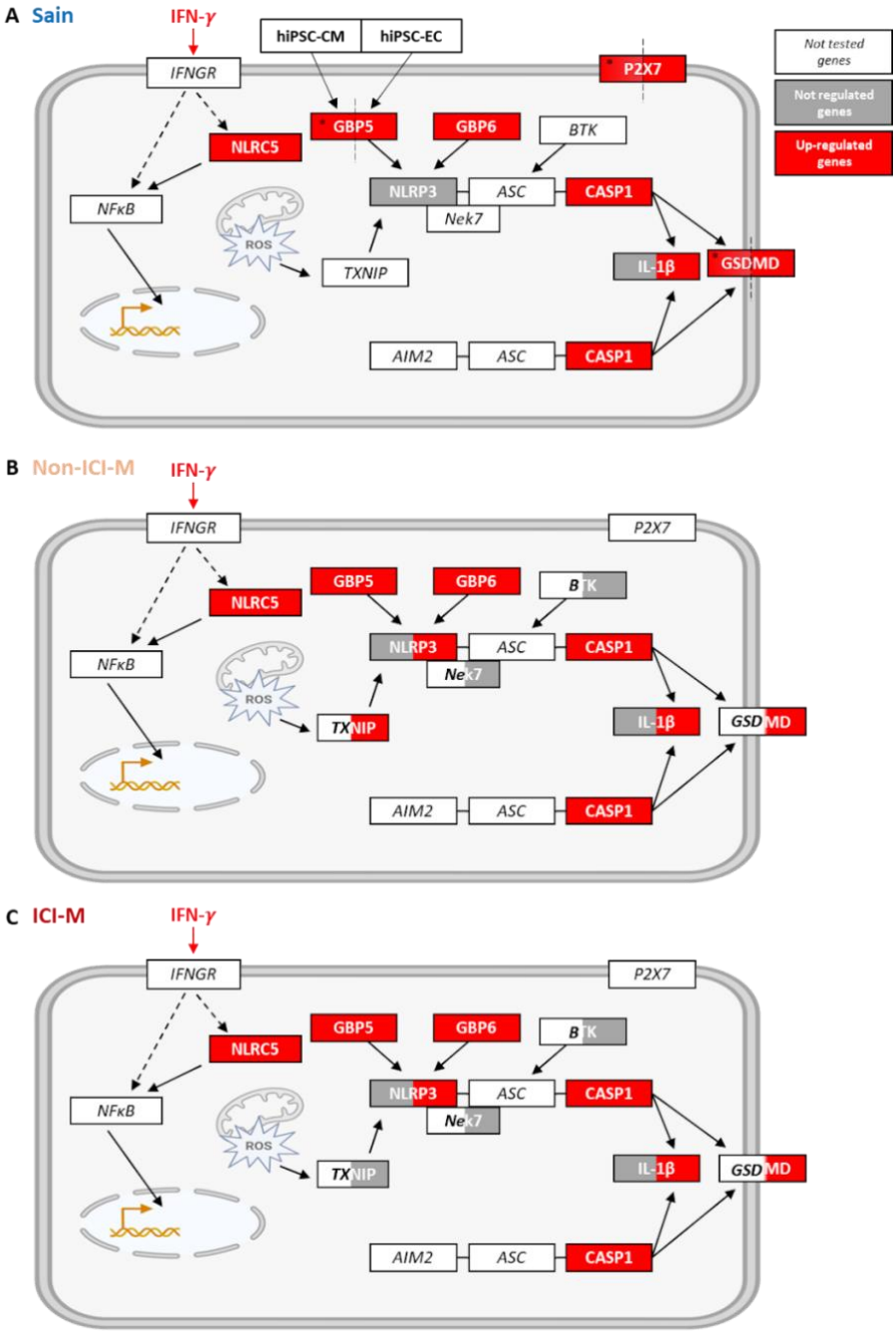


Figure 38 : Représentation schématique d'effet de l'IFN-γ sur l'expression des transcrits de la voie de l'inflammasome NLRP3 dans les hiPSC-CM et les hiPSC-EC

Pour chacun des transcrits, la moitié gauche du cadre indique l'effet de l'IFN-γ dans les hiPSC-CM et la moitié droite, l'effet de l'IFN-γ dans les hiPSC-EC. Les gènes non testés par qPCR sont en blancs et en italique. Les gènes qui ne sont pas modifiés après traitement par l'IFN-γ sont représentés en gris, et les gènes surexprimés après traitement par l'IFN-γ sont représentés en rouge. **(A)** Effet du traitement par l'IFN-γ dans le clone de la personne saine. hiPSC-CM : n=2 différenciations indépendantes ; hiPSC-EC : n=3 différenciations indépendantes **(B)** Effet du traitement par l'IFN-γ dans les clones de patients Non-ICI-M. hiPSC-CM : n=7 (3-4 différenciations indépendantes des clones 3D et 5B) ; hiPSC-EC : n=15 (1-3 différenciations indépendantes des clones 3D, 3M, 5B, 5I, 6F et 6G). **(C)** Effet du traitement par l'IFN-γ dans les clones de patients ICI-M. hiPSC-CM : n=7 (3-4 différenciations indépendantes des clones 1K et 4E) ; hiPSC-EC : n=13 (1-4 différenciations indépendantes pour les clones 1K, 4A, 4E et 7E).

4.2. Effet du traitement par l'IFN-γ sur l'expression protéique des récepteurs impliqués dans la réponse immunitaire

Nous avons ensuite recherché, par cytométrie en flux, l'effet de l'IFN-γ sur l'expression protéique de trois récepteurs impliqués dans la réponse immunitaire : les complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I et II (MHC-I et MHC-II) et le point de contrôle immunitaire PD-L1. Ces résultats ont été obtenus dans les mêmes cellules que celles des expériences précédentes.

4.2.1. Effet du traitement par l'IFN-γ sur les hiPSC-CM

Les différenciations en cardiomyocytes sur les clones de patients ont été réalisées avec l'aide de Thi Thom Tran.

Dans les hiPSC-CM, contrairement au clone Sain E-CT6 pour lequel aucun effet n'est observé, le traitement par l'IFN-γ s'accompagne d'une surexpression de PD-L1 dans les groupes Non-ICI-M et ICI-M ($p < 0,05$ et $p < 0,01$, respectivement) (Figure 39.A). Cependant, même s'il y a une tendance à la surexpression pour tous les clones testés, on observe une augmentation significative de PD-L1 dans les clones Non-ICI-M 3D ($p < 0,05$), et ICI-M 7E ($p < 0,01$). De plus, l'expression observée après traitement par l'IFN-γ dans ce clone 7E (ICI-M) est significativement plus élevée que celle dans le clone E-CT6 (Sain) (Tableau 14).

De la même manière, aucun effet sur MHC-I n'est observé après traitement par l'IFN-γ dans les hiPSC-CM du clone Sain (E-CT6), mais il y a une augmentation dans les groupes Non-ICI-M et ICI-M ($p < 0,05$) (Figure 39.B). Cependant, même si la tendance à la surexpression est constatée, seuls les clones Non-ICI-M 6F ($p < 0,05$) et 6G ($p < 0,01$), et le clone ICI-M 7E ($p < 0,001$) montrent une augmentation significative de MHC-I (Tableau 14).

Le traitement par l'IFN-γ n'a pas d'effet sur l'expression de MHC-II dans les hiPSC-CM quel que soit le clone étudié (Figure 39.C).

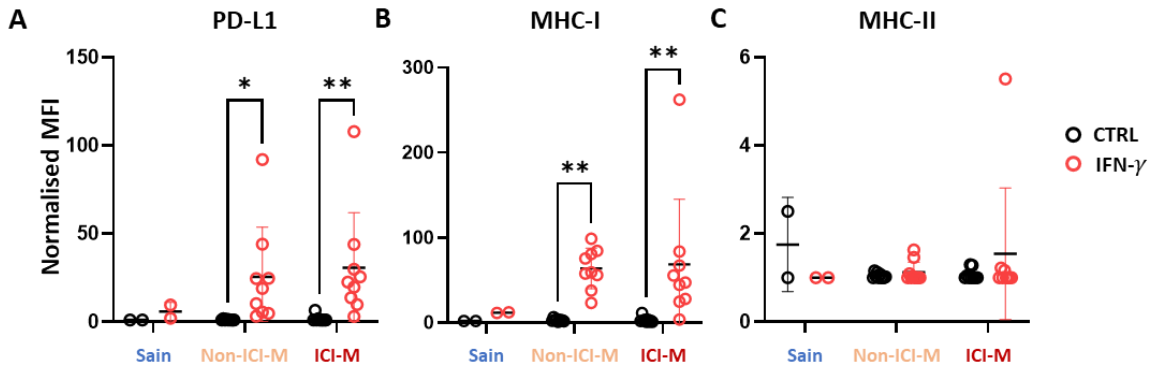


Figure 39 : Effet du traitement par l'IFN-γ sur l'expression des récepteurs impliqués dans la réponse immunitaire des hiPSC-CM

L'expression de PD-L1 **(A)** et MHC-I **(B)** est augmentée après traitement par l'IFN-γ dans les groupes Non-ICI-M et ICI-M mais elle n'est pas modifiée dans le clone Sain (E-CT6). L'expression de MHC-II **(C)** n'est modifiée ni dans le clone Sain (E-CT6), ni dans les groupes de patients. L'expression de ces protéines est quantifiée par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en MFI (Median Fluorescence Intensity) normalisée par rapport au marquage isotypique (MFI spécifique / MFI isotype). Sain : n=2 (2 différenciations indépendantes du clone E-CT6) ; Non-ICI-M : n=10 (3-4 différenciations indépendantes pour les clones 3D, 6F et 6G) ; ICI-M : n=9 (3 différenciations indépendantes pour les clones 1C, 4E et 7E). Les tests statistiques réalisés sont des ANOVA 2 ways suivies d'un test de Tukey pour effectuer les corrections multiples : *p < 0,05 et ** p < 0,01.

		PD-L1		MHC-I		MHC-II	
		CTRL	IFN-γ	CTRL	IFN-γ	CTRL	IFN-γ
Sain	E-CT6	1,03 ± 0,05	6,82 ± 4,16	2,26 ± 0,18	27,92 ± 27,57	1,50 ± 0,87	1,00 ± 0,00
Clones Non-ICI-M	3D	1,18 ± 0,31	35,77 ± 48,88*	2,08 ± 0,99	40,13 ± 18,08	1,04 ± 0,07	1,03 ± 0,05
	6F	1,27 ± 0,47	24,78 ± 19,26	3,07 ± 1,27	66,15 ± 15,96*	1,02 ± 0,02	1,01 ± 0,02
	6G	1,07 ± 0,12	15,61 ± 11,17	4,16 ± 2,16	85,18 ± 12,22**	1,08 ± 0,08	1,37 ± 0,33
Clones ICI-M	1C	1,00 ± 0,00	20,59 ± 6,12	1,55 ± 0,95	37,50 ± 41,43	1,10 ± 0,17	1,06 ± 0,10
	4E	1,27 ± 0,46	10,84 ± 8,35	3,19 ± 0,68	39,96 ± 10,43	1,02 ± 0,03	2,50 ± 2,61
	7E	2,87 ± 3,23	60,58 ± 41,64** [a]	5,03 ± 5,73	128,42 ± 116,19***	1,09 ± 0,16	1,07 ± 0,13

Tableau 14 : Variation du niveau d'expression induite après traitement par l'IFN-γ dans les hiPSC-CM

Les résultats présentés sont des MFI (Median Fluorescence Intensity) normalisées par rapport au marquage isotypique (MFI spécifique / MFI isotype). Plus la valeur est élevée, plus la protéine étudiée est détectée. Les tests statistiques réalisés sont des ANOVA 2 ways suivies d'un test de Tukey pour effectuer des corrections multiples. CTRL *vs* IFN-γ : *p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001 ; **** p < 0,0001. Comparaison des clones E-CT6 *vs* 7E après traitement à l'IFN-γ : [a] p < 0,05.

4.2.2. Effet du traitement par l'IFN-γ sur les hiPSC-EC

L'expression de PD-L1 est augmentée après traitement par l'IFN-γ dans le clone Sain ($p < 0,0001$) ainsi que dans les clones du groupe Non-ICI-M ($p < 0,05$), mais aucune modification n'est trouvée dans les clones du groupe ICI-M. De plus, l'expression de PD-L1 observée après traitement par l'IFN-γ est plus élevée dans le clone Sain que dans les clones des groupes Non-ICI-M ($p < 0,001$) et ICI-M ($p < 0,0001$) (Figure 40.A). Cependant, bien qu'il y ait une augmentation de PD-L1 à l'échelle du groupe Non-ICI-M, aucune surexpression significative n'est observée à l'échelle des clones (Tableau 15).

L'expression de MHC-I est augmentée après traitement par l'IFN-γ dans le clone Sain E-CT6 et dans les deux groupes de patients (Sain : $p < 0,05$; Non-ICI-M et ICI-M $p < 0,001$) (Figure 40.B). Cependant, même s'il y a une tendance à l'augmentation pour tous les clones testés, seuls le clone Non-ICI-M 5I ($p < 0,01$) et les clones ICI-M 1K et 7E ($p < 0,05$) montrent une augmentation significative de MHC-I (Tableau 15).

L'expression de MHC-II est augmentée après traitement par l'IFN-γ dans les clones des groupes Non-ICI-M ($p < 0,05$) et ICI-M ($p < 0,01$) (Figure 40.C). Cependant, même s'il y a une tendance à l'augmentation pour tous les clones testés, seuls le clone Non-ICI-M 3M ($p < 0,01$) et le clone ICI-M 1K ($p < 0,05$) montrent une augmentation significative de l'expression de MHC-II. Enfin, l'expression observée après traitement par l'IFN-γ pour le clone 3M est significativement plus élevée que celle dans les clones Non-ICI-M 3D et ICI-M 7E ($p < 0,05$) (Tableau 15).

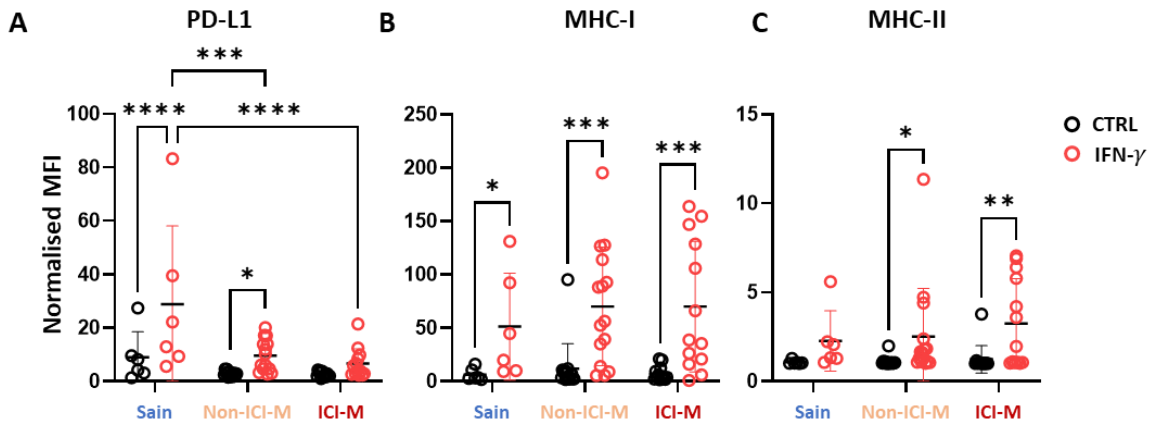


Figure 40 : Effet du traitement par l'IFN-γ sur l'expression des récepteurs impliqués dans la réponse immunitaire des hiPSC-EC

(A) L'expression de PD-L1 est augmentée dans les hiPSC-EC du clone Sain (E-CT6) et des clones Non-ICI-M par l'IFN-γ. Après traitement, le niveau d'expression de PD-L1 est plus élevé dans le clone Sain (E-CT6) que dans les groupes Non-ICI-M et ICI-M. **(B)** L'expression de MHC-I est augmentée dans le clone Sain (E-CT6) et les deux groupes de patients après traitement par l'IFN-γ. **(C)** L'expression de MHC-II est augmentée après traitement par l'IFN-γ dans les groupes Non-ICI-M et ICI-M mais n'est pas modifiée dans le clone E-CT6 (Sain). Pour MHC-I et MHC-II, on n'observe pas de différence d'expression significative entre le clone Sain (E-CT6) et les groupes de patients. L'expression de ces protéines est quantifiée par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en MFI (Median Fluorescence Intensity) normalisée par rapport au marquage isotypique (MFI spécifique / MFI isotype). Sain : n=6 différenciations indépendantes du clone E-CT6 ; Non-ICI-M : n=15 (1-3 différenciations indépendantes pour les clones 3D, 3M, 5B, 5I, 6F et 6G) ; ICI-M : n=13 (1-4 différenciations indépendantes pour les clones 1K, 4A, 4E et 7E). Les tests statistiques réalisés sont des ANOVA 2 ways suivies d'un test de Tukey pour effectuer les corrections multiples : *p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001 ; **** p < 0,0001.

		PD-L1		MHC-I		MHC-II	
		CTRL	IFN-γ	CTRL	IFN-γ	CTRL	IFN-γ
Sain	E-CT6	9,00 ± 9,57	28,85 ± 29,30***	6,40 ± 5,73	51,32 ± 50,12	1,08 ± 0,11	2,27 ± 1,70
Clones Non-ICI-M	3D	2,62 ± 0,61	7,93 ± 5,14	4,33 ± 2,03	48,87 ± 31,32	1,01 ± 0,02	1,60 ± 0,63
	3M	1,97 ± 0,33	10,24 ± 9,84	10,26 ± 2,55	72,27 ± 22,46	1,04 ± 0,03	6,60 ± 6,72** [a]
	5B	4,61	13,88	9,58	92,82	1,08	1,31
	5I	2,63 ± 0,19	9,03 ± 4,20	8,14 ± 1,72	120,44 ± 9,04**	1,08 ± 0,07	1,37 ± 0,35
	6F	3,24 ± 1,26	11,59 ± 8,31	3,81 ± 3,83	50,17 ± 82,04	1,07 ± 0,03	1,89 ± 1,43
	6G	2,00	4,73	95,38	127,57	2,00	4,73
Clones ICI-M	1K	2,46 ± 1,22	5,65 ± 4,17	12,18 ± 8,65	64,65 ± 63,21*	1,01 ± 0,02	4,88 ± 2,56**
	4A	2,54 ± 0,92	5,13 ± 2,67	4,31 ± 3,49	54,94 ± 74,18	1,75 ± 1,36	3,41 ± 2,40
	4E	3,88	9,90	3,95	128,62	1,01	1,07
	7E	2,27 ± 0,85	9,02 ± 10,80	3,60 ± 2,34	79,80 ± 61,54*	1,02 ± 0,02	1,07 ± 0,04 [b]

Tableau 15 : Variation du niveau d'expression induite après traitement par l'IFN-γ dans les hiPSC-EC

Les résultats présentés sont des MFI (Median Fluorescence Intensity) normalisées par rapport au marquage isotypique (MFI spécifique / MFI isotype). Plus la valeur est élevée, plus la protéine ciblée est exprimée. Les tests statistiques réalisés sont des ANOVA 2 ways suivies d'un test de Tukey pour effectuer les corrections multiples. CTRL *vs* IFN-γ : *p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001 ; **** p < 0,0001. Comparaison des 3D *vs* 3M et 3M *vs* 7E après traitement par l'IFN-γ : [a] et [b] p < 0,05.

4.2.3. Conclusion concernant la modification de l'expression protéique

En résumé, le traitement par l'IFN-γ induit des modifications d'expression de trois récepteurs impliqués dans la réponse immunitaire : PD-L1, MHC-I et MHC-II.

- L'expression de PD-L1 n'est pas modifiée par le traitement par l'IFN-γ pour les hiPSC-CM du clone Sain alors qu'elle est augmentée pour les clones des groupes Non-ICI-M et ICI-M. Dans les hiPSC-EC, l'expression de PD-L1 n'est augmentée par le traitement par l'IFN-γ que pour l'échantillon Sain et le groupe Non-ICI-M.

- L'expression de MHC-I est augmentée par le traitement par l'IFN-γ pour les hiPSC-CM des groupes Non-ICI-M et ICI-M. Elle est par contre augmentée par le traitement par l'IFN-γ dans les hiPSC-EC du clone Sain et des deux groupes de patients.

- L'expression de MHC-II n'est pas modifiée après le traitement par l'IFN-γ pour les hiPSC-CM, que soit dans le clone Sain ou dans les groupes de patients, mais elle est augmentée dans les hiPSC-EC des groupes Non-ICI-M et ICI-M après traitement par l'IFN-γ.

- Enfin, nous notons des différences en fonction des clones des groupes de patients, non seulement en fonction du groupe, mais aussi, au sein d'un même groupe. Certains changements d'expression sont portés par le clone 3D (Non-ICI-M) différencié en hiPSC-CM, en particulier l'augmentation d'expression de PD-L1, ainsi que par les clones 6F et 6G (Non-ICI-M) différenciés en hiPSC-CM pour l'augmentation de MHC-I. Les clones 5I et 3M (Non-ICI-M) différenciés en hiPSC-EC présentent une augmentation de MHC-I et MHC-II respectivement. Pour le groupe ICI-M, le clone 7E différencié en hiPSC-CM, exprime spécifiquement plus de PD-L1 et MHC-I, alors que lorsqu'il est différencié en hiPSC-EC, il exprime plus MHC-I uniquement. Quant au clone 1K (ICI-M) différencié en hiPSC-EC, il exprime significativement plus MHC-I et MHC-II.

4.3. Conclusion de l'étude de l'effet du traitement par l'IFN-γ dans les hiPSC de patients différenciés en cellules cardiaques

Cette caractérisation des clones hiPSC de patients Non-ICI-M et ICI-M, différenciés en cellules cardiaques s'est étendue sur mes 4 années de thèse dès le début de la génération des clones hiPSC. Pour chacun des clones, j'ai effectué plusieurs différenciations indépendantes, en cardiomyocytes et en cellules endothéliales, que j'ai traitées afin d'obtenir suffisamment d'ARN pour réaliser un séquençage de l'ARN dans les prochains mois.

À partir de ces hiPSC-CM et hiPSC-EC, j'ai débuté la caractérisation de quelques transcrits codant pour des composants et des régulateurs de l'inflammasome NLRP3, et de quelques récepteurs liés à l'inflammation. Les résultats indiquent des réponses spécifiques pour chacun des types cellulaires (CM ou EC) et chacun des groupes de patients (Non-ICI-M et ICI-M).

Au niveau des transcrits étudiés, le traitement par l'IFN-γ est associé à une augmentation de leur expression dans les deux types cellulaires, et de manière similaire à l'expérience de microarray (Section 2). Nous observons également plus de modifications pour les hiPSC-EC que pour les hiPSC-CM, *IL-1B* et *NLRP3* sont surexprimés après traitement par l'IFN-γ uniquement dans les hiPSC-EC.

Des différences d'expression sont également observées entre les deux groupes de patients. L'expression de *NLRP3* après traitement par l'IFN-γ reste inchangée dans le clone Sain alors qu'elle est augmentée dans les groupes de patients. L'expression de TXNIP est quant à elle augmentée dans le groupe Non-ICI-M mais elle reste inchangée dans le groupe ICI-M.

Au niveau protéique, nous observons également plus de différences dans les hiPSC-EC que dans les hiPSC-CM, et ces modifications diffèrent entre le clone Sain et les deux groupes de patients. En effet, après traitement par l'IFN-γ, l'expression de PD-L1 est augmentée dans les hiPSC-EC du clone Sain et des clones Non-ICI-M, l'expression de MHC-I est augmentée dans les hiPSC-EC du clone Sain et celles des deux groupes de patients et l'expression de MHC-II est augmentée dans les hiPSC-EC des groupes Non-ICI-M et ICI-M. Le traitement par l'IFN-γ induit la surexpression de PD-L1 et MHC-I dans les hiPSC-CM des clones de patients Non-ICI-M et ICI-M. L'expression de MHC-II reste inchangée après traitement par l'IFN-γ.

En plus de spécificité d'expressions au clone Sain (E-CT6) et à chaque groupe comme, décrit ci-dessus, j'ai observé des modifications propres à certains clones. Dans le groupe Non-ICI-M, après traitement par l'IFN-γ, la surexpression de PD-L1 est principalement détectée dans le clone 3D et la surexpression de MHC-I est principalement détectée dans les clones 6F et 6G lorsqu'ils sont différenciés en CM. La surexpression de MHC-I est principalement portée par le clone 5I et celle de MHC-II par le clone 3M lorsque les hiPSC sont différenciées en EC. Dans le

groupe ICI-M, après traitement par l'IFN-γ, les surexpressions de PD-L1 et de MHC-I sont principalement le fait du clone 7E lorsque les hiPSC sont différenciés en CM. Dans les hiPSC-EC, après traitement par l'IFN-γ, le clone 7E porte la surexpression de MHC-I et le clone 1K la surexpression à la fois de MHC-I et MHC-II.

Ces résultats montrent que le traitement par l'IFN-γ a des conséquences différentes selon le type cellulaire (hiPSC-CM *vs* hiPSC-EC), mais également selon les échantillons Sain, Non-ICI-M et ICI-M. Enfin, certains changements d'expression spécifiques observés à l'échelle des clones mettent en évidence une hétérogénéité intra-groupe qui pourrait être déterminante pour l'étude des mécanismes physiopathologiques sous-jacents à la MIM.

Discussion

1. Variabilité des clones hiPSC : description et causes possibles

1.1. Reprogrammation

Les clones hiPSC que j'ai utilisés au cours de ma thèse ont tous été générés par la plateforme de cellules souche MaCS (MMG, Marseille). Deux méthodes de reprogrammation ont été utilisées et deux types cellulaires utilisés : des fibroblastes cutanés ont été reprogrammés par nucléofection de plasmides épisomaux, et des PBMC ont été reprogrammés *via* le virus Sendai, une méthode mise au point plus récemment sur la plateforme. Ces deux méthodes de reprogrammation sont non intégratives, elles n'altèrent donc pas le génome des donneurs. Tandis que l'utilisation de virus Sendai est une méthode de reprogrammation efficace et fiable (plus de 90 % de succès), l'utilisation d'épisomes présente un taux d'aneuploïdie plus élevé comparé au virus Sendai (11,5 % pour les épisomes contre 4,6 % pour Sendai) (Schlaeger et *al.*, 2015). Des contrôles qualités ont été effectués avant utilisation de chacun des clones pour vérifier (i) que les vecteurs viraux et épisomaux ne sont plus exprimés dans les hiPSC, (ii) que le caryotype ne présente aucune anomalie, (iii) que les hiPSC expriment les gènes de pluripotence et (iv) que ces cellules conservent leur capacité de différenciation en chacun des trois feuillets embryonnaires. Les résultats de ces contrôles qualité, résumés dans le Tableau 10 (Chapitre Résultats), montrent qu'il existe un premier niveau de variabilité inter-clone, y compris entre clones reprogrammés chez un même patient, mais tous satisfont aux quatre critères de qualité exigés pour leur utilisation dans notre étude.

1.2. Différenciation

Pour réaliser les différenciations en cardiomyocytes (hiPSC-CM) et en cellules endothéliales (hiPSC-EC), j'ai utilisé des kits de différenciation commerciaux. L'objectif était de standardiser les protocoles et d'améliorer la reproductibilité des expériences, comme recommandé dans la littérature (Volpato & Webber, 2020). Bien que la capacité de différenciation en cellules mésodermiques ait été vérifiée par le développement en corps embryoïdes, j'ai rencontré des difficultés pour différencier certains clones en hiPSC-CM ou en hiPSC-EC. Il a ainsi été possible de différencier certains clones uniquement en hiPSC-EC, d'autres uniquement en hiPSC-CM,

alors que d'autres ont permis d'obtenir les 2 types cellulaires, et certains aucun des deux. Par exemple, le clone 4A s'est mal différencié en hiPSC-CM mais très bien en hiPSC-EC, tandis que le clone 4E s'est très bien différencié en hiPSC-CM et en hiPSC-EC. Ces observations sont en accord avec les travaux de (Yun et *al.*, 2024), qui montrent que des clones hiPSC issus d'un même donneur présentent des différences significatives dans leur capacité de différenciation en cardiomyocytes. Leur étude souligne que cette variabilité pourrait être attribuée à des différences transcriptomiques et épigénétiques, ainsi qu'à l'accessibilité chromatinienne des régions régulatrices de l'ADN (Yun et *al.*, 2024)**.** Ces résultats mettent en évidence un second niveau de variabilité lié à la capacité intrinsèque des clones à se différencier.

L'ensemble de mon travail de caractérisation des hiPSC-EC a permis de mettre en avant que les cellules endothéliales obtenues à partir du clone Sain (E-CT6) présentent une plus grande variabilité au niveau de l'expression des marqueurs vasculaires et endocardiques que les cellules obtenues à partir des clones des groupes de patients Non-ICI-M et ICI-M. Nous avons dans un premier temps supposé que cette variabilité pouvait provenir de la méthode de reprogrammation. En effet, le clone Sain a été reprogrammé par nucléofection de plasmide épisomaux, alors que les clones du groupe Non-ICI-M ont tous été reprogrammés par virus Sendai, et que deux des clones du groupe ICI-M ont été reprogrammés par nucléofection et un par virus Sendai (Tableau 9, Chapitre Résultats). Cependant, lorsque l'on compare les moyennes d'expression des différents marqueurs endothéliaux et les écart-types pour chacun des groupes, on observe moins de variabilité dans le groupe ICI-M (avec les deux méthodes de reprogrammation) que dans le groupe Non-ICI-M (reprogrammation *via* virus Sendai).

Notre deuxième hypothèse qui pourrait expliquer la plus grande variabilité d'expression des marqueurs endothéliaux dans les différenciations du clone Sain (E-CT6), par rapport à celles des clones Non-ICI-M et ICI-M, est liée au nombre de passages des hiPSC avant leur entrée en différenciation. En effet, le clone Sain nous a été fourni au passage 30 en 2018, et les différenciations ont été réalisées majoritairement autour du passage 40 au cours de ces deux dernières années. À l'inverse, les clones des groupes Non-ICI-M et ICI-M ont été utilisés à des passages beaucoup plus précoces pour les différenciations, généralement autour de 10-15 passages, et rarement au-delà de 20 passages. La stabilité des hiPSC-EC dérivées du clone Sain pourrait être affectée par des mutations et des anomalies génétiques (*e.g.* variations du nombre de copies, aneuploïdies) accumulées au cours des passages, entraînant une plus grande variabilité des caractéristiques phénotypiques et/ou fonctionnelle (Gore et *al.*, 2011; Schlaeger et *al.*, 2015). Les clones de nos deux groupes de patients, utilisés à des passages plus précoces, ont un risque réduit d'accumulation de ces anomalies, ce qui pourrait expliquer une plus grande homogénéité dans leurs différenciations. Cette possibilité souligne l'importance d'une caractérisation approfondie des clones et d'un contrôle strict des conditions expérimentales, cela pour minimiser les variations dans les études impliquant des hiPSC. Cependant, cette variabilité observée pour les marqueurs endothéliaux dans les hiPSC-EC n'est pas retrouvée de manière aussi systématique pour les marqueurs cardiomyocytaires dans les hiPSC-CM. De plus, les résultats sur les hiPSC-EC obtenus au tout début de mes

travaux sur des passages plus précoces du clone Sain ne confirment pas non plus de manière systématique cette observation. Cette variabilité pourrait aussi être portée par la génétique/épigénétique des cellules de ce clone. Il est donc primordial de vérifier dans le clone Sain une éventuelle dérive génétique acquise et de compléter ces travaux par l'étude de clones supplémentaires provenant de donneurs sains.

1.3. Traitement par l'IFN-γ

Pour la robustesse des analyses, mon objectif était d'obtenir trois différenciations indépendantes pour chaque clone hiPSC de patients et pour chacun des deux types cellulaires. Cependant, la complexité de ce modèle, avec contraintes techniques et logistiques, auxquelles s'ajoute la variabilité observée, ne m'a pas permis d'atteindre cet objectif pour tous les clones.

J'ai caractérisé l'effet du traitement par l'IFN-γ sur les clones différenciés en cellules endothéliales et/ou en cardiomyocytes au fur et à mesure des disponibilités des clones et de l'obtention des différenciations. Pour chacun des deux types cellulaires, les clones ont été traités par l'IFN-γ et j'ai caractérisé leur réponse soit individuellement, en comparant tous les clones entre eux, soit en comparant les groupes entre eux (patients ICI-M *vs* Non-ICI-M). Les résultats montrent des réponses spécifiques soit du type cellulaire étudié, cardiomyocyte *vs* cellule endothéliale, soit du groupe étudié ICI-M *vs* Non-ICI-M. Ceci est discuté ci-après, dans la section 2 de ce chapitre Discussion. Mais cette analyse a également révélé des différences de comportement, d'une part entre les clones au sein d'un même groupe, et d'autre part entre les clones issus d'un même donneur, notamment dans les hiPSC-EC. Ces différences de comportement ont été observées en l'absence et en présence d'un traitement par l'IFN-γ. Ce résultat indique qu'il existe une variabilité inter- et intra-donneur pour un même groupe de patients. Des expériences supplémentaires, pour atteindre au moins trois différenciations indépendantes pour chaque type cellulaire et chaque clone, devront être réalisées afin de vérifier l'ensemble des résultats obtenus.

Pour la suite de l'étude, il sera nécessaire de séquencer les clones hiPSC afin d'explorer s'ils possèdent des caractéristiques distinctes en fonction du donneur, ou de son origine (Non-ICI-M ou ICI-M), et cela indépendamment de l'état de différenciation des hiPSC. Cette analyse permettra de rechercher des traits génétiques/épigénétiques, provenant des patients et qui auraient été conservées dans les clones hiPSC, mais aussi des caractéristiques acquises par les clones lors de leur reprogrammation. Cette analyse contribuera aussi à une meilleure compréhension de la variabilité fonctionnelle des clones en fonction de leurs caractéristiques initiales.

En résumé, la variabilité observée dans les résultats obtenus avec les clones hiPSC pourrait s'expliquer par plusieurs facteurs comme (i) les méthodes de reprogrammation, (ii) l'instabilité au cours de la culture des cellules, (iii) des différences transcriptomiques et épigénétiques intrinsèques. Ces facteurs sont capables d'influencer significativement la différenciation des hiPSC en cardiomyocytes ou en cellules endothéliales, et de moduler l'effet de stimuli comme le traitement par l'IFN-γ sur les cellules différenciées. Cette variabilité révèle une hétérogénéité inter- et intra-donneur. La caractérisation approfondie des clones hiPSC, incluant leur signature génétique et épigénétique, sera essentielle pour mieux comprendre les déterminants de leur variabilité fonctionnelle et optimiser leur utilisation dans l'étude des mécanismes des myocardites induites par les ICI.

2. Comparaison des effets sur les hiPSC-CM et sur les hiPSC-EC d'un traitement par l'IFN-γ dans le contexte de la myocardite immuno-médiée

L'ensemble de ces travaux nous a permis de débuter l'exploration des effets concernant (i) le traitement par des cytokines pro-inflammatoires (IFN-γ *vs* CTRL ou Cocktail *vs* CTRL), (ii) le type cellulaire (CM *vs* EC) et (iii) le critère de cardiotoxicité (ICI-M *vs* Non-ICI-M *vs* Sain).

2.1. Effets des cytokines inflammatoires

Dans les résultats de l'analyse transcriptomique, l'IFN-γ induit majoritairement une augmentation de l'expression des transcrits dans les cardiomyocytes et les cellules endothéliales, et ce dans les deux clones hiPSC étudiés : Sain et ICI-M. L'IFN-γ a un effet sur différentes voies de signalisation dont les voies JAK-STAT, NOD-like, Toll-like et NF-κB qui sont associées à différents processus biologiques dont la réponse inflammatoire, la sécrétion de cytokines, l'adhésion cellulaire ou encore la mort cellulaire.

La voie JAK-STAT est la principale voie activée par l'IFN-γ (Schroder et *al.*, 2004). Après le traitement, on observe dans les hiPSC-CM et les hiPSC-EC une surexpression de *STAT1*, *STAT2*, *STAT3* et de régulateurs transcriptionnels (*e.g. IRF1* (Interferon Regulatory Factor 1), *IRF7, IRF8* et *IRF9)*. On observe aussi la diminution de l'expression de *SOCS2*, un inhibiteur de la voie JAK-STAT, mais cela uniquement dans les hiPSC-CM. Des cultures primaires de cellules endothéliales cardiaques (HCMEC et HCAEC) traitées par l'IFN-γ montrent les mêmes

régulations que celles observées dans notre étude et l'utilisation de différents inhibiteurs de JAK bloque la surexpression de ces gènes (Valenzuela, 2023).

Différentes études ont montré que l'activation de la voie JAK-STAT par l'IFN-γ induit la surexpression des gènes codants pour des protéines impliquées dans la présentation antigénique (*MHC-I* et *MHC-II*) et dans l'immunomodulation (*PD-L1*), dans les cellules endothéliales (Eppihimer et *al.*, 2013; Grinnemo et *al.*, 2019; Valenzuela, 2023), et dans les cardiomyocytes (Didié et al., 2017; Seko et al., 1990; Tay et al., 2020). L'expression de *PD-L2* est également augmentée par l'IFN-γ dans les cellules endothéliales (Rodig et *al.*, 2003). Ces régulations sont en accord avec nos données de microarray : *MHC-I*, *MHC-II* et *PD-L1* sont surexprimées dans les hiPSC-CM et dans les hiPSC-EC, *PD-L2* l'étant uniquement dans les hiPSC-EC. Au niveau protéique, dans les CM et les EC, l'IFN-γ et le cocktail de cytokines, modifient également l'expression de PD-L1, de MHC-I et de MHC-II. Nous montrons également dans notre étude que l'activation de la voie JAK-STAT par l'IFN-γ cause aussi la surexpression des transcrits codants pour différentes cytokines pro-inflammatoires (*e.g.* CXCL9, CXCL10 et CXCL11). Toutes trois sont impliquées dans la réponse immunitaire et plus particulièrement dans la chemoattraction des cellules immunitaires au niveau du site d'inflammation (Metzemaekers et *al.*, 2018).

L'activation de la voie JAK-STAT par l'IFN-γ entraîne également une augmentation des protéines d'adhésion, dont ICAM1, comme rapporté dans la littérature (Chang et *al.*, 2002). Dans nos données de microarray, nous observons également la surexpression d'ICAM1 dans les hiPSC-CM et les hiPSC-EC en réponse au traitement par l'IFN-γ. De manière similaire, dans les cardiomyopathies dilatées, l'expression des protéines d'adhésion à la surface des cellules cardiaques augmente sous l'effet des cytokines pro-inflammatoires, facilitant ainsi l'infiltration et la migration des cellules immunitaires vers le site d'inflammation au travers de la barrière endothéliale (Noutsias et *al.*, 1999).

Les voies de signalisation intracellulaire NOD-like, Toll-like et NF-κB sont impactées par la stimulation par l'IFN-γ dans notre analyse de microarray (clone Sain *vs* un clone Non-ICI-M). Plusieurs gènes de ces voies sont surexprimés par l'IFN-γ : *GBP1/2/3/4/5*, *TLR3*, *P2X7*, *CASP1/4*, *GSDMD* ou encore *NLRC5* dans les hiPSC-CM et les hiPSC-EC et *TLR2*, *AIM2* et *TXNIP* uniquement dans les hiPSC-EC. Nous avons regardé par qPCR l'expression de certains transcrits dans l'ensemble des clones hiPSC (Sain, ICI-M et Non-ICI-M) différenciés en CM et en EC. La surexpression après le traitement par l'IFN-γ de ces mêmes transcrits, *NLRC5*, *GBP5*, *GBP6* et *CASP1*, a été retrouvée. Comme détaillé dans l'introduction, la mise en place du complexe de l'inflammasome NLRP3 est régulée par les TLR, GBP et NLRC5. L'activation de la voie TLR/NF-κB induit la transcription de *NLRP3* et de l'*IL-1B* (Toldo & Abbate, 2024). Dans nos données de qPCR, nous observons que le traitement par l'IFN-γ induit la surexpression de *NLRP3* et d'*IL-1B* dans les hiPSC-EC des clones ICI-M et Non-ICI-M. De plus, les GBP permettent de stabiliser le complexe de l'inflammasome au cours de sa mise en place, tout comme NLRC5 (Davis et *al.*, 2011; B.-H. Kim et *al.*, 2016; Xie et *al.*, 2019). Nous observons dans l'ensemble

des clones testés que l'IFN-γ induit la transcription de gènes essentiels à la mise en place de l'inflammasome.

Notre étude sur le clone Sain nous a permis de comparer la réponse des hiPSC différenciées en cardiomyocytes et en cellules endothéliales à l'IFN-γ et à un cocktail de cytokines inflammatoires (IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-6, CCL5, TNF-α et GZMB). Parmi les cytokines testées, l'IFN-γ est la seule à induire une augmentation de l'expression protéique de MHC-I et PD-L1 dans les hiPSC-EC, un effet qui est encore plus marqué en présence du cocktail. Dans les hiPSC-CM, MHC-I est régulé de manière similaire par le traitement par l'IFN-γ seul et le cocktail, tandis que PD-L1 n'est induit qu'en présence du cocktail. Par qPCR, nous avons observé que la surexpression induite par le traitement par l'IFN-γ de *P2X7*, *NLRC5*, *GBP5*, *GBP6*, *AIM2* et *GSDMD* semble amplifiée avec le cocktail de cytokines dans les hiPSC-EC et hiPSC-CM. Cet effet est encore plus marqué sur la viabilité des hiPSC-EC, où l'IFN-γ et le cocktail entraînent une diminution significative, le cocktail atteignant un niveau de mortalité équivalent à celui de la camptothécine (contrôle positif), avec une activation des caspases-3 et -7 plus importante sous cocktail qu'après traitement par l'IFN-γ seul. Ces résultats confirment la pertinence de notre choix d'utiliser principalement l'IFN-γ dans nos travaux, celui-ci étant la cytokine ayant l'effet le plus marqué sur les régulations observées.

Nos résultats montrent que le traitement par l'IFN-γ active plusieurs voies de signalisation clés, dont JAK-STAT, NOD-like, Toll-like et NF-κB, cela aussi bien dans les hiPSC différenciées en cardiomyocytes que dans les cellules endothéliales. Ces activations augmentent l'expression de gènes liés à l'immunomodulation, à la présentation antigénique, à la chemoattraction immunitaire et à l'inflammasome NLRP3. La voie de l'IFN-γ et l'implication de l'inflammasome NLRP3, ont été mises en évidence dans des biopsies endomyocardiques de patients atteints de MIM post-ICI (Finke et *al.*, 2021), nous confortant dans le choix de l'IFN-γ comme traitement de choix dans nos travaux et renforçant ainsi la pertinence de notre modèle pour l'étude de cette pathologie.

2.2. Réponses spécifiques des hiPSC-EC et des hiPSC-CM

De manière générale, nous avons observé plus d'effet des cytokines pro-inflammatoires (IFN-γ seul ou cocktail de cytokines) dans les hiPSC-EC que dans les hiPSC-CM. Une des différences majeures est la forte mortalité des EC observée après les différentes stimulations, alors que les CM ne sont que très faiblement impactés par l'IFN-γ et le cocktail. Les caspases-3 et -7 sont plus actives dans les EC que dans les CM ce qui montre une plus grande sensibilité des EC comme décrit dans la littérature (Kücük et *al.*, 2024; Scarabelli et *al.*, 2001; Spetz et *al.*, 2022). En particulier, les EC sont plus sensibles à l'apoptose que les CM en réponse aux chimiothérapies cytotoxiques comme le cisplatine et la doxorubicine (Kücük et *al.*, 2024; Spetz et *al.*, 2022). La doxorubicine provoque davantage de cassures double-brin de l'ADN dans les

EC que dans les CM. L'augmentation de la phosphorylation de p53 active l'apoptose dans les EC, alors que ce mécanisme absent dans les CM souligne leur résistance à ce processus. Cependant, la capacité réduite des CM à réparer les cassures double-brin de l'ADN peut accélérer leur sénescence, contribuant ainsi à la cardiotoxicité tardive de ce traitement anticancéreux (Kücük et *al.*, 2024). La sensibilité des EC à l'apoptose s'expliquerait par leur prédisposition accrue à déclencher l'apoptose (*priming* apoptotique) en raison d'un déséquilibre en faveur des protéines pro-apoptotiques au détriment des anti-apoptotiques de la famille BCL-2. Les EC expriment des niveaux élevés de protéines BAX et BAK, toutes deux indispensables à la voie apoptotique intrinsèque, comparé aux CM. Cette sensibilité particulière des EC conduit à une vulnérabilité associée à une augmentation des événements cardiovasculaires indésirables (*e.g.* ischémie myocardique) lors des traitements anticancéreux (Spetz et *al.*, 2022). Nos résultats montrent une tendance similaire concernant l'activité de la caspase-1, mais que nous ne pouvons exploiter du fait du fort taux mesuré dans la condition non stimulée. Il sera important de changer de méthode pour mesurer cette activité (immunomarquage ou western-blot).

Dans l'analyse transcriptomique, même si *ICAM1* est surexprimé lors du traitement par l'IFN-γ dans les deux types cellulaires, un plus grand nombre de gènes associés à l'adhésion cellulaire sont surexprimés dans les hiPSC-EC comparé aux hiPSC-CM. L'IFN-γ, en activant la voie des MAP Kinases (p38), est responsable de la perméabilisation de la barrière endothéliale (Ng et *al.*, 2015; Valenzuela, 2023). Dans les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC), la phosphorylation de MAP p38 induit une condensation des filaments d'actine avec une rétraction des cellules dès les premières heures de stimulation par l'IFN-γ. Après 12 heures, les filaments d'actine sont redistribués et forment des fibres de stress provoquant une élongation cellulaire. Ces fibres de stress contribuent à la formation d'interstices intercellulaires augmentant ainsi la perméabilité des cellules endothéliales (Ng et *al.*, 2015). Dans le tissu cardiaque, au cours de la MIM post-ICI, il est possible que l'IFN-γ, en plus de la mortalité des cellules endothéliales, provoque l'augmentation de protéines d'adhésion, contribuant à la désorganisation de l'endothélium, vasculaire et endocardique, et facilitant infiltration immunitaire dans le myocarde.

Outre ce possible changement de structure tissulaire, le stress endothélial se traduit dans nos données par une augmentation de la sécrétion, aussi bien cytokinique que paracrine. On observe la surexpression de *AIM2*, *GSDMD, TXNIP* et *IL-1B*, après traitement par l'IFN-γ. Cette surexpression est spécifique des hiPSC-EC aussi bien dans le microarray que dans l'étude par qPCR. Dans les maladies cardiovasculaires, AIM2 joue un rôle central dans le maintien de l'homéostasie et dans l'inflammation vasculaire. Les EC sont exposées à divers stress, dont les cytokines pro-inflammatoires, qui peuvent activer l'inflammasome AIM2. Cette activation induit une dysfonction endothéliale, favorisant le développement de l'athérosclérose et l'instabilité des plaques, augmentant ainsi le risque d'événements cardiovasculaires majeurs comme l'infarctus du myocarde. Bien que les CM soient également affectés par l'activation

d'AIM2, notamment dans des conditions de stress métabolique comme la cardiomyopathie diabétique, le rôle d'AIM2 y semble moins prédominant (Du et *al.*, 2022; Ge et *al.*, 2018).

Outre *IL-1B*, des transcrits codant pour des cytokines pro-inflammatoires (*CCL5*, *CCL7* et *CCL8*) sont retrouvés surexprimés après traitement par l'IFN-γ dans les hiPSC-EC. Ces cytokines ont déjà été identifiées comme associées à la MIM post-ICI (Blum et *al.*, 2024; Ji et *al.*, 2019) et leur rôle en physiopathologie sera détaillé ci-après dans la section 2.3. En plus des signaux pro-inflammatoires, nous avons observé différents peptides ou protéines surexprimés dans les hiPSC-EC après traitement par l'IFN-γ (*EDN1*, *THBS1*, *THBS4*, *TNC*, *BMP4*, *MDK* et *ADM2*) ; tous sont capables d'influer sur la contraction des CM. Par exemple, EDN1 (endothéline-1) est un peptide inotrope qui, comme les thrombospondines 1 et 4 (THBS1/4), induit une hypertrophie des cardiomyocytes associée à de la fibrose et conduisant à de l'insuffisance cardiaque. La tenascine-C (TNC) est quant à elle impliquée dans le remodelage cardiaque post-infarctus et dans la myocardite auto-immune, en facilitant l'adhésion et la migration cellulaire (Segers et *al.*, 2018).

Après traitement par l'IFN-γ ou le cocktail de cytokines, les hiPSC-CM ne présentent que peu de spécificité par rapport aux hiPSC-EC. L'analyse du microarray comparant le clone hiPSC Sain et un clone hiPSC ICI-M met en évidence une surexpression spécifique de *CEACAM1* (codant pour une protéine d'adhésion), ainsi que de certains transcrits codant pour des cytokines (*e.g.* CCL21 et CCL25). Par ailleurs, l'étude du clone Sain révèle une surexpression de *P2X7* après traitement par l'IFN-γ dans les hiPSC-CM alors que le traitement par le cocktail de cytokines ne modifie pas son expression, contrairement aux hiPSC-EC où le cocktail potentialise l'expression de *P2X7*. Un effet similaire a été observé dans la lignée de cardiomyocytes humains AC16, où le traitement par l'IFN-γ induit une augmentation de *P2X7*, tandis que le cocktail de cytokines ne semble pas modifier son expression de manière notable.

Nos résultats montrent une sensibilité aux cytokines pro-inflammatoires plus importante pour les hiPSC-EC que pour les hiPSC-CM, ce qui se traduit dans les hiPSC-EC par une diminution de la viabilité, une activation des voies pro-apoptotiques et pro-inflammatoires, et une augmentation de l'expression des protéines d'adhésion et de la sécrétion de cytokines. Ces dysfonctionnements endothéliaux sont en accord avec les mécanismes de fragilisation de la barrière endothéliale, d'attraction des cellules immunitaires, et d'infiltration de ces cellules, comme observé avec les LT $CD4^+$/$CD8^+$ et les macrophages dans le cas de la MIM post-ICI (Blum et al., 2024; Johnson et al., 2016; Siddiqui et al., 2024). Ces perturbations endothéliales, où la sécrétion est fortement augmentée, sont également en faveur d'effets indirects sur les cardiomyocytes *via* des signaux pro-fibrotiques ou *via* des peptides modulant leur contractilité. Ces résultats sont en faveur d'un rôle majeur de la cytotoxicité endothéliale qui pourrait jouer un rôle central dans les mécanismes physiopathologiques de la MIM post-ICI.

2.3. Effet du critère de cardiotoxicité

Une concentration élevée de cytokines pro-inflammatoires (CXCL9, CXCL10, IL-1β, CCL5, CCL7 et CCL8) a déjà été rapportée dans le sang périphérique et les biopsies endomyocardiques de patients ayant développé une MIM post-ICI (Blum et al., 2024; Siddiqui et al., 2024; Yu et al., 2024). Un infiltrat immunitaire cardiaque a été caractérisé dans un modèle murin *Ctla4*$^{+/-}$ *Pdcd1*$^{-/-}$, identifiant une sous-population spécifique de macrophages CCR2^{+} exprimant fortement CXCL9 et CXCL10 (Ma et *al.*, 2024). Chez le singe non porteur de cancer, un infiltrat myocardique lymphocytaire et macrophagique, associé à la surexpression de *CCL5*, *CXCL9* et *CXCL10*, a également été retrouvé après traitement par ICI. La liaison de ces cytokines à leurs récepteurs *CCR5* et *CXCR3*, eux aussi surexprimés, pourrait participer à la migration accrue des cellules immunitaires dans le myocarde (Ji et *al.*, 2019). Récemment, dans des biopsies endomyocardiques de patients ayant déclaré une MIM post-ICI, une population similaire de macrophages exprimant fortement CXCL9 et CXCL10 a été retrouvée (Ma et *al.*, 2024). Une autre étude a montré une concentration sérique plus élevée de cytokines pro-inflammatoires après traitement par ICI (CXCL9, CXCL10, IFN-γ, IL-2, IL-18 et TNF-α) chez les patients ayant déclaré une MIM comparé à ceux qui n'en ont pas fait. Les biopsies endomyocardiques de ces patients montrent que CCL5 est fortement exprimé par les différentes populations de LT CD8^{+} cytotoxiques infiltrés dans le tissu cardiaque des patients ayant déclaré une MIM (Blum et *al.*, 2024). Comme mentionné dans la section 2.1., notre étude transcriptomique a révélé une surexpression de différentes cytokines pro-inflammatoires (CXCL9, CXCL10, IL-1β, CCL5, CCL7 et CCL8) après traitement par l'IFN-γ seulement dans les hiPSC-EC du clone Sain et d'un clone issu d'une patiente ICI-M. Nous n'avons pas observé de différence d'expression de ces cytokines en fonction de l'origine du clone.

Par ailleurs, dans notre analyse transcriptomique, la comparaison des gènes dérégulés dans les hiPSC-CM et les hiPSC-EC entre clone Sain et clone d'une patiente ayant déclaré une MIM post-ICI, montre la surexpression de gènes codant pour des protéines impliquées principalement dans le transport vésiculaire (AP1S2 impliqué dans le tri et la formation des vésicules endosomales, ORCL régule la dynamique des endosomes tardifs et WDR44 interagit avec Rab GTPases pour moduler l'exocytose) ce indépendamment du traitement à l'IFN-γ. Dans l'athérosclérose, en réponse au stress et notamment au cours de l'apoptose, les cellules endothéliales peuvent libérer différents types de vésicules extracellulaires qui influencent le développement et la progression de l'athéroscléroses *via* des effets athéroprotecteurs, ou au contraire pro-inflammatoires (Paone et al., 2019). Le fait que les hiPSC-CM et hiPSC-EC issus du clone de la patiente ICI-M montrent, indépendamment du traitement à l'IFN-γ, une surexpression des gènes liés au transport vésiculaire par rapport au clone Sain suggère une susceptibilité à activer des mécanismes pro-inflammatoires dont la sécrétion de vésicules extracellulaire pouvant être impliqués dans le développement de la MIM post-ICI.

Nous avons également retrouvé des modifications spécifiques de chacun des types cellulaires dans notre étude de microarray. Dans les hiPSC-CM issus du clone de la patiente, nous avons observé une augmentation de l'expression de gènes codant pour des composants de la matrice extracellulaire suggérant un remodelage du tissu cardiaque : COL4A5 et COL22A1 codent pour des chaînes de collagène, GDF10 appartient à la famille TGF-β et intervient dans la réparation tissulaire, *ADAMTS9*, *MMP24* et *MMP11* sont des métalloprotéases impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire, *GPC4* module les signaux de croissance, tandis que *THBS4* et *COMP* participent aux interactions cellule-matrice, *SOD3* joue un rôle clé dans la protection contre le stress oxydatif, et *LRRC32* régule l'activation des lymphocytes T régulateurs et la tolérance immunitaire.

Toujours à partir des données de microarray, nous avons observé dans les hiPSC-EC issues du clone de la patiente ICI-M par rapport au clone sain la surexpression de gènes associés à la voie NF-κB et à l'inflammation, illustrée notamment par la surexpression de *TXNIP*, un régulateur de l'inflammasome NLRP3, et de *CASP7*, une caspase effectrice impliquée dans l'apoptose. Cela pourrait refléter un état inflammatoire intrinsèque dans ces cellules, suggérant une modulation différente de la réponse inflammatoire. Par qPCR, nous avons observé que *TXNIP* est significativement surexprimé après traitement par l'IFN-γ uniquement dans les hiPSC-EC du groupe Non-ICI-M, tandis qu'une simple tendance à l'augmentation est observée dans les clones du groupe ICI-M. L'exploration de l'expression de *TXNIP*, par qPCR, après stimulation par l'IFN-γ dans les hiPSC-EC du clone sain permettrait de mieux comprendre si cette modulation atténuée dans les clones ICI-M traduit une altération de la réponse inflammatoire, potentiellement liée à une régulation préexistante de l'inflammasome NLRP3.

L'inflammasome NLRP3 semble être activé de manière très spécifique lors de la MIM post-ICI. En effet, ce résultat a été retrouvé au cours d'une étude transcriptomique qui a comparé des biopsies endomyocardiques de patients ayant déclaré une MIM post-ICI, à des biopsies de patients n'ayant pas déclaré de cardiotoxicité post-ICI, et à des biopsies de patients souffrant d'une cardiomyopathie dilatée ou d'une myocardite virale. Ces travaux ont montré une augmentation des transcrits et des protéines GBP5 et GBP6, régulateurs de l'inflammasome NLRP3, uniquement dans les biopsies de patients ayant déclaré une MIM post-ICI. Ils ont également trouvé une augmentation de l'expression des transcrits *GBP1/2/4* et *TLR3* (Finke et *al.*, 2021). Dans notre étude, les hiPSC-CM et les hiPSC-EC du clone Sain ne montrent pas de modification d'expression de *NLPR3* après le traitement à l'IFN-γ, ni à un cocktail de cytokines inflammatoires, contrairement aux hiPSC-EC issues des clones de patients Non-ICI-M et ICI-M, dans lesquelles on observe une surexpression de NLRP3 après le traitement à l'IFN-γ. Concernant les régulateurs de l'inflammasome NLRP3, on observe une surexpression de *GBP5* et *GBP6* dans les hiPSC-CM et les hiPSC-EC des deux groupes de patients, ainsi que dans le clone Sain, après le traitement à l'IFN-γ. De plus, on observe que les hiPSC-CM du groupe ICI-M surexpriment plus *GBP6* que ceux du groupe Non-ICI-M. Ces résultats, uniquement à l'échelle des transcrits, indiquent néanmoins que les clones que nous avons générés chez les

patients ayant déclaré une MIM post-ICI portent des régulations de la voie de l'inflammasome NLRP3 qui sont par ailleurs retrouvées dans la MIM. Des différences plus marquées entre les groupes pourraient, par exemple, résider au niveau protéique, car la régulation de l'expression protéique ne suit pas forcément de manière linéaire la régulation des transcrits, mais aussi dans la capacité et la rapidité d'assemblage du complexe de l'inflammasome. Il sera important d'explorer ces hypothèses dans les extraits protéiques que j'ai isolés en parallèle des expériences déjà réalisées, avec le protocole de quantification par western-blot de l'activité de la caspase-1. Des immunomarquages des cellules apporteront également des informations sur ce mécanisme.

Nos résultats montrent aussi que les hiPSC-EC des clones Non-ICI-M, provenant de patients qui n'ont pas développé de myocardite post-ICI, présentent une augmentation de l'expression protéique de PD-L1 en réponse à l'IFN-γ. Cette augmentation est absente dans les hiPSC-EC des clones de patients ICI-M, qui ont développé une myocardite post-ICI. Cela démontre une différence clé dans la capacité des hiPSC-EC à réguler la réponse immunitaire entre ces deux groupes. La surexpression de PD-L1 dans les hiPSC-EC du groupe Non-ICI-M pourrait refléter une meilleure capacité à réprimer l'activation des LT limitant l'inflammation, offrant ainsi une protection lors de la MIM post-ICI. À l'inverse, l'absence de régulation de PD-L1 des hiPSC-EC du groupe ICI-M pourrait refléter une activation moins contrôlée des LT, conduisant à une inflammation importante du myocarde, bien que la surexpression de PD-L1 ait été observée dans des biopsies de patients ayant déclaré une MIM post-ICI (Johnson et al., 2016; Zhou et al., 2019). Ces résultats suggèrent une dérégulation des mécanismes post-transcriptionnels ou traductionnels dans les hiPSC-EC du groupe ICI-M, possiblement liée à une altération de la voie JAK-STAT ou à l'expression accrue de régulateurs négatifs tels que SOCS1 ou SOCS3 (Valenzuela, 2023). Ceci souligne l'importance d'investiguer plus en profondeur régulations protéiques dans nos travaux, afin de mieux appréhender la modulation de l'inflammation du myocarde et la susceptibilité propre à la MIM post-ICI.

3. Conclusion

Ces travaux ont permis d'explorer les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la MIM, en mettant en avant l'impact de l'IFN-γ sur les EC et les CM différenciés à partir de clones hiPSC issus de patients ayant déclaré ou non une MIM post-ICI. Nos travaux montrent que ces cellules répondent au traitement par l'IFN-γ au niveau transcriptionnel, notamment par la régulation de gènes liés à la réponse immunitaire et à l'inflammasome NLRP3, *via* les voies JAK-STAT, NOD-like, Toll-like et NF-κB.

Nos résultats apportent un éclairage nouveau sur les mécanismes physiopathologiques de la MIM post-ICI révélant des différences majeures entre les deux types cellulaires.

Plus particulièrement, les hiPSC-EC montrent une sensibilité accrue à l'IFN-γ, et aux cytokines inflammatoires, par rapport aux hiPSC-CM. Cette sensibilité se traduit par une augmentation significative de l'expression des gènes codant pour des protéines d'adhésion et des cytokines pro-inflammatoires, ainsi que par une forte mortalité cellulaire. Cette sensibilité est associée à une activation plus importante que dans les hiPSC-CM des caspases-3 et -7, prédisposant à l'apoptose, comme décrit dans la littérature. A l'inverse, les hiPSC-CM présentent une réponse plus modérée, tant au niveau transcriptionnel qu'en terme de mortalité, suggérant des mécanismes de résistance relative.

L'IFN-γ agit également sur les hiPSC-EC en activant les IRF qui jouent un rôle dans la perméabilité vasculaire, et en surexprimant des protéines d'adhésion impliquées dans l'adhésion et la migration des leucocytes à travers l'endothélium. Ces mécanismes pourraient conduire *in* vivo à une déstabilisation de la barrière endothéliale *via* l'activation de la voie des MAP kinases (p38), désorganiser potentiellement le tissu cardiaque, et augmenter l'infiltration immunitaire décrite comme responsable de la MIM post-ICI.

Nos résultats identifient également une surexpression de gènes spécifiquement dans les hiPSC-EC, par rapport aux hiPSC-CM, après traitement par l'IFN-γ. Parmi ces gènes, on trouve *AIM2*, *GSDMD*, *TXNIP*, et *IL-1B*, qui sont impliqués dans la pyroptose et l'inflammation. D'autres transcrits pro-inflammatoires comme *CCL5*, *CCL7* et *CCL8*, déjà identifiés chez les patients comme associés à la MIM post-ICI, ainsi que des peptides tels qu'*EDN1*, *THBS1* et *BMP4*, capables d'influencer la contraction des CM, ont également été identifiés. Ces observations suggèrent que la dysfonction endothéliale, en exacerbant l'environnement inflammatoire et pro-fibrotique, pourrait aggraver indirectement la toxicité des ICI sur les CM.

Bien que les différences entre les groupes de clones de patients soient parfois modestes, elles permettent d'identifier des modifications spécifiques pour chaque groupe. Par exemple, les hiPSC-EC des patients Non-ICI-M montrent une augmentation de l'expression de PD-L1 au niveau protéique en réponse à l'IFN-γ, absente dans les hiPSC-EC des patients ICI-M. Cette différence souligne un potentiel rôle protecteur de PD-L1 dans la régulation immunitaire. De plus, les hiPSC-EC des patients ICI-M surexpriment *TXNIP*, un régulateur de l'inflammasome NLRP3, et *CASP7*, impliqué dans l'apoptose, renforçant l'hypothèse d'une susceptibilité accrue à l'inflammation et à la mort cellulaire. Enfin, l'augmentation de l'expression de *GBP6*, un régulateur de l'inflammasome NLRP3, dans les hiPSC-CM du groupe ICI-M suggère une modulation spécifique de leur réponse inflammatoire.

L'ensemble des résultats est illustré dans la figure 41.

Ces travaux documentent les différences de comportement cellules endothéliales et des cardiomyocytes baignant dans un environnement inflammatoire. Ils mettent en lumière le rôle central que pourrait jouer la fragilisation de la barrière endothéliale dans l'infiltration immunitaire du tissu cardiaque, et donc dans la physiopathologie de la MIM post-ICI, alors que la majorité des travaux actuellement publiés s'intéressent aux cardiomyocytes. Nos travaux

montrent que des dysfonctions endothéliales pourraient être une cause primaire de la MIM. Ils ouvrent ainsi des perspectives intéressantes pour mieux comprendre les mécanismes spécifiques de cette pathologie et pour envisager des stratégies thérapeutiques ciblant la dysfonction endothéliale afin de prévenir ou limiter les complications cardiaques liées à l'utilisation des ICI. Enfin, plus largement, ils apportent des données essentielles sur les voies de l'immunité et de l'inflammation dans les cellules cardiaques et sur l'utilisation des hiPSC comme modèle d'étude des maladies cardiovasculaires.

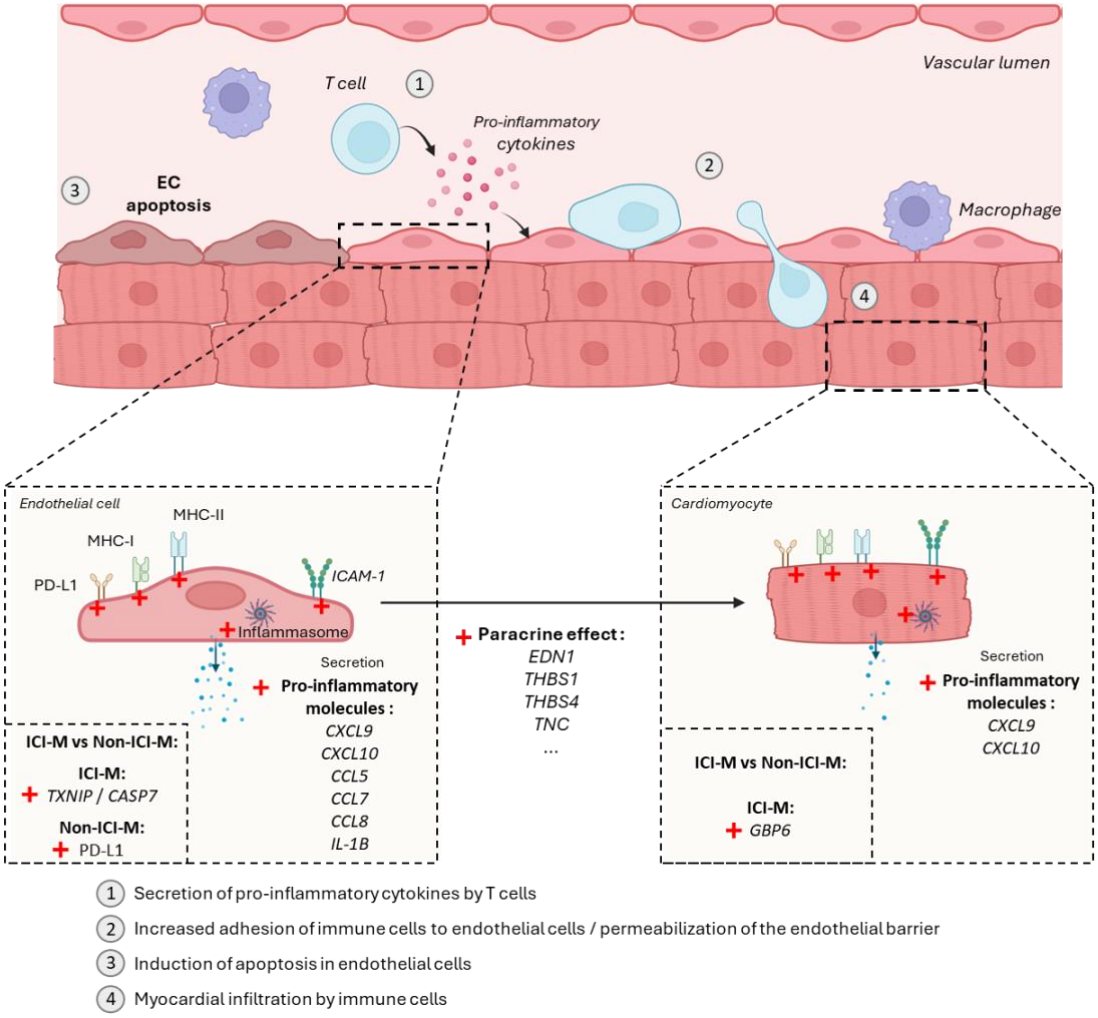


Figure 41 : Schématisation synthétique des résultats obtenus illustrant les réponses des EC et des CM dérivés d'hiPSC à un environnement inflammatoire mimant celui de la MIM post-ICI

En réponse aux cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les LT **(1)** (IFN-γ et/ou IL-1β, IL-2, IL-6, CCL5, TFN-α, GZMB), l'expression des récepteurs (MHC-I, MHC-II, PD-L1) liés à l'inflammation augmente à l'exoface des EC et des CM. Il y a également activation de la transcription des gènes codant pour l'inflammasome, pour des protéines d'adhésion cellulaire (ICAM-1) et pour des cytokines pro-inflammatoires. Les cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les LT ont un effet plus important sur les EC que sur les CM en termes d'expression génique, d'activité des caspases-3 et -7 associées à l'apoptose **(3)** et d'expression des gènes associés à l'adhésion cellulaire **(2)**, ce qui peut favoriser l'infiltration immunitaire du tissu cardiaque **(4)**. La régulation génique est représentée en italique. Les (+) représentent une expression augmentée.

4. Limites et perspectives

L'analyse transcriptomique par microarray, comparant les effets de l'IFN-γ dans les hiPSC-EC et les hiPSC-CM, constitue une première étude à grande échelle dans un contexte de cardiotoxicité post-ICI. Cette analyse a été menée sur un clone Sain et un clone ICI-M, et va être complétée par le séquençage de l'ARN (RNA-seq) des clones hiPSC afin d'être soumise rapidement pour publication. Cette étude va donner des informations sur le potentiel des cellules hiPSC, générées chez un patient ayant déclaré une MIM post-ICI, à servir de modèle dans le cadre de cette cardiotoxicité.

Cependant, compte-tenu de la variabilité portée par les clones hiPSC dont nous avons discuté dans cette thèse, il est nécessaire de travailler sur plusieurs clones hiPSC provenant de différents patients. C'est le travail que je mène depuis le début de ma thèse, long et complexe, mais qui me permet à ce jour de disposer d'au moins 3 clones par groupe (ICI-M *vs* Non-ICI-M), différenciés en hiPSC-CM et hiPSC-EC (3 différenciations indépendantes de chaque type cellulaire), après traitement par l'IFN-γ et sans traitement. Un RNA-seq va être réalisé sur ces échantillons afin de compléter la caractérisation déjà réalisée en qPCR et en cytométrie. Les clones hiPSC seront également analysés par RNA-seq afin de compléter cette étude qui fera ensuite l'objet d'une publication.

Nous avons néanmoins bien conscience qu'il est possible que les caractéristiques génétiques et épigénétiques associées au cancer et/ou à la myocardite chez un patient donné peuvent ne pas être conservées dans les clones hiPSC. Ce sont ces spécificités que nous cherchons à cerner en comparant les clones ICI-M aux clones Non-ICI-M et aux clones Sain. Cette étape va être essentielle pour la suite des études car, contrairement à beaucoup d'autres travaux sur les clones hiPSC, aucune mutation ponctuelle ou signature moléculaire spécifique n'a été identifiée dans la MIM post-ICI. Mais les hiPSC générées dans le cadre de la cardiotoxicité de la doxorubicine ont montré qu'elles récapitulaient la pathologie observée chez les patients (Burridge et al., 2016; Kurokawa et al., 2018). Ces travaux, ajoutés aux résultats que nous avons déjà obtenus sur nos clones, nous confortent dans l'idée que notre modèle est un bon modèle d'étude de la MIM post-ICI. Pour garantir une analyse robuste et identifier des signatures spécifiques dans ce cadre, il est essentiel de disposer d'un nombre suffisant de clones pour chaque groupe. Si nous avons atteint cet objectif pour les deux groupes de patients ICI-M et Non-ICI-M, il nous reste à obtenir au moins deux autres clones de personnes saines pour avoir un vrai groupe contrôle. Cette analyse par RNA-seq nous permettra d'établir des liens entre le profil des clones hiPSC et les tableaux cliniques des donneurs.

Compte-tenu de la difficulté de travailler sur les cellules hiPSC et du caractère chronophage de ce modèle, nous avons dû faire des choix expérimentaux qui nous ont permis de caractériser moléculairement ces clones et ces deux types cellulaires cardiaques, au détriment de la fonction des hiPSC-CM et hiPSC-EC.

Des études complémentaires pour caractériser le couplage excitation/contraction des CM, la perméabilité et la sécrétion des EC, à l'aide de techniques comme le microelectrode array, la microscopie, la cytométrie et les puces ELISA multiplexées seront nécessaires. Ces analyses permettront de consolider les liens entre données transcriptomiques et phénotypes fonctionnels. De plus, dans le cadre de notre approche translationnelle, nous pourront les confronter au contexte clinique des patients donneurs.

Dans ces travaux, nous avons mimé le contexte inflammatoire par l'ajout d'IFN-γ ou de cytokines inflammatoires dans le milieu de culture. Cependant, l'infiltrat de cellules immunitaires est central dans la MIM post-ICI et nous n'avons pas regardé la réponse des cellules cardiaques quand elles sont en présence des PBMC de patients, stimulés par les ICI. Cette étude est en cours mais la difficulté à obtenir des échantillons sanguins de patients, en quantité suffisante pour multiplier les expériences, limite toutefois le nombre d'expériences réalisables. Une des forces du modèle hiPSC réside dans sa capacité à se différencier en divers types cellulaires dont les LT et les macrophages (Jeong et *al.*, 2024; T. Nishimura et *al.*, 2013). Nous pourrons donc utiliser les clones générés chez les patients pour les différencier aussi en cellules immunitaires. D'une part, il est possible que les traits génétiques de la MIM s'exprime aussi dans les cellules immunitaires, et d'autre part, cela nous permettra d'avoir un modèle cellulaire dont toutes les cellules seront issues du même patient afin d'éviter toute réaction immunitaire lié au non soi. Nous pourrons ainsi déterminer si l'activation de NLRP3 dans les cellules immunitaires contribue à la fragilisation de la barrière endothéliale grâce à un modèle de co-culture.

Enfin, ce modèle de culture 2D était l'étape nécessaire avant un passage en culture 3D, dans lequel les fibroblastes cardiaques devront être ajoutés car leur fonction est sans doute primordiale dans les mécanismes physiopathologiques de la MIM post-ICI, comme dans la plupart des maladies cardiovasculaires.

Ainsi, ce modèle hiPSC pourrait devenir une plateforme polyvalente pour approfondir notre compréhension des mécanismes immunitaires et inflammatoires impliqués dans la MIM post-ICI. Il pourrait potentiellement conduire à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et au développement *in cellulo* de traitements moléculaires.

Bibliographie

Al Sayed, Z. R., Pereira, C., Le Borgne, R., Viaris De Lesegno, C., Jouve, C., Pénard, E., Mallet, A., Masurkar, N., Loussouarn, G., Verbavatz, J.-M., Lamaze, C., Trégouët, D.-A., & Hulot, J.-S. (2024). CAVIN1-Mediated hERG Dynamics : A Novel Mechanism Underlying the Interindividual Variability in Drug-Induced Long QT. *Circulation*, *150*(7), 563-576. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.123.063917

Bai, B., Yang, Y., Wang, Q., Li, M., Tian, C., Liu, Y., Aung, L. H. H., Li, P., Yu, T., & Chu, X. (2020). NLRP3 inflammasome in endothelial dysfunction. *Cell Death & Disease*, *11*(9), 776. https://doi.org/10.1038/s41419-020-02985-x

Bers, D. M. (2002). *Cardiac excitation–contraction coupling*. *415*.

Betts, J. G., Young, K. A., Wise, J. A., Johnson, E., Poe, B., Kruse, D. H., Korol, O., Johnson, J. E., Womble, M., & DeSaix, P. (2022). *Anatomy and Physiology 2e*. https://openstax.org/details/books/anatomy-and-physiology-2e

Blum, S. M., Zlotoff, D. A., Smith, N. P., Kernin, I. J., Ramesh, S., Zubiri, L., Caplin, J., Samanta, N., Martin, S., Wang, M., Tirard, A., Song, Y., Xu, K. H., Barth, J., Sen, P., Slowikowski, K., Tantivit, J., Manakongtreecheep, K., Arnold, B. Y., … Villani, A.-C. (2024). Immune responses in checkpoint myocarditis across heart, blood and tumour. *Nature*, *636*(8041), 215-223. https://doi.org/10.1038/s41586-024-08105-5

Boivin, W. A., Cooper, D. M., Hiebert, P. R., & Granville, D. J. (2009). Intracellular versus extracellular granzyme B in immunity and disease : Challenging the dogma. *Laboratory Investigation*, *89*(11), 1195-1220. https://doi.org/10.1038/labinvest.2009.91

Boulgakoff, L., D'Amato, Gaetano, & Miquerol, Lucile. (2024). Molecular Regulation of Cardiac Conduction System Development. *Current Cardiology Reports*.

Buchbinder, E. I., & Desai, A. (2016). CTLA-4 and PD-1 Pathways : Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *American Journal of Clinical Oncology*, *39*(1), 98-106. https://doi.org/10.1097/COC.0000000000000239

Buckingham, M., Meilhac, S., & Zaffran, S. (2005). Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nature Reviews Genetics*, *6*(11), 826-835. https://doi.org/10.1038/nrg1710

Burridge, P. W., Li, Y. F., Matsa, E., Wu, H., Ong, S.-G., Sharma, A., Holmström, A., Chang, A. C., Coronado, M. J., Ebert, A. D., Knowles, J. W., Telli, M. L., Witteles, R. M., Blau, H. M., Bernstein, D., Altman, R. B., & Wu, J. C. (2016). Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes recapitulate the predilection of breast cancer patients to doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nature Medicine*, *22*(5), Article 5. https://doi.org/10.1038/nm.4087

Cadour, F., Cautela, J., Rapacchi, S., Varoquaux, A., Habert, P., Arnaud, F., Jacquier, A., Meilhac, A., Paganelli, F., Lalevée, N., Scemama, U., & Thuny, F. (2022). Cardiac MRI Features and Prognostic Value in Immune Checkpoint Inhibitor-induced Myocarditis. *Radiology*, *303*(3), Article 3. https://doi.org/10.1148/radiol.211765

Camelliti, P., Borg, T., & Kohl, P. (2005). Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovascular Research*, *65*(1), 40-51. https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.08.020

Capon, S. J., Uribe, V., Dominado, N., Ehrlich, O., & Smith, K. A. (2022). *Endocardial identity is established during early somitogenesis by Bmp signalling acting upstream of npas4l and etv2*.
Caporizzo, M. A., Chen, C. Y., & Prosser, B. L. (2019). *Cardiac microtubules in health and heart disease*.

Chang, Y.-J., Holtzman, M. J., & Chen, C.-C. (2002). Interferon-γ-induced Epithelial ICAM-1 Expression and Monocyte Adhesion. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(9), 7118-7126. https://doi.org/10.1074/jbc.M109924200

Chavarría-Smith, J., & Vance, R. E. (2015). The NLRP 1 inflammasomes. *Immunological Reviews*, *265*(1), 22-34. https://doi.org/10.1111/imr.12283

Chen, D. S., & Mellman, I. (2013). Oncology Meets Immunology : The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity*, *39*(1), 1-10. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.012

Chen, G., Chelu, M. G., Dobrev, D., & Li, N. (2018). Cardiomyocyte Inflammasome Signaling in Cardiomyopathies and Atrial Fibrillation : Mechanisms and Potential Therapeutic Implications. *Frontiers in Physiology*, *9*, 1115. https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01115

Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., & Zhao, L. (2018). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, *9*(6), 7204-7218. https://doi.org/10.18632/oncotarget.23208

Chen, Q., Yang, Y., Hou, J., Shu, Q., Yin, Y., Fu, W., Han, F., Hou, T., Zeng, C., Nemeth, E., Linzmeier, R., Ganz, T., & Fang, X. (2019). Increased gene copy number of *DEFA1/DEFA3* worsens sepsis by inducing endothelial pyroptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(8), 3161-3170. https://doi.org/10.1073/pnas.1812947116

Chen, Y., Wang, L., Pitzer, A. L., Li, X., Li, P.-L., & Zhang, Y. (2016). Contribution of redox-dependent activation of endothelial Nlrp3 inflammasomes to hyperglycemia-induced endothelial dysfunction. *Journal of Molecular Medicine*, *94*(12), 1335-1347. https://doi.org/10.1007/s00109-016-1481-5

Chiba, A., Watanabe-Takano, Haruko, Miyazaki, Takahiro, & Mochizuki, Naoki. (2017). *Cardiomyokines from the heart*. https://doi.org/10.1007/s00018-017-2723-6
Chistiakov, D., Orekhov, A., & Bobryshev, Y. (2016). Cardiac Extracellular Vesicles in Normal and Infarcted Heart. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(1), 63. https://doi.org/10.3390/ijms17010063

Colliva, A., Braga, L., Giacca, M., & Zacchigna, S. (2020). Endothelial cell–cardiomyocyte crosstalk in heart development and disease. *The Journal of Physiology*, *598*(14), 2923-2939. https://doi.org/10.1113/JP276758

Cooper, L. T. (2009). Myocarditis. *New England Journal of Medicine*, *360*(15), 1526-1538. https://doi.org/10.1056/NEJMra0800028

Cosper, P. F., Harvey, P. A., & Leinwand, L. A. (2012). Interferon-γ Causes Cardiac Myocyte Atrophy via Selective Degradation of Myosin Heavy Chain in a Model of Chronic Myocarditis. *The American Journal of Pathology*, *181*(6), 2038-2046. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.08.040

Davis, B. K., Roberts, R. A., Huang, M. T., Willingham, S. B., Conti, B. J., Brickey, W. J., Barker, B. R., Kwan, M., Taxman, D. J., Accavitti-Loper, M.-A., Duncan, J. A., & Ting, J. P.-Y. (2011). Cutting Edge : NLRC5-Dependent Activation of the Inflammasome. *The Journal of Immunology*, *186*(3), 1333-1337. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003111

De Boer, R. A., Hulot, J., Tocchetti, C. G., Aboumsallem, J. P., Ameri, P., Anker, S. D., Bauersachs, J., Bertero, E., Coats, A. J. S., Čelutkienė, J., Chioncel, O., Dodion, P., Eschenhagen, T., Farmakis, D., Bayes-Genis, A., Jäger, D., Jankowska, E. A., Kitsis, R. N., Konety, S. H., … Backs, J. (2020). Common mechanistic pathways in cancer and heart failure. A scientific roadmap on behalf of the TRANSLATIONAL RESEARCH COMMITTEE of the HEART FAILURE ASSOCIATION (HFA) of the EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY (ESC). *European Journal of Heart Failure*, *22*(12), 2272-2289. https://doi.org/10.1002/ejhf.2029

Didié, M., Galla, S., Muppala, V., Dressel, R., & Zimmermann, W.-H. (2017). Immunological Properties of Murine Parthenogenetic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes and Engineered Heart Muscle. *Frontiers in Immunology*, *8*, 955. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00955

Du, L., Wang, X., Chen, S., & Guo, X. (2022). The AIM2 inflammasome : A novel biomarker and target in cardiovascular disease. *Pharmacological Research*, *186*, 106533. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106533

Duncan, J. A., & Canna, S. W. (2018). The NLRC 4 Inflammasome. *Immunological Reviews*, *281*(1), 115-123. https://doi.org/10.1111/imr.12607

Eppihimer, M. J., Gunn, J., Freeman, G. J., Chernova, T., Erickson, J., & Leonard, J. P. (2013). *Expression and Regulation of the PD-L1 Immunoinhibitory Molecule on Microvascular Endothelial Cells*.

Farkona, S., Diamandis, E. P., & Blasutig, I. M. (2016). Cancer immunotherapy : The beginning of the end of cancer? *BMC Medicine*, *14*(1), 73. https://doi.org/10.1186/s12916-016-0623-5

Farmakis, D., Papingiotis, G., & Filippatos, G. (2023). Genetic Predisposition to Cardiovascular Disease in Patients With Cancer. *JACC: CardioOncology*, *5*(3), 402-405. https://doi.org/10.1016/j.jaccao.2022.12.008

Finke, D., Heckmann, M. B., Salatzki, J., Riffel, J., Herpel, E., Heinzerling, L. M., Meder, B., Völkers, M., Müller, O. J., Frey, N., Katus, H. A., Leuschner, F., Kaya, Z., & Lehmann, L. H. (2021). Comparative Transcriptomics of Immune Checkpoint Inhibitor Myocarditis Identifies Guanylate Binding Protein 5 and 6 Dysregulation. *Cancers*, *13*(10), Article 10. https://doi.org/10.3390/cancers13102498

Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L. J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M. C., Horton, H. F., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M. R., Carreno, B. M., Collins, M., Wood, C. R., & Honjo, T. (2000). Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *The Journal of Experimental Medicine*, *192*(7), 1027-1034. https://doi.org/10.1084/jem.192.7.1027

Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., & Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, *85*(8), 348-362. https://doi.org/10.2183/pjab.85.348

Fuster, J. J., MacLauchlan, S., Zuriaga, M. A., Polackal, M. N., Ostriker, A. C., Chakraborty, R., Wu, C.-L., Sano, S., Muralidharan, S., Rius, C., Vuong, J., Jacob, S., Muralidhar, V., Robertson, A. A. B., Cooper, M. A., Andrés, V., Hirschi, K. K., Martin, K. A., & Walsh, K. (2017). Clonal hematopoiesis associated with TET2 deficiency accelerates atherosclerosis development in mice. *Science*, *355*(6327), 842-847. https://doi.org/10.1126/science.aag1381

Gaffen, S., & Liu, K. (2004). Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. *Cytokine*, *28*(3), 109-123. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2004.06.010

Garcia-Diaz, A., Shin, D. S., Moreno, B. H., Saco, J., Escuin-Ordinas, H., Rodriguez, G. A., Zaretsky, J. M., Sun, L., Hugo, W., Wang, X., Parisi, G., Saus, C. P., Torrejon, D. Y., Graeber, T. G., Comin-Anduix, B., Hu-Lieskovan, S., Damoiseaux, R., Lo, R. S., & Ribas, A. (2017). Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Reports*, *19*(6), 1189-1201. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.031

Garcia-Pavia, P., Kim, Y., Restrepo-Cordoba, M. A., Lunde, I. G., Wakimoto, H., Smith, A. M., Toepfer, C. N., Getz, K., Gorham, J., Patel, P., Ito, K., Willcox, J. A., Arany, Z., Li, J., Owens, A. T., Govind, R., Nuñez, B., Mazaika, E., Bayes-Genis, A., … Seidman, C. E. (2019). Genetic Variants Associated With Cancer Therapy–Induced Cardiomyopathy. *Circulation*, *140*(1), 31-41. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.037934

Ge, X., Li, W., Huang, S., Yin, Z., Xu, X., Chen, F., Kong, X., Wang, H., Zhang, J., & Lei, P. (2018). The pathological role of NLRs and AIM2 inflammasome-mediated pyroptosis in damaged blood-brain barrier after traumatic brain injury. *Brain Research*, *1697*, 10-20. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.06.008

Gore, A., Li, Z., Fung, H.-L., Young, J. E., Agarwal, S., Antosiewicz-Bourget, J., Canto, I., Giorgetti, A., Israel, M. A., Kiskinis, E., Lee, J.-H., Loh, Y.-H., Manos, P. D., Montserrat, N., Panopoulos, A. D., Ruiz, S., Wilbert, M. L., Yu, J., Kirkness, E. F., … Zhang, K. (2011). Somatic coding mutations

in human induced pluripotent stem cells. *Nature*, *471*(7336), 63-67. https://doi.org/10.1038/nature09805

Grabie, N., Lichtman, A. H., & Padera, R. (2019). T cell checkpoint regulators in the heart. *Cardiovascular Research*, *115*(5), 869-877. https://doi.org/10.1093/cvr/cvz025

Grinnemo, K.-H., Löfling, M., Nathanson, L., Baumgartner, R., Ketelhuth, D. F. J., Beljanski, V., Davies, L. C., & Österholm, C. (2019). Immunomodulatory effects of interferon-γ on human fetal cardiac mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Research & Therapy*, *10*(1), 371. https://doi.org/10.1186/s13287-019-1489-1

Gu, M., Shao, N.-Y., Sa, S., Li, D., Termglinchan, V., Ameen, M., Karakikes, I., Sosa, G., Grubert, F., Lee, J., Cao, A., Taylor, S., Ma, Y., Zhao, Z., Chappell, J., Hamid, R., Austin, E. D., Gold, J. D., Wu, J. C., … Rabinovitch, M. (2017). Patient-Specific iPSC-Derived Endothelial Cells Uncover Pathways that Protect against Pulmonary Hypertension in BMPR2 Mutation Carriers. *Cell Stem Cell*, *20*(4), 490-504.e5. https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.08.019

Guo, Q., Jin, Y., Chen, X., Ye, X., Shen, X., Lin, M., Zeng, C., Zhou, T., & Zhang, J. (2024). NF-κB in biology and targeted therapy : New insights and translational implications. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *9*(1), 53. https://doi.org/10.1038/s41392-024-01757-9

Hu, J.-R., Florido, R., Lipson, E. J., Naidoo, J., Ardehali, R., Tocchetti, C. G., Lyon, A. R., Padera, R. F., Johnson, D. B., & Moslehi, J. (2019). Cardiovascular toxicities associated with immune checkpoint inhibitors. *Cardiovascular Research*, *115*(5), 854-868. https://doi.org/10.1093/cvr/cvz026

Hu, X., Li, J., Fu, M., Zhao, X., & Wang, W. (2021). The JAK/STAT signaling pathway : From bench to clinic. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *6*(1), 402. https://doi.org/10.1038/s41392-021-00791-1

Jeong, S., Chang, H., & Hong, S.-H. (2024). Protocol for differentiation of functional macrophages from human induced pluripotent stem cells. *STAR Protocols*, *5*(1), 102925. https://doi.org/10.1016/j.xpro.2024.102925

Jeziorowska, D., Korniat, A., Salem, J.-E., Fish, K., & Hulot, J.-S. (2015). Generating patient-specific induced pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes for the treatment of cardiac diseases. *Expert Opinion on Biological Therapy*, *15*(10), 1399-1409. https://doi.org/10.1517/14712598.2015.1064109

Ji, C., Roy, M. D., Golas, J., Vitsky, A., Ram, S., Kumpf, S. W., Martin, M., Barletta, F., Meier, W. A., Hooper, A. T., Sapra, P., Khan, N. K., Finkelstein, M., Guffroy, M., & Buetow, B. S. (2019). Myocarditis in Cynomolgus Monkeys Following Treatment with Immune Checkpoint Inhibitors. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *25*(15), Article 15. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-4083

Jiang, C., Jiang, L., Li, Q., Liu, X., Zhang, T., Dong, L., Liu, T., Liu, L., Hu, G., Sun, X., & Jiang, L. (2018). Acrolein induces NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis and suppresses

migration via ROS-dependent autophagy in vascular endothelial cells. *Toxicology*, *410*, 26-40. https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.09.002

Johnson, D. B., Balko, J. M., Compton, M. L., Chalkias, S., Gorham, J., Xu, Y., Hicks, M., Puzanov, I., Alexander, M. R., Bloomer, T. L., Becker, J. R., Slosky, D. A., Phillips, E. J., Pilkinton, M. A., Craig-Owens, L., Kola, N., Plautz, G., Reshef, D. S., Deutsch, J. S., … Moslehi, J. J. (2016). Fulminant Myocarditis with Combination Immune Checkpoint Blockade. *New England Journal of Medicine*, *375*(18), 1749-1755. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1609214

Kalliolias, G. D., & Ivashkiv, L. B. (2016). TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nature Reviews Rheumatology*, *12*(1), 49-62. https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.169

Kamo, T., Akazawa, H., & Komuro, I. (2015). Cardiac Nonmyocytes in the Hub of Cardiac Hypertrophy. *Circulation Research*, *117*(1), 89-98. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.305349

Katkenov, N., Mukhatayev, Z., Kozhakhmetov, S., Sailybayeva, A., Bekbossynova, M., & Kushugulova, A. (2024). Systematic Review on the Role of IL-6 and IL-1β in Cardiovascular Diseases. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*, *11*(7), 206. https://doi.org/10.3390/jcdd11070206

Keam, S., Turner, N., Kugeratski, F. G., Rico, R., Colunga-Minutti, J., Poojary, R., Alekseev, S., Patel, A. B., Li, Y. J., Sheshadri, A., Loghin, M. E., Woodman, K., Aaroe, A. E., Hamidi, S., Iyer, P. C., Palaskas, N. L., Wang, Y., & Nurieva, R. (2024). Toxicity in the era of immune checkpoint inhibitor therapy. *Frontiers in Immunology*, *15*, 1447021. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1447021

Kelley, N., Jeltema, D., Duan, Y., & He, Y. (2019). The NLRP3 Inflammasome : An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(13), 3328. https://doi.org/10.3390/ijms20133328

Kilpinen, H., Goncalves, A., Leha, A., Afzal, V., Alasoo, K., Ashford, S., Bala, S., Bensaddek, D., Casale, F. P., Culley, O. J., Danecek, P., Faulconbridge, A., Harrison, P. W., Kathuria, A., McCarthy, D., McCarthy, S. A., Meleckyte, R., Memari, Y., Moens, N., … Gaffney, D. J. (2017). Common genetic variation drives molecular heterogeneity in human iPSCs. *Nature*, *546*(7658), 370-375. https://doi.org/10.1038/nature22403

Kim, B.-H., Chee, J. D., Bradfield, C. J., Park, E.-S., Kumar, P., & MacMicking, J. D. (2016). Interferon-induced guanylate-binding proteins in inflammasome activation and host defense. *Nature Immunology*, *17*(5), 481-489. https://doi.org/10.1038/ni.3440

Kim, S. K., & Cho, S. W. (2022). The Evasion Mechanisms of Cancer Immunity and Drug Intervention in the Tumor Microenvironment. *Frontiers in Pharmacology*, *13*, 868695. https://doi.org/10.3389/fphar.2022.868695

Kopczyńska, E., & Makarewicz, R. (2012). Endoglin – a marker of vascular endothelial cell

proliferation in cancer. *Współczesna Onkologia*, *1*, 68-71. https://doi.org/10.5114/wo.2012.27340

Krishnaswamy, G., Smith, J. K., Mukkamala, R., Hall, K., Joyner, W., L, Y., & Chi, D. S. (1998). Multifunctional Cytokine Expression by Human Coronary Endothelium and Regulation by Monokines and Glucocorticoids. *Microvascular Research*, *55*(3), 189-200. https://doi.org/10.1006/mvre.1998.2079

Krüger-Genge, A., Blocki, A., Franke, R.-P., & Jung, F. (2019). Vascular Endothelial Cell Biology : An Update. *Int. J. Mol. Sci.*

Kücük, P., Abbey, L., Schmitt, J., Henninger, C., & Fritz, G. (2024). Cardiomyocytes, cardiac endothelial cells and fibroblasts contribute to anthracycline-induced cardiac injury through RAS-homologous small GTPases RAC1 and CDC42. *Pharmacological Research*, *203*, 107165. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2024.107165

Kumar, A. A., Kumar, G. S. A., Satheesh, G., Surendran, A., Chandran, M., Kartha, C. C., & Jaleel, A. (2021). *Proteomics Analysis Reveals Diverse Molecular Characteristics between Endocardial and Aortic-Valvular Endothelium*.

Kurokawa, Y. K., Shang, M. R., Yin, R. T., & George, S. C. (2018). Modeling trastuzumab-related cardiotoxicity in vitro using human stem cell-derived cardiomyocytes. *Toxicology Letters*, *285*, 74-80. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.01.001

Lawler, S. E., Speranza, M.-C., Cho, C.-F., & Chiocca, E. A. (2017). Oncolytic Viruses in Cancer Treatment : A Review. *JAMA Oncology*, *3*(6), 841. https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.2064

Lees, J. R. (2015). Interferon gamma in autoimmunity : A complicated player on a complex stage. *Cytokine*, *74*(1), 18-26. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.10.014

Leucker, T. M., & Jones, S. P. (2014). Endothelial dysfunction as a nexus for endothelial cell-cardiomyocyte miscommunication. *Frontiers in Physiology*, *5*. https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00328

Levy, M., Shapiro, H., Thaiss, C. A., & Elinav, E. (2017). NLRP6 : A Multifaceted Innate Immune Sensor. *Trends in Immunology*, *38*(4), 248-260. https://doi.org/10.1016/j.it.2017.01.001

Litviňuková, M., Talavera-López, C., Maatz, H., Reichart, D., Worth, C. L., Lindberg, E. L., Kanda, M., Polanski, K., Heinig, M., Lee, M., Nadelmann, E. R., Roberts, K., Tuck, L., Fasouli, E. S., DeLaughter, D. M., McDonough, B., Wakimoto, H., Gorham, J. M., Samari, S., … Teichmann, S. A. (2020). Cells of the adult human heart. *Nature*, *588*(7838), 466-472. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2797-4

Liu, C., Yao, Q., Hu, T., Cai, Z., Xie, Q., Zhao, J., Yuan, Y., Ni, J., & Wu, Q. Q. (2022). Cathepsin B deteriorates diabetic cardiomyopathy induced by streptozotocin via promoting NLRP3-mediated pyroptosis. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, *30*, 198-207.

https://doi.org/10.1016/j.omtn.2022.09.019

Liu, Y., Lian, K., Zhang, L., Wang, R., Yi, F., Gao, C., Xin, C., Zhu, D., Li, Y., Yan, W., Xiong, L., Gao, E., Wang, H., & Tao, L. (2014). TXNIP mediates NLRP3 inflammasome activation in cardiac microvascular endothelial cells as a novel mechanism in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Basic Research in Cardiology*, *109*(5), 415. https://doi.org/10.1007/s00395-014-0415-z

Liu, Y., & Yang, C. (2021). Oncometabolites in Cancer : Current Understanding and Challenges. *Cancer Research*, *81*(11), 2820-2823. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-3730

Lucas, J. A., Menke, J., Rabacal, W. A., Schoen, F. J., Sharpe, A. H., & Kelley, V. R. (2008). Programmed Death Ligand 1 Regulates a Critical Checkpoint for Autoimmune Myocarditis and Pneumonitis in MRL Mice. *The Journal of Immunology*, *181*(4), Article 4. https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.4.2513

Lugrin, J., & Martinon, F. (2018). The AIM 2 inflammasome : Sensor of pathogens and cellular perturbations. *Immunological Reviews*, *281*(1), 99-114. https://doi.org/10.1111/imr.12618

Lyon, A. R., López-Fernández, T., Couch, L. S., Asteggiano, R., Aznar, M. C., Bergler-Klein, J., Boriani, G., Cardinale, D., Cordoba, R., Cosyns, B., Cutter, D. J., De Azambuja, E., De Boer, R. A., Dent, S. F., Farmakis, D., Gevaert, S. A., Gorog, D. A., Herrmann, J., Lenihan, D., … Touyz, R. M. (2022). 2022 ESC Guidelines on cardio-oncology developed in collaboration with the European Hematology Association (EHA), the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology (ESTRO) and the International Cardio-Oncology Society (IC-OS). *European Heart Journal*, *43*(41), 4229-4361. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehac244

Lyra-Leite, D. M., Gutiérrez-Gutiérrez, Ó., Wang, M., Zhou, Y., Cyganek, L., & Burridge, P. W. (2022). A review of protocols for human iPSC culture, cardiac differentiation, subtype-specification, maturation, and direct reprogramming. *STAR Protocols*, *3*(3), 101560. https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101560

Ma, P., Liu, J., Qin, J., Lai, L., Heo, G. S., Luehmann, H., Sultan, D., Bredemeyer, A., Bajapa, G., Feng, G., Jimenez, J., He, R., Parks, A., Amrute, J., Villanueva, A., Liu, Y., Lin, C.-Y., Mack, M., Amancherla, K., … Lavine, K. J. (2024). Expansion of Pathogenic Cardiac Macrophages in Immune Checkpoint Inhibitor Myocarditis. *Circulation*, *149*(1), 48-66. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.122.062551

Mai, J., Virtue, A., Shen, J., Wang, H., & Yang, X.-F. (2013). An evolving new paradigm : Endothelial cells – conditional innate immune cells. *Journal of Hematology & Oncology*, *6*(1), 61. https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-61

Manring, H. R., Dorn, Lisa E, Ex-Willey, Aidan, Accornero, Federica, & Ackermann, Maegen A. (2018). At the heart of inter- and intracellular signaling : The intercalated disc. *Biophys Rev*.

Mark Johnson & Daniel Keyes. (2024, janvier 9). *Anthracycline Toxicity*. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK599501/#_ncbi_dlg_citbx_NBK599501

Markousis-Mavrogenis, G., Baumhove, L., Al-Mubarak, A. A., Aboumsallem, J. P., Bomer, N., Voors, A. A., & Van Der Meer, P. (2024). Immunomodulation and immunopharmacology in heart failure. *Nature Reviews Cardiology*, *21*(2), 119-149. https://doi.org/10.1038/s41569-023-00919-6

Meilhac, S. M., & Buckingham, M. E. (2018). The deployment of cell lineages that form the mammalian heart. *Nature Reviews Cardiology*, *15*(11), 705-724. https://doi.org/10.1038/s41569-018-0086-9

Menon, S., Shailendra, S., Renda, A., Longaker, M., & Quarto, N. (2016). An Overview of Direct Somatic Reprogramming : The Ins and Outs of iPSCs. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(1), 141. https://doi.org/10.3390/ijms17010141

Metzemaekers, M., Vanheule, V., Janssens, R., Struyf, S., & Proost, P. (2018). Overview of the Mechanisms that May Contribute to the Non-Redundant Activities of Interferon-Inducible CXC Chemokine Receptor 3 Ligands. *Frontiers in Immunology*, *8*, 1970. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01970

Mezzaroma, E., Abbate, A., & Toldo, S. (2021). NLRP3 Inflammasome Inhibitors in Cardiovascular Diseases. *Molecules*, *26*(4), 976. https://doi.org/10.3390/molecules26040976

Mezzaroma, E., Toldo, S., Farkas, D., Seropian, I. M., Van Tassell, B. W., Salloum, F. N., Kannan, H. R., Menna, A. C., Voelkel, N. F., & Abbate, A. (2011). The inflammasome promotes adverse cardiac remodeling following acute myocardial infarction in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(49), 19725-19730. https://doi.org/10.1073/pnas.1108586108

Michel, L., Helfrich, I., Hendgen-Cotta, U. B., Mincu, R.-I., Korste, S., Mrotzek, S. M., Spomer, A., Odersky, A., Rischpler, C., Herrmann, K., Umutlu, L., Coman, C., Ahrends, R., Sickmann, A., Löffek, S., Livingstone, E., Ugurel, S., Zimmer, L., Gunzer, M., … Rassaf, T. (2022). Targeting early stages of cardiotoxicity from anti-PD1 immune checkpoint inhibitor therapy. *European Heart Journal*, *43*(4), Article 4. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab430

Munir, A. Z., Gutierrez, A., Qin, J., Lichtman, A. H., & Moslehi, J. J. (2024). Immune-checkpoint inhibitor-mediated myocarditis : CTLA4, PD1 and LAG3 in the heart. *Nature Reviews Cancer*, *24*(8), 540-553. https://doi.org/10.1038/s41568-024-00715-5

Musunuru, K., Sheikh, F., Gupta, R. M., Houser, S. R., Maher, K. O., Milan, D. J., Terzic, A., & Wu, J. C. (2018). Induced Pluripotent Stem Cells for Cardiovascular Disease Modeling and Precision Medicine : A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation: Genomic and Precision Medicine*, *11*(1). https://doi.org/10.1161/HCG.0000000000000043

Ng, C. T., Fong, L. Y., Sulaiman, M. R., Moklas, M. A. M., Yong, Y. K., Hakim, M. N., & Ahmad, Z. (2015). Interferon-Gamma Increases Endothelial Permeability by Causing Activation of p38 MAP Kinase and Actin Cytoskeleton Alteration. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, *35*(7), 513-522. https://doi.org/10.1089/jir.2014.0188

Nishimura, H., Okazaki, T., Tanaka, Y., Nakatani, K., Hara, M., Matsumori, A., Sasayama, S., Mizoguchi, A., Hiai, H., Minato, N., & Honjo, T. (2001). Autoimmune Dilated Cardiomyopathy in PD-1 Receptor-Deficient Mice. *Science*, *291*(5502), Article 5502. https://doi.org/10.1126/science.291.5502.319

Nishimura, T., Kaneko, S., Kawana-Tachikawa, A., Tajima, Y., Goto, H., Zhu, D., Nakayama-Hosoya, K., Iriguchi, S., Uemura, Y., Shimizu, T., Takayama, N., Yamada, D., Nishimura, K., Ohtaka, M., Watanabe, N., Takahashi, S., Iwamoto, A., Koseki, H., Nakanishi, M., … Nakauchi, H. (2013). Generation of Rejuvenated Antigen-Specific T Cells by Reprogramming to Pluripotency and Redifferentiation. *Cell Stem Cell*, *12*(1), 114-126. https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.11.002

Noutsias, M., Seeberg, B., Schultheiss, H.-P., & Kühl, U. (1999). Expression of Cell Adhesion Molecules in Dilated Cardiomyopathy : Evidence for Endothelial Activation in Inflammatory Cardiomyopathy. *Circulation*, *99*(16), 2124-2131. https://doi.org/10.1161/01.CIR.99.16.2124

O'Riordan, C. E., Purvis, G. S. D., Collotta, D., Chiazza, F., Wissuwa, B., Al Zoubi, S., Stiehler, L., Martin, L., Coldewey, S. M., Collino, M., & Thiemermann, C. (2019). Bruton's Tyrosine Kinase Inhibition Attenuates the Cardiac Dysfunction Caused by Cecal Ligation and Puncture in Mice. *Frontiers in Immunology*, *10*, 2129. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02129

Paone, S., Baxter, A. A., Hulett, M. D., & Poon, I. K. H. (2019). Endothelial cell apoptosis and the role of endothelial cell-derived extracellular vesicles in the progression of atherosclerosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *76*(6), 1093-1106. https://doi.org/10.1007/s00018-018-2983-9

Patsch, C., Challet-Meylan, L., Thoma, E. C., Urich, E., Heckel, T., O'Sullivan, J. F., Grainger, S. J., Kapp, F. G., Sun, L., Christensen, K., Xia, Y., Florido, M. H. C., He, W., Pan, W., Prummer, M., Warren, C. R., Jakob-Roetne, R., Certa, U., Jagasia, R., … Cowan, C. A. (2015). Generation of vascular endothelial and smooth muscle cells from human pluripotent stem cells. *Nature Cell Biology*, *17*(8), 994-1003. https://doi.org/10.1038/ncb3205

Perez-Shibayama, C., Gil-Cruz, C., & Ludewig, B. (2022). Fibroblasts tune myocardial inflammation and remodeling. *Nature Cardiovascular Research*, *1*(8), 694-695. https://doi.org/10.1038/s44161-022-00119-4

Perrone, M. A., Aimo, A., Bernardini, S., & Clerico, A. (2023). Inflammageing and Cardiovascular System : Focus on Cardiokines and Cardiac-Specific Biomarkers. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(1), 844. https://doi.org/10.3390/ijms24010844

Pinheiro, E. A., Fetterman, K. A., & Burridge, P. W. (2019). hiPSCs in cardio-oncology : Deciphering the genomics. *Cardiovascular Research*, *115*(5), 935-948. https://doi.org/10.1093/cvr/cvz018

Quagliariello, V., Passariello, M., Coppola, C., Rea, D., Barbieri, A., Scherillo, M., Monti, M. G., Iaffaioli, R. V., De Laurentiis, M., Ascierto, P. A., Botti, G., De Lorenzo, C., & Maurea, N. (2019). Cardiotoxicity and pro-inflammatory effects of the immune checkpoint inhibitor Pembrolizumab associated to Trastuzumab. *International Journal of Cardiology*, *292*, 171-179. https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2019.05.028

Quagliariello, V., Passariello, M., Rea, D., Barbieri, A., Iovine, M., Bonelli, A., Caronna, A., Botti, G., De Lorenzo, C., & Maurea, N. (2020). Evidences of CTLA-4 and PD-1 Blocking Agents-Induced Cardiotoxicity in Cellular and Preclinical Models. *Journal of Personalized Medicine*, *10*(4), 179. https://doi.org/10.3390/jpm10040179

Ramachandran, R., Manan, A., Kim, J., & Choi, S. (2024). NLRP3 inflammasome : A key player in the pathogenesis of life-style disorders. *Experimental & Molecular Medicine*. https://doi.org/10.1038/s12276-024-01261-8

Rashid, M. I., Ito, T., Miya, F., Shimojo, D., Arimoto, K., Onodera, K., Okada, R., Nagashima, T., Yamamoto, K., Khatun, Z., Shimul, R. I., Niwa, J., Katsuno, M., Sobue, G., Okano, H., Sakurai, H., Shimizu, K., Doyu, M., & Okada, Y. (2023). Simple and efficient differentiation of human iPSCs into contractible skeletal muscles for muscular disease modeling. *Scientific Reports*, *13*(1), 8146. https://doi.org/10.1038/s41598-023-34445-9

Rochais, F., Kelly, R. G., & Zaffran, S. (2019). Développement et régénération cardiaque. In *Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux* (3e édition, p. 3-12). John Libbey Eurotext.

Rodig, N., Ryan, T., Allen, J. A., Pang, H., Grabie, N., Chernova, T., Greenfield, E. A., Liang, S. C., Sharpe, A. H., Lichtman, A. H., & Freeman, G. J. (2003). Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates $CD8^+$ T cell activation and cytolysis. *European Journal of Immunology*, *33*(11), 3117-3126. https://doi.org/10.1002/eji.200324270

Rosenberg, S. A., & Restifo, N. P. (2015). Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science*, *348*(6230), 62-68. https://doi.org/10.1126/science.aaa4967

Sano, S., Oshima, K., Wang, Y., MacLauchlan, S., Katanasaka, Y., Sano, M., Zuriaga, M. A., Yoshiyama, M., Goukassian, D., Cooper, M. A., Fuster, J. J., & Walsh, K. (2018). Tet2-Mediated Clonal Hematopoiesis Accelerates Heart Failure Through a Mechanism Involving the IL-1β/NLRP3 Inflammasome. *Journal of the American College of Cardiology*, *71*(8), 875-886. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.12.037

Scarabelli, T., Stephanou, A., Rayment, N., Pasini, E., Comini, L., Curello, S., Ferrari, R., Knight, R., & Latchman, D. (2001). Apoptosis of Endothelial Cells Precedes Myocyte Cell Apoptosis in Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation*, *104*(3), 253-256. https://doi.org/10.1161/01.CIR.104.3.253

Schlaeger, T. M., Daheron, L., Brickler, T. R., Entwisle, S., Chan, K., Cianci, A., DeVine, A., Ettenger, A., Fitzgerald, K., Godfrey, M., Gupta, D., McPherson, J., Malwadkar, P., Gupta, M., Bell, B., Doi, A., Jung, N., Li, X., Lynes, M. S., … Daley, G. Q. (2015). A comparison of non-integrating reprogramming methods. *Nature Biotechnology*, *33*(1), 58-63. https://doi.org/10.1038/nbt.3070

Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., & Hume, D. A. (2004). Interferon-γ : An overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology*, *75*(2), 163-189. https://doi.org/10.1189/jlb.0603252

Schroder, K., & Tschopp, J. (2010). The Inflammasomes. *Cell*, *140*(6), 821-832. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.040

Segers, V. F. M., Brutsaert, D. L., & De Keulenaer, G. W. (2018). Cardiac Remodeling : Endothelial Cells Have More to Say Than Just NO. *Frontiers in Physiology*, *9*, 382. https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00382

Seko, Y., Tsuchimochi, H., Nakamura, T., Okumura, K., Naito, S., Imataka, K., Fujii, J., Takaku, F., & Yazaki, Y. (1990). Expression of major histocompatibility complex class I antigen in murine ventricular myocytes infected with Coxsackievirus B3. *Circulation Research*, *67*(2), 360-367. https://doi.org/10.1161/01.RES.67.2.360

Shead, K. D., Huethorst, E., Burton, F., Lang, N. N., Myles, R. C., & Smith, G. L. (2024). Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes for Preclinical Cardiotoxicity Screening in Cardio-Oncology. *JACC: CardioOncology*, *6*(5), 678-683. https://doi.org/10.1016/j.jaccao.2024.07.012

Shenoy, A. R., Wellington, D. A., Kumar, P., Kassa, H., Booth, C. J., Cresswell, P., & MacMicking, J. D. (2012). GBP5 Promotes NLRP3 Inflammasome Assembly and Immunity in Mammals. *Science*, *336*(6080), 481-485. https://doi.org/10.1126/science.1217141

Siddiqui, B. A., Palaskas, N. L., Basu, S., Dai, Y., He, Z., Yadav, S. S., Allison, J. P., Sheth, R. A., Tummala, S., Buja, M., Bhattacharjee, M. B., Iliescu, C., Rawther-Karedath, A., Deswal, A., Wang, L., Sharma, P., & Subudhi, S. K. (2024). Molecular Pathways and Cellular Subsets Associated with Adverse Clinical Outcomes in Overlapping Immune-Related Myocarditis and Myositis. *Cancer Immunology Research*, *12*(8), 964-987. https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-24-0011

Später, D., Hansson, E. M., Zangi, L., & Chien, K. R. (2014). How to make a cardiomyocyte. *Development*, *141*(23), 4418-4431. https://doi.org/10.1242/dev.091538

Spetz, J. K. E., Florido, M. H. C., Fraser, C. S., Qin, X., Choiniere, J., Yu, S. J., Singh, R., Friesen, M., Rubin, L. L., Salem, J.-E., Moslehi, J. J., & Sarosiek, K. A. (2022). Heightened apoptotic priming of vascular cells across tissues and life span predisposes them to cancer therapy–induced toxicities. *Science Advances*, *8*(45), eabn6579. https://doi.org/10.1126/sciadv.abn6579

Stratton, M. R., Campbell, P. J., & Futreal, P. A. (2009). The cancer genome. *Nature*, *458*(7239), 719-724. https://doi.org/10.1038/nature07943

Sun, N., Yazawa, M., Liu, J., Han, L., Sanchez-Freire, V., Abilez, O. J., Navarrete, E. G., Hu, S., Wang, L., Lee, A., Pavlovic, A., Lin, S., Chen, R., Hajjar, R. J., Snyder, M. P., Dolmetsch, R. E., Butte, M. J., Ashley, E. A., Longaker, M. T., … Wu, J. C. (2012). Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells as a Model for Familial Dilated Cardiomyopathy. *Science Translational Medicine*, *4*(130). https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003552

Sun, S.-J., Jiao, X.-D., Chen, Z.-G., Cao, Q., Zhu, J.-H., Shen, Q.-R., Liu, Y., Zhang, Z., Xu, F.-F., Shi, Y., Tong, J., Ouyang, S.-X., Fu, J.-T., Zhao, Y., Ren, J., Li, D.-J., Shen, F.-M., & Wang, P. (2024). Gasdermin-E-mediated pyroptosis drives immune checkpoint inhibitor-associated myocarditis via cGAS-STING activation. *Nature Communications*, *15*(1), 6640. https://doi.org/10.1038/s41467-024-50996-5

Suresh, A., Martens, P., & Tang, W. H. W. (2022). Biomarkers for Myocarditis and Inflammatory Cardiomyopathy. *Current Heart Failure Reports*, *19*(5), 346-355. https://doi.org/10.1007/s11897-022-00569-8

Sutton, V. R., Davis, J. E., Cancilla, M., Johnstone, R. W., Ruefli, A. A., Sedelies, K., Browne, K. A., & Trapani, J. A. (2000). Initiation of Apoptosis by Granzyme B Requires Direct Cleavage of Bid, but Not Direct Granzyme B–Mediated Caspase Activation. *The Journal of Experimental Medicine*, *192*(10), 1403-1414. https://doi.org/10.1084/jem.192.10.1403

SV Vasudhar Bhat, R Uma, KK Jayavardanan, CG Mukul, & Akshatha G Desai. (2021). *Therapeutic tumour vaccines : A review*.

Swirski, F. K., & Nahrendorf, M. (2018). Cardioimmunology : The immune system in cardiac homeostasis and disease. *Nature Reviews Immunology*, *18*(12), 733-744. https://doi.org/10.1038/s41577-018-0065-8

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, *131*(5), 861-872. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019

Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, *126*(4), Article 4. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024

Tang, S., Geng, Y., Wang, Y., Lin, Q., Yu, Y., & Li, H. (2024). The roles of ubiquitination and deubiquitination of NLRP3 inflammasome in inflammation-related diseases : A review. *Biomolecules and Biomedicine*, 708-721. https://doi.org/10.17305/bb.2023.9997

Tay, W. T., Fang, Y.-H., Beh, S. T., Liu, Y.-W., Hsu, L.-W., Yen, C.-J., & Liu, P.-Y. (2020). Programmed Cell Death-1 : Programmed Cell Death-Ligand 1 Interaction Protects Human Cardiomyocytes Against T-Cell Mediated Inflammation and Apoptosis Response In Vitro. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(7), Article 7. https://doi.org/10.3390/ijms21072399

Theivanthiran, B., Evans, K. S., DeVito, N. C., Plebanek, M., Sturdivant, M., Wachsmuth, L. P., Salama, A. K. S., Kang, Y., Hsu, D., Balko, J. M., Johnson, D. B., Starr, M., Nixon, A., Holtzhausen, A., & Hanks, B. A. (2020). A tumor-intrinsic PD-L1/NLRP3 inflammasome signaling pathway drives resistance to anti–PD-1 immunotherapy. *Journal of Clinical Investigation*, *130*(5), 2570-2586. https://doi.org/10.1172/JCI133055

Tivol, E. A., Borriello, F., Schweitzer, A. N., Lynch, W. P., Bluestone, J. A., & Sharpe, A. H. (1995). Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*, *3*(5), 541-547. https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90125-6

Toldo, S., & Abbate, A. (2018). The NLRP3 inflammasome in acute myocardial infarction. *Nature Reviews Cardiology*, *15*(4), 203-214. https://doi.org/10.1038/nrcardio.2017.161
Toldo, S., & Abbate, A. (2024). The role of the NLRP3 inflammasome and pyroptosis in cardiovascular diseases. *Nature Reviews Cardiology*, *21*(4), 219-237. https://doi.org/10.1038/s41569-023-00946-3

Trillhaase, A., Maertens, M., Aherrahrou, Z., & Erdmann, J. (2021). Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) in Vascular Research : From Two- to Three-Dimensional Organoids. *Stem Cell Reviews and Reports*, *17*(5), 1741-1753. https://doi.org/10.1007/s12015-021-10149-3

Tschöpe, C., Ammirati, E., Bozkurt, B., Caforio, A. L. P., Cooper, L. T., Felix, S. B., Hare, J. M., Heidecker, B., Heymans, S., Hübner, N., Kelle, S., Klingel, K., Maatz, H., Parwani, A. S., Spillmann, F., Starling, R. C., Tsutsui, H., Seferovic, P., & Van Linthout, S. (2021). Myocarditis and inflammatory cardiomyopathy : Current evidence and future directions. *Nature Reviews Cardiology*, *18*(3), 169-193. https://doi.org/10.1038/s41569-020-00435-x

Tusher, V. G., Tibshirani, R., & Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(9), 5116-5121. https://doi.org/10.1073/pnas.091062498

Valenzuela, N. M. (2023). JAKinibs prevent persistent, IFNγ-autonomous endothelial cell inflammation and immunogenicity. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *325*(1), C186-C207. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00298.2022

Volpato, V., & Webber, C. (2020). Addressing variability in iPSC-derived models of human disease : Guidelines to promote reproducibility. *Disease Models & Mechanisms*, *13*(1), dmm042317. https://doi.org/10.1242/dmm.042317

Wang, J., Okazaki, I., Yoshida, T., Chikuma, S., Kato, Y., Nakaki, F., Hiai, H., Honjo, T., & Okazaki, T. (2010). PD-1 deficiency results in the development of fatal myocarditis in MRL mice. *International Immunology*, *22*(6), Article 6. https://doi.org/10.1093/intimm/dxq026

Wang, Y., Jia, L., Shen, J., Wang, Y., Fu, Z., Su, S., Cai, Z., Wang, J., & Xiang, M. (2018). Cathepsin B aggravates coxsackievirus B3-induced myocarditis through activating the inflammasome and promoting pyroptosis. *PLOS Pathogens*, *14*(1), e1006872. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006872

Wei, S. C., Meijers, W. C., Axelrod, M. L., Anang, N.-A. A. S., Screever, E. M., Wescott, E. C., Johnson, D. B., Whitley, E., Lehmann, L., Courand, P.-Y., Mancuso, J. J., Himmel, L. E., Lebrun-Vignes, B., Wleklinski, M. J., Knollmann, B. C., Srinivasan, J., Li, Y., Atolagbe, O. T., Rao, X., … Allison, J. P. (2021). A Genetic Mouse Model Recapitulates Immune Checkpoint Inhibitor–Associated Myocarditis and Supports a Mechanism-Based Therapeutic Intervention. *Cancer Discovery*, *11*(3), Article 3. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-0856

Wilcox, N. S., Amit, U., Reibel, J. B., Berlin, E., Howell, K., & Ky, B. (2024). Cardiovascular disease and cancer : Shared risk factors and mechanisms. *Nature Reviews Cardiology*. https://doi.org/10.1038/s41569-024-01017-x

Willeford, A., Suetomi, T., Nickle, A., Hoffman, H. M., Miyamoto, S., & Heller Brown, J. (2018). CaMKIIδ-mediated inflammatory gene expression and inflammasome activation in cardiomyocytes initiate inflammation and induce fibrosis. *JCI Insight*, *3*(12), e97054. https://doi.org/10.1172/jci.insight.97054

Xiao, L., Magupalli, V. G., & Wu, H. (2023). Cryo-EM structures of the active NLRP3 inflammasome disc. *Nature*, *613*(7944), 595-600. https://doi.org/10.1038/s41586-022-05570-8

Xie, C. B., Qin, L., Li, G., Fang, C., Kirkiles-Smith, N. C., Tellides, G., Pober, J. S., & Jane-wit, D. (2019). Complement Membrane Attack Complexes Assemble NLRP3 Inflammasomes Triggering IL-1 Activation of IFN-γ–Primed Human Endothelium. *Circulation Research*, *124*(12), 1747-1759. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.314845

Xue, C., Yao, Q., Gu, X., Shi, Q., Yuan, X., Chu, Q., Bao, Z., Lu, J., & Li, L. (2023). Evolving cognition of the JAK-STAT signaling pathway : Autoimmune disorders and cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *8*(1), 204. https://doi.org/10.1038/s41392-023-01468-7

Yao, C., Veleva, T., Scott, L., Cao, S., Li, L., Chen, G., Jeyabal, P., Pan, X., Alsina, K. M., Abu-Taha, I., Ghezelbash, S., Reynolds, C. L., Shen, Y. H., LeMaire, S. A., Schmitz, W., Müller, F. U., El-Armouche, A., Tony Eissa, N., Beeton, C., … Li, N. (2018). Enhanced Cardiomyocyte NLRP3 Inflammasome Signaling Promotes Atrial Fibrillation. *Circulation*, *138*(20), 2227-2242. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.035202

Yao, J., Sterling, K., Wang, Z., Zhang, Y., & Song, W. (2024). The role of inflammasomes in human diseases and their potential as therapeutic targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *9*(1), 10. https://doi.org/10.1038/s41392-023-01687-y

Yu, J., Long, B., Li, Z., Tian, X., Li, D., Long, J., Wang, Y., Chen, Y., Zhang, F., Liu, H., Qian, C., & Shan, J. (2024). Central memory CD4+ T cells play a protective role against immune checkpoint inhibitor–associated myocarditis. *Cardiovascular Research*, *120*(12), 1442-1455. https://doi.org/10.1093/cvr/cvae133

Yun, J., So, J., Jeong, S., Jang, J., Han, S., Jeon, J., Lee, K., Jang, H. R., & Lee, J. (2024). Transcriptome and epigenome dynamics of the clonal heterogeneity of human induced pluripotent stem cells for cardiac differentiation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *82*(1), 2. https://doi.org/10.1007/s00018-024-05493-9

Zegeye, M. M., Lindkvist, M., Fälker, K., Kumawat, A. K., Paramel, G., Grenegård, M., Sirsjö, A., & Ljungberg, L. U. (2018). Activation of the JAK/STAT3 and PI3K/AKT pathways are crucial for IL-6 trans-signaling-mediated pro-inflammatory response in human vascular endothelial cells. *Cell Communication and Signaling*, *16*(1), 55. https://doi.org/10.1186/s12964-018-0268-4

Zhang, H., Lin, J., Shen, Y., Pan, J., Wang, C., & Cheng, L. (2022). Protective Effect of Crocin on Immune Checkpoint Inhibitors-Related Myocarditis Through Inhibiting NLRP3 Mediated Pyroptosis in Cardiomyocytes via NF-κB Pathway. *Journal of Inflammation Research*, *Volume 15*, 1653-1666. https://doi.org/10.2147/JIR.S348464

Zhang, L., Awadalla, M., Mahmood, S. S., Nohria, A., Hassan, M. Z. O., Thuny, F., Zlotoff, D. A., Murphy, S. P., Stone, J. R., Golden, D. L. A., Alvi, R. M., Rokicki, A., Jones-O'Connor, M., Cohen, J. V., Heinzerling, L. M., Mulligan, C., Armanious, M., Barac, A., Forrestal, B. J., … Neilan, T. G. (2020). Cardiovascular magnetic resonance in immune checkpoint inhibitor-associated myocarditis. *European Heart Journal*, *41*(18), Article 18. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa051

Zhang, W., & Liu, H. T. (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research*, *12*(1), 9-18. https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290105

Zhang, W., Xu, J., Fang, H., Tang, L., Chen, W., Sun, Q., Zhang, Q., Yang, F., Sun, Z., Cao, L., Wang, Y., & Guan, X. (2018). Endothelial cells promote triple-negative breast cancer cell metastasis *via* PAI-1 and CCL5 signaling. *The FASEB Journal*, *32*(1), 276-288. https://doi.org/10.1096/fj.201700237RR

Zhang, Y., & Zhang, Z. (2020). The history and advances in cancer immunotherapy : Understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. *Cellular & Molecular Immunology*, *17*(8), 807-821. https://doi.org/10.1038/s41423-020-0488-6

Zheng, Y., Xu, L., Dong, N., & Li, F. (2022). NLRP3 inflammasome : The rising star in cardiovascular diseases. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, *9*, 927061. https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.927061

Zhou, Y.-W., Zhu, Y.-J., Wang, M.-N., Xie, Y., Chen, C.-Y., Zhang, T., Xia, F., Ding, Z.-Y., & Liu, J.-Y. (2019). Immune Checkpoint Inhibitor-Associated Cardiotoxicity : Current Understanding on Its Mechanism, Diagnosis and Management. *Frontiers in Pharmacology*, *10*, 1350. https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01350

Zhu, H., Galdos, F. X., Lee, D., Waliany, S., Huang, Y. V., Ryan, J., Dang, K., Neal, J. W., Wakelee, H. A., Reddy, S. A., Srinivas, S., Lin, L.-L., Witteles, R. M., Maecker, H. T., Davis, M. M., Nguyen, P. K., & Wu, S. M. (2022). Identification of Pathogenic Immune Cell Subsets Associated With Checkpoint Inhibitor–Induced Myocarditis. *Circulation*, *146*(4), Article 4. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.121.056730

Liens :

https://openstax.org/details/books/anatomy-and-physiology-2e (Figures 1 et 5)

https://www.pathophys.org/physiology-of-cardiac-conduction-and-contractility/ (Figure 3)

https://www.creative-diagnostics.com/perforin-granzyme-apoptosis-pathway.htm (Figure 10)