

Université de Montréal

Rôle des vésicules extracellulaires dans le maintien de l'intégrité de l'endothélium lymphatique

par Gabriel Jean

Département des Sciences Biomédicales
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise en Sciences (M.Sc.) Biomédicales

Novembre 2018

© Gabriel Jean, 2018

Résumé

L'athérosclérose est caractérisée par l'accumulation de cholestérol dans la paroi des artères de gros et de moyens calibres, et est associée à une réponse immunitaire inadéquate dans laquelle l'activation et l'apoptose cellulaire jouent un rôle de premier plan. Ces activités cellulaires peuvent entraîner la formation de particules submicroniques appelées vésicules extracellulaires (VEs) qui ont des effets variables sur l'endothélium sanguin et l'évolution subséquente de la plaque. Nous avons démontré que le cholestérol présent dans la lésion athérosclérotique est drainé préférentiellement par les vaisseaux lymphatiques situés dans l'adventice de la paroi artérielle. Comme nous avons également démontré la présence de VEs d'origines hétérogènes dans la lymphe, nous émettons l'hypothèse que l'accumulation massive de VEs dans la paroi artérielle pourrait être à la fois une cause et une conséquence du faible drainage par le système lymphatique. Nous avons d'abord investigué les effets des VEs dérivées de globules rouges et de plaquettes sur l'intégrité des cellules endothéliales lymphatiques (*lymphatic endothelial cells*, LECs). Les LECs ont été traitées avec des concentrations physiologiques de VEs dérivées de globules rouges ou de plaquettes, et leur adhésion et internalisation aux LECs a été évaluée par immunofluorescence et cytométrie en flux. Les effets sur la prolifération des LECs, leur capacité de migration, leur production d'espèces réactives d'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*), la mort cellulaire et la perméabilité ont été évaluées. Les deux types de VEs adhèrent aux LECs *in vitro*. Les VEs dérivées de globules rouges causent l'augmentation de la production de ROS et la diminution de l'activation de la caspase 3 et de la perméabilité chez les LECs, quant aux VEs dérivées de plaquettes, elles provoquent la diminution de la prolifération, de la production de ROS et de l'activation de la caspase 3 chez les LECs. Nos résultats suggèrent que des concentrations physiologiques de VEs dérivées de plaquettes pourraient contribuer au maintien de l'intégrité des LECs, alors que l'accumulation de VEs dérivées de globules rouges pourrait être néfaste. Finalement, ce projet est certes instigateur d'une meilleure compréhension du rôle des VEs dans la modulation de fonction lymphatique associée aux maladies cardiovasculaires.

Mots-clés : Vésicules extracellulaires, Athérosclérose, Lymphatique, Cellules endothéliales

Abstract

Atherosclerosis is characterized by the accumulation of cholesterol in the wall of large- and medium-sized arteries, and is associated with an inadequate immune response in which cellular activation and apoptosis play a major role. These cellular activities can lead to the formation of submicron particles, called extracellular vesicles (EVs), that have variable effects on the blood endothelium and the subsequent plaque evolution. We have shown that cholesterol preferentially travels through the lymphatic vessels located in the adventitia of the arterial wall in order to leave the atherosclerotic lesion. As we have also demonstrated the presence of EVs derived from different cell types in the lymph, we hypothesize that the massive accumulation of EVs in the arterial wall could be both a cause and a consequence of the poor clearance by the lymphatic system. We thus investigated the effects of red blood cell- and platelet-derived EVs on the integrity of lymphatic endothelial cells (LECs). LECs were treated with physiological concentrations of EVs derived from red blood cells and/or platelets, and their adhesion and internalization to LECs was assessed by immunofluorescence and flow cytometry. The effects of EVs on LECs' proliferation, migration capacity, production of reactive oxygen species (ROS), cell death and permeability were also evaluated. Both EV types adhered and were internalised by LECs *in vitro*. Red blood cell-derived EVs increased ROS production, and decreased caspase 3 activation and permeability in LECs, whereas platelet-derived EVs decreased proliferation, ROS production and the activation of caspase 3 in LECs. Our results suggest that platelet-derived EVs are involved in the maintenance of LECs integrity, whereas EVs derived from red blood cells could, in the long term, be harmful. Finally, we believe that this project is a great premise for a better understanding of the role of EVs in lymphatic function modulation in cardiovascular diseases.

Keywords : Extracellular vesicles, Atherosclerosis, Lymphatic, Endothelial cells

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	v
Liste des figures.....	vi
Liste des abréviations.....	vii
Remerciements.....	x
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1 L'athérosclérose.....	2
1.1.1 Pathogenèse de l'athérosclérose.....	2
1.1.2 Le transport inverse du cholestérol.....	5
1.2 Le système lymphatique.....	7
1.2.1 Le système lymphatique et l'athérosclérose.....	9
1.3 Les vésicules extracellulaires.....	11
1.3.1 Les exosomes.....	12
1.3.2 Les microvésicules.....	13
1.3.3 Les corps apoptotiques.....	13
1.3.4 L'internalisation des vésicules extracellulaires.....	15
1.3.5 Les vésicules extracellulaires dans la communication cellulaire.....	16
1.3.6 Les vésicules extracellulaires dans l'athérosclérose.....	17
1.3.7 Les vésicules extracellulaires dans la lymphe.....	21
1.4 Résumé des connaissances sur le sujet.....	23
1.5 Hypothèse et objectifs de l'étude.....	24
Chapitre 2 : Matériel et Méthodes.....	26
2.1 Prélèvements sanguins chez les volontaires sains.....	27
2.2 Production de vésicules extracellulaires à partir de globules rouges sanguines.....	27
2.3 Production de vésicules extracellulaires dérivées de plaquettes circulantes.....	27
2.4 Détermination de la taille des vésicules extracellulaires dérivées de cellules sanguines circulantes.....	29
2.7 Culture cellulaire.....	30
2.8 Mesure de l'adhésion des vésicules extracellulaires sur les LECs.....	30
Chapitre 3 : Résultats.....	35
3.1 : Production efficace de vésicules extracellulaires dérivées de globules rouges ou de plaquettes à partir de sang humain.....	36

3.2 : Les cinétiques d'adhésion et d'internalisation des vésicules extracellulaires dérivées de globules rouges diffèrent de celles des vésicules extracellulaires dérivées de plaquettes <i>in vitro</i>	38
3.3 : Les vésicules extracellulaires dérivées de plaquettes causent la diminution de la prolifération des HMVECs	40
3.4 : Les vésicules extracellulaires dérivées de globules rouges et de plaquettes n'ont pas d'effet sur la capacité de migration des HMVECs	42
3.5 : Les VEs dérivées de globules rouges et de plaquettes causent l'augmentation et la diminution de la production d'espèces réactives d'oxygène par les HMVECs, respectivement	43
3.6 : Les vésicules extracellulaires dérivées de globules rouges et de plaquettes causent la diminution de l'activation de la caspase 3 et les vésicules extracellulaires de plaquettes causent la diminution de la nécrose des HMVECs.....	46
3.7 : Les vésicules extracellulaires dérivées de globules rouges causent la diminution de la perméabilité des HMVECs	48
Chapitre 4 : Discussion, perspectives et conclusions.....	50
4.1 Discussion.....	51
4.2 Perspectives.....	63
4.3 Conclusion	66
Bibliographie.....	i
Tableaux et Figures supplémentaires.....	xxi
Tableaux supplémentaires.....	xxi
Figures supplémentaires.....	xxii
Apolipoprotein A-1 Modulates Atherosclerosis Through Lymphatic Vessel-Dependant Mechanisms in Mice	i

Liste des tableaux

Tableau 1.1. Caractéristiques des trois populations de vésicules extracellulaires.....	14
Tableau 3.1. Effets des VEs dérivées de globules rouges et des VEs dérivées de plaquettes sur l'intégrité des HMVECs.....	49
Tableau supplémentaire 1. Concentration des échantillons de vésicules extracellulaires dérivées de globules rouges et de plaquettes	xiii

Liste des figures

Figure 1.1 Structure du système lymphatique.....	8
Figure 1.2. L'accumulation massive de VEs dans la paroi artérielle peut être simultanément une cause et une conséquence de la mauvaise absorption par les vaisseaux lymphatiques de l'adventice lors du développement de l'athérosclérose.....	24
Figure 2.1. Production de vésicules extracellulaires dérivées de plaquettes et globules rouges circulants.....	28
Figure 3.1. Quantification et caractérisation des échantillons de VEs dérivées de globules rouges et de plaquettes.....	37
Figure 3.2. Adhésion et internalisation des VEs dérivées de globules rouges et de plaquettes sur les HMVECs.....	39
Figure 3.3. Effets des VEs dérivées de globules rouges et de plaquettes sur la viabilité, la prolifération et le cycle cellulaire des HMVECs.....	41
Figure 3.4. Effets des vésicules extracellulaires dérivées de globules rouges et de plaquettes sur la migration des HMVECs.....	42
Figure 3.5. Effets des VEs dérivées de globules rouges et de plaquettes sur le stress oxydatif et la production de ROS par les HMVECs.....	45
Figure 3.6. Effets des VEs dérivées de globules rouges et des VEs dérivées de plaquettes sur la mort cellulaire des HMVECs.....	47
Figure 3.7. Effets des VEs dérivées de globules rouges et des VEs dérivées de plaquettes sur la perméabilité des HMVECs.....	48
Figure supplémentaire 1. Caractérisation de VEs dérivées de plaquettes isolée du sang de patient.....	xxii
Figure supplémentaire 2. Effets des VEs dérivées de globules rouges et de plaquettes sur la viabilité et le cycle cellulaire des HMVECs.....	xxiii
Figure supplémentaire 3. Effets des vésicules extracellulaires dérivées de globules rouges et de plaquettes sur la migration des HMVECs.....	xxiv
Figure supplémentaire 4. Effets des VEs dérivées de globules rouges et des VEs dérivées de plaquettes sur la mort cellulaire des HMVECs.....	xxv
Figure supplémentaire 5. Effets des VEs dérivées de globules rouges sur le ratio cholestérol estérifié/cholestérol total.....	xxvi

Liste des abréviations

ABCA1 : *ATP-binding cassette A1*

ABCG1 : *ATP-binding cassette G1*

AMPc : *Adénosine monophosphate cyclique*

ApoB100 : *Apolipoprotéine B100*

ApoA1 : *Apolipoprotéine A1*

ATP: *Adénosine Triphosphate*

BMP-9: *Bone morphologic protein-9*

CD : *Cellules dendritiques*

CETP : *Cholesterylester transfer protein, ou protéine de transfert des esters de cholestérol*

CFSE: *carboxyfluorescein succinimidyl ester*

CLEC-2: *C-type lectin-like receptor 2*

CMH2DCF-DA: *2'-7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate*

DMSO : *Diméthylsulfoxyde*

EDTA: *Éthylènediaminetétraacétique*

FOXC2: *Forkhead box protein C2*

HCAEC : *Cellules endothéliales de l'artère coronaire humaine*

HDL : *Lipoprotéines de haute densité*

HMVEC-dLyAd : *Cellules microvasculaires endothéliales lymphatiques dermales adultes primaires*

ICAM-1 : *Intercellular Adhesion Molecule 1*

IL-1 : *Interleukine-1*

IL-6 : *Interleukine-6*

LEC : *Cellules endothéliales lymphatiques*

LCAT : *Lécithine-cholestérol acyltransférase*

LDL: *Lipoprotéines de faible densité*

LPS: *Lipopolysaccharide*

M-CSF : *Macrophage colony-stimulating factor*

NAC: *N-acétylcystéine*

NF- κ B : *Nuclear factor-kappa B*

NO: *Oxyde nitrique*

Nrf2: *Nuclear factor (erythroid-derived) 2-like*
NTA : *Nanoparticle tracking assay*
oxLDL : *LDL oxydé*
PAR: *Récepteurs activés par la protéinases, ou protease activated receptors*
PECAM-1: *Platelet and endothelial cell adhesion molecule*
PI3K : *Phosphoinositide 3-kinase*
Prox1 : *Prospero homeobox protein 1*
PRP : *Plasma riche en plaquettes*
PRR : *Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires, ou pattern recognition receptor*
PS : *Phosphatidylsérine*
RNase : *Ribonucléase*
ROS : *Reactive Oxygen species, ou Espèces réactives d'oxygène*
RTC : *Transport inverse du cholestérol*
SMC: *Smooth muscle cells, ou Cellules musculaires lisses*
SOD: *Superoxyde dismutase*
SR-A : *Type 1 scavenger receptor class A*
SR-B1: *Scavenger receptor B1*
TF : *Tissue factor, ou Facteur tissulaire*
TLRs : *Toll-like receptors*
TNF α : *facteur de nécrose tumorale-alpha*
TNS : *Trypsin neutralizing solution*
VCAM-1 : *Vascular cell adhesion molecule 1*
VE : *Vésicule extracellulaire*
VE^{GR} : *Vésicule extracellulaire dérivée de globules rouges*
VE^{PLT} : *Vésicule extracellulaire dérivée de plaquettes*
VLDL: *Lipoprotéines de très faible densité*
VWF : *Facteur de Von Willebrand*

À ma famille et conjointe pour leur amour et support inconditionnel

Remerciements

J'aimerais d'abord remercier ma directrice de recherche, la **Dre Catherine Martel** de m'avoir accepté au sein de son équipe et de m'avoir donné la chance d'y effectuer ma maîtrise. J'aimerais également la remercier pour son support, son encadrement, ses idées ainsi que pour sa bonne humeur, qui détendait l'ambiance même dans les moments les plus difficiles. Merci de m'avoir laissé être moi-même et de m'avoir enduré de la sorte pendant presque trois ans, je n'en aurai probablement pas toujours l'occasion dans le futur.

J'aimerais également remercier les membres de mon laboratoire ainsi que mes anciens collègues et mentors : **Andreea Milasan, Ali Smaani, Maya Farhat, Carl Fortin, Victoria Le Corvec, Marc-Antoine Godin, François Dallaire et Sabri Rial**. Merci pour votre support, motivation, connaissances ainsi que pour vos personnalités qui m'ont fait passer des moments très agréables tout au long de ma formation académique.

J'aimerais remercier ma conjointe, **Rachel Pilon**, sans qui je ne serais pas moi-même. Merci pour ton amour inconditionnel pendant bientôt neuf ans. Merci de m'avoir aimé et supporté au travers des moments les plus difficiles et d'enseigner mon existence.

J'aimerais remercier mes parents, **Carole Jean et Alain Jean**, pour leur amour, support et éducation. Les valeurs et la discipline que vous m'avez inculqué m'ont permis de devenir la personne que je suis aujourd'hui et m'ont permis de traverser plusieurs épreuves difficiles. Vous représentez ce qu'il y a de meilleur chez moi. Je remercie également ma tante **Lise Lepage**, mon parrain **Jean Roussi** ainsi que mes défunts grands-parents **Gabrielle Lepage et Jean-Paul Lepage** pour m'avoir entouré d'autant d'amour depuis ma naissance.

Finalement j'aimerais remercier les membres de mon comité de révision, les **Drs Philippe Comtois et Patrick Provost**, de prendre de leur temps précieux pour lire et corriger ce mémoire.

Chapitre 1 : Introduction

1 Introduction

1.1 L'athérosclérose

L'athérosclérose est la principale cause de mortalité dans les pays développés et celle de la plupart des maladies cardiovasculaires dans le monde¹. Parmi ses complications, on dénote la maladie coronarienne, les accidents vasculaires cérébraux, les anévrismes et la maladie artérielle périphérique^{1,2}. L'athérosclérose est une condition inflammatoire chronique qui s'exacerbe à travers le temps et qui mène au rétrécissement de la lumière des artères de gros et de moyen calibre³. L'infiltration de cholestérol dans la paroi artérielle mène à la formation progressive d'une plaque athérosclérotique pouvant se rompre et occasionner une thrombose locale, menant à l'occlusion partielle ou totale de l'artère^{1,2}. Le détachement du thrombus et son entrée dans la circulation peut entraîner l'occlusion totale de plus petits vaisseaux et engendrer une hypoxie locale par embolie⁴. La formation de lésions athérosclérotiques peut se produire dans plusieurs lits vasculaires à la fois¹. L'athérosclérose peut s'avérer silencieuse et ne pas provoquer de manifestation clinique pendant plusieurs années¹. Malgré la diminution des taux de mortalité liés aux maladies cardiovasculaires depuis une cinquantaine d'années dans les pays industrialisés dû à la prévention et à l'avancée des traitements, la maladie coronarienne demeure la cause principale de mort prématurée chez les adultes à travers le monde¹.

1.1.1 Pathogenèse de l'athérosclérose

Plusieurs facteurs de risques pouvant contribuer à l'avancement de l'athérosclérose ont été établis, notamment l'âge, le genre, l'hypertension, le diabète, l'obésité, la dyslipidémie, le tabagisme ainsi que l'historique familial de maladies cardiovasculaires⁵⁻⁷. Ces différents facteurs peuvent mener à l'apparition d'une lésion athérosclérotique, qui est initiée par une dysfonction endothéliale dans les régions des artères propices au développement de l'athérosclérose caractérisées par le passage d'un flux sanguin turbulent^{7,8}. Cette dysfonction endothéliale est caractérisée par un déséquilibre dans la synthèse ou l'activité de l'oxyde nitrique (NO), responsable de plusieurs effets vasoprotecteurs des cellules endothéliales sanguines, tels que la dilatation des artérioles en réponse à sa relâche par les cellules endothéliales, la diminution du stress oxydatif, l'inhibition de l'adhésion et de l'agrégation

plaquettaire, ainsi que de l'adhésion et la diapédèse des leucocytes^{7,9}. La diminution de la biodisponibilité du NO vient alors altérer la balance entre la vasoconstriction et la vasodilatation des vaisseaux sanguins, et causer une augmentation du stress oxydatif et de la perméabilité endothéliale menant à l'infiltration et l'accumulation de transporteur de cholestérol dans l'espace sous-endothélial, soit dans l'intima de ces vaisseaux^{2,7}.

Les lipoprotéines de faible densité (LDL) sont les principaux transporteurs de cholestérol retrouvés dans la lésion athérosclérotique, et sont constituées de cholestérol estérifié et de triglycérides entourés de cholestérol libre, de phospholipides et d'apolipoprotéines B100 (ApoB100), dont la liaison avec les protéoglycans de la matrice extracellulaire cause leur rétention dans l'espace sous endothélial¹⁰. L'activité enzymatique des myéloperoxydases et des lipoxigénases, ainsi que le stress oxydatif local médié par les espèces réactives d'oxygène (ROS), causent l'oxydation des LDL en LDL oxydés (oxLDL), qui sont reconnus et liés par des protéines transmembranaires "*Toll-like receptors*" (TLRs) et peuvent ainsi causer l'activation de l'immunité innée¹⁰. Cette accumulation de lipoprotéines dans l'espace sous-endothélial stimule l'expression de molécules d'adhésion, telles que la *Vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) et l'*Intercellular Adhesion Molecule 1* (ICAM-1) à la surface des cellules endothéliales dans les régions propices à développer des lésions athérosclérotiques¹¹. Il s'y produit alors un recrutement de cellules immunitaires, incluant les monocytes et autres leucocytes circulants, qui adhèrent et infiltrent la lésion athérosclérotique¹². Le recrutement et la transmigration des monocytes aux sites de lésion est suivi d'une différenciation rapide en macrophages sous l'effet de facteurs stimulants, tels que le *Macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF), le *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) ou le facteur de transcription nucléaire kappa B (NF-κB, ou *nuclear factor-kappa B*)^{2,13}. Les monocytes peuvent également se différencier en cellules dendritiques (CD) qui se retrouvent également dans les lésions athérosclérotiques¹⁴. Il existe divers sous-types distincts de monocytes, qui diffèrent selon leurs antigènes, chez l'humain et la souris¹⁵. Chez les souris ayant développé une hypercholestérolémie, le nombre de monocytes Ly-6C^{hi}, correspondant aux monocytes CD14^{hi}CD16⁻ chez l'humain, augmente exponentiellement en comparaison aux monocytes Ly-6C^{lo}, correspondant aux monocytes CD14⁺CD16⁺ chez l'humain, et s'accumulent sélectivement dans les lésions athérosclérotiques, où ils se différencient en macrophages¹³. Malgré le recrutement de monocytes et leur

différentiation en macrophages, la prolifération locale des macrophages résidents dans la plaque, favorisée par le microenvironnement et dépendante du récepteur *type I scavenger receptor class A* (SR-A), est d'autant plus responsable de la croissance de la lésion athérosclérotique¹⁶. Les macrophages de la plaque deviendront, par la suite, des cellules spumeuses en internalisant de manière excessive le cholestérol provenant des LDL modifiés, tel les oxLDL, s'accumulant dans l'espace sous-endothélial¹⁷. Cette étape clé de la formation de la plaque athérosclérotique peut s'effectuer via pinocytose ou la reconnaissance des LDL modifiés et leur liaison aux récepteurs capables de reconnaître les motifs (PRR, ou *Pattern Recognition Receptor*), tels que SR-A et CD36 exprimés par les macrophages^{17,18}. L'internalisation des oxLDL via CD36 cause notamment l'inhibition de la capacité migratoire des macrophages, favorisant leur rétention dans la lésion athérosclérotique¹⁹. Il fut récemment démontré que les macrophages résidents ne se déplacent généralement pas dans l'intima et demeurent à la même distance de la media lors de la progression ou la régression de la plaque athérosclérotique. Le recrutement de monocytes en surface et leur différenciation en nouvelles couches de macrophages serait la cause de leur pénétration apparente dans la plaque²⁰. En absence de mécanismes de régulation à la baisse, les cellules spumeuses accumulent le LDL jusqu'à des niveaux toxiques, causant leur mort et la formation d'un cœur lipidique dans lequel se retrouve des cellules apoptotiques et nécrotiques, des cristaux de cholestérol et d'autre matériel extracellulaire, tel que les vésicules extracellulaires (VEs)^{2,18,21}. La migration des cellules musculaires lisses de la média à l'intima, où elles vont ensuite proliférer, est une étape importante dans le développement de la lésion athérosclérotique²¹. Leur sécrétion de collagène joue un rôle important dans la formation de la chape fibreuse située entre le cœur lipidique et la lumière du vaisseau, contribuant à la stabilisation de la plaque². Dans les lésions plus avancées, on observe un changement de phénotype chez les cellules musculaires lisses (SMC) située dans l'intima, qui expriment alors moins de protéines contractiles, produisent plus de matrice extracellulaire et démontrent une activité proliférative accrue, contribuant à la progression de la lésion athérosclérotique^{21,22}. Les SMC sont également une source importante de cellules spumeuses retrouvées dans l'intima²². En effet, les SMC expriment plusieurs récepteurs impliqués dans l'internalisation de lipoprotéines, incluant les oxLDL²². De plus, la régulation à la baisse des récepteurs *ATP-binding cassette A1* (ABCA1), impliqués dans le transport inverse du cholestérol, chez les SMC de l'intima contribuent à leur transformation en cellules spumeuses proinflammatoires^{22,23}.

Au fil de la progression et de la complexification de la plaque athérosclérotique, celle-ci devient également plus vulnérable à la rupture et à l'érosion⁴. La mort et la mauvaise élimination des cellules contenues dans la lésion athérosclérotique causent la fragilisation du cœur lipidique dû à l'accumulation de cholestérol libre et au manque de support fourni par les cellules musculaire lisses et leur sécrétion de collagène⁴. L'augmentation de la densité, l'activation et la mort des macrophages mènent à la sécrétion continue de métalloprotéinases venant dégrader le collagène de la chape fibreuse et causant ainsi la fragilisation de la plaque²⁴. L'hypoxie locale, due à l'accroissement de paroi artérielle provoque l'expression de modulateurs angiogéniques, qui stimulent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins provenant des *vasa vasorum* de l'adventice jusqu'à l'intima, et favorisent l'approvisionnement de la lésion athérosclérotique en oxygène et en nutriment⁴. Cette néovascularisation de la lésion athérosclérotique avec des vaisseaux fragiles, perméables et dépourvus de cellules musculaires lisses favorise le recrutement de globules rouges, de plaquettes et autres cellules immunes circulantes, ainsi que leur extravasation menant à une hémorragie locale⁴. L'hémorragie engendrée peut mener à la relâche de VEs, de membranes riches en cholestérol libre ou d'hème libre par les globules rouges, ce qui cause l'augmentation du stress oxydatif local et du recrutement de macrophages dans la lésion, accentuant davantage l'expansion du cœur lipidique et la fragilisation de la chape fibreuse^{25,26}. La fragilisation de la lésion peut mener à son érosion ou sa rupture, tous deux résultant en l'exposition du facteur tissulaire (TF, ou *Tissue factor*) par les tissus sous-endothélial. Le TF induit ensuite l'activation de la thrombine et de la cascade de coagulation menant à la conversion du fibrinogène en fibrine au site de la blessure, puis à la formation d'un thrombus dû à l'activation et agrégation plaquettaire⁴. Ce thrombus peut alors causer l'occlusion partielle de l'artère et occasionner de l'angine de poitrine, ou se détacher et entrer dans la circulation sanguine pour finalement causer l'obstruction d'autres vaisseaux, tels que le réseau veineux, l'artère pulmonaire ou l'artère cérébrale et y occasionner une embolie^{4,27,28}.

1.1.2 Le transport inverse du cholestérol

Tel que mentionné précédemment, il existe un mécanisme physiologique de régression de la plaque athérosclérotique. Le transport inverse du cholestérol des macrophages (mRCT, ou *macrophage Reverse cholesterol transport*) est le mécanisme par lequel le cholestérol est mobilisé hors de la lésion athérosclérotique et des cellules spumeuses qui s'y trouvent pour être

pris en charge par le foie, où il sera redistribué dans l'organisme ou éliminé du corps par la bile²⁹. Le cholestérol peut également être éliminé directement dans les excréments sans sécrétion de bile dans les intestins³⁰. Le mRCT est initié par le transfert de cholestérol des macrophages de la plaque à l'apolipoprotéine A1 (apoA1), accepteur de cholestérol et apolipoprotéine principale des HDL-C, via les récepteurs *ABCA1* à la surface des macrophages^{31,32}. Le transfert de cholestérol à l'ApoA1 résulte en la formation d'une particule HDL-C qui peut alors accumuler plus de cholestérol via *ABCA1*, ATP-binding cassette G1 (*ABCG1*) et le Scavenger receptor B1 (*SR-B1*) exprimé par les macrophages^{31,32}. Le cholestérol libre contenu dans les HDL-C est ensuite estérifié par l'enzyme Lecithin-cholesterol acyltransferase (*LCAT*), qui initie le processus de maturation de l'HDL-C^{32,33}. Le cholestérol libre et estérifié dans les HDL-C mature peut ensuite être pris en charge par le foie via l'interaction avec le *SR-B1* sur les hépatocytes; la composante protéique du HDL-C peut ensuite être réintégrée dans la circulation et recommencer un autre cycle de mRCT^{29,32}. Le cholestérol transféré au foie peut ensuite être converti en lipoprotéines de très faible densité (VLDL) ou éliminé par excrétion dans la bile, puis les excréments³². La protéine de transfert des esters de cholestérol (*CETP*) catalyse le transfert des esters de cholestérol des HDL-C aux VLDL et LDL en échange de triglycérides afin que les LDL formés soient captés par le foie via les récepteurs du LDL^{32,33}. Cependant, le LDL formé peut réintégrer la circulation sanguine et infiltrer la lésion athérosclérotique, où il peut être oxydé, puis phagocyté par les macrophages, menant à leur transformation en cellule spumeuse³². Bien que l'on connaisse comment le cholestérol est mobilisé hors des lésions, et comment il est mobilisé au foie ou excrété, le chemin qu'emprunte le cholestérol pour passer de la lésion athérosclérotique à la circulation sanguine est resté nébuleux jusqu'à tout récemment. En 2013, Martel *et al.* ont mis en évidence un rôle clé du système lymphatique dans le transport inverse du cholestérol. Ils ont démontré qu'en absence de vaisseaux lymphatiques fonctionnels, le cholestérol ne sort pas efficacement de la paroi des vaisseaux sanguins. Ainsi, ils ont décrit un nouveau modèle intégré du transport inverse du cholestérol dans lequel le système lymphatique joue un rôle primordial³¹.

1.2 Le système lymphatique

Durant les dernières années, le système lymphatique s'est distingué en tant que nouvelle cible thérapeutique pour la prévention et le traitement de l'athérosclérose³⁴. Il s'agit d'un système ouvert, unidirectionnel et à basse pression, situé dans pratiquement tous les organes irrigués par le sang³⁵. Impliqué dans l'immunité, la balance des fluides, le transport des lipides, des cellules et des macromolécules, le système lymphatique travaille en parallèle et de manière inter-dépendante au système sanguin^{36,37}. Composants primordiaux du système immunitaire, les vaisseaux lymphatiques s'avèrent la route principale empruntée par les cellules immunitaires voyageant des tissus périphériques vers les ganglions lymphatiques, qui sont le centre de l'immunité adaptative où se rencontrent les lymphocytes et les cellules présentatrices d'antigène, telles que les cellules dendritiques^{38,39}. Le système lymphatique est également impliqué dans l'absorption des lipides, notamment au niveau de l'intestin, où des capillaires lymphatiques, nommés chylifères, absorbent des lipides et des nutriments pour les transporter jusqu'à la circulation sanguine^{38,40,41}. Leur fonction la mieux décrite demeure la maintenance de l'homéostasie des fluides dans le corps par l'absorption des fluides des tissus périphériques et leur retour dans la circulation sanguine³⁶. L'exsudat riche en protéines provenant de la circulation sanguine est d'abord absorbé via la paroi mince et très perméable des capillaires lymphatiques, ou vaisseaux lymphatiques initiaux, situés dans les tissus périphériques pour former la lymphe^{34,36}. Les capillaires lymphatiques sont constitués d'une couche discontinue de cellules endothéliales lymphatiques (LECs, ou *lymphatic endothelial cells*) ainsi que de jonctions de type bouton discontinues « *button-like* » situées entre ces dernières^{35,36,42}. Ils sont également dépourvus d'une membrane basale continue ainsi que de cellules musculaires lisses, et sont caractérisés par l'expression du récepteur LYVE-1 à la surface des LECs^{35,36,42}. La lymphe est ensuite acheminée dans les vaisseaux lymphatiques collecteurs responsables du maintien du flux unidirectionnel lymphatique via la contraction d'unités contractiles nommées lymphangions situées entre des valvules bilatérales empêchant le refoulement de la lymphe et régulée par l'oxyde nitrique⁴². Les collecteurs sont caractérisés par la présence d'une couche discontinue de SMC, l'expression de podoplanine, ainsi que par la présence de jonctions de type fermeture-éclair continues « *zipper-like* » entre les LECs^{35,43}. La lymphe est alors transportée des vaisseaux collecteurs afférents jusqu'aux ganglions lymphatiques pour ensuite atteindre le conduit thoracique via les vaisseaux collecteurs efférents. Elle réintègrera finalement la circulation sanguine par drainage au travers de la veine sous-clavière⁴⁴.

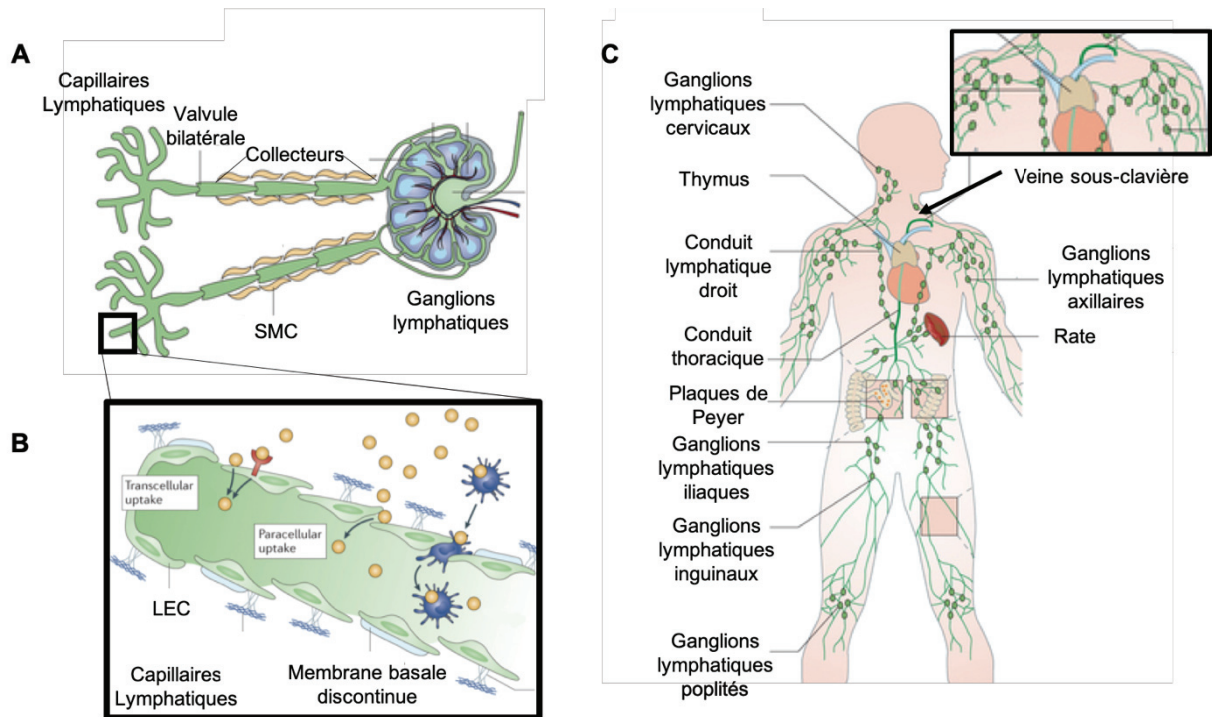


Figure 1.1 Structure du système lymphatique. Illustration montrant les différentes portions du système lymphatique. (A) Vaisseau lymphatique afférent débutant par les capillaires lymphatiques et se terminant par les ganglions lymphatiques en passant par les vaisseaux lymphatiques collecteurs. (B) Capillaire lymphatique. (C) Distribution du système lymphatique dans le corps humain. Adapté de Trevisan et al. *Nature reviews Drug Discoveries*, 2015⁴⁵

Au stade embryonnaire, la formation des vaisseaux lymphatiques se fait majoritairement à partir de la veine cardinale, où des cellules endothéliales veineuses vont se différencier en LECs et former latéralement des sacs lymphatiques «*lymph sacs*», précurseurs des vaisseaux lymphatiques, dont l'expression spécifique du facteur de transcription *Prospero homeobox protein 1* (Prox1) semble être essentielle à la promotion de la lymphangiogénèse^{40,46}. La vascularisation et formation de vaisseaux lymphatiques matures s'effectue ensuite grâce à l'interaction entre le récepteur VEGFR-3, dont l'expression est régulée par Prox1, avec ses ligands VEGF-C et VEGF-D^{40,47-49}. Plusieurs études effectuées chez les souris et les poissons ont démontré que le VEGF-C est essentiel au développement du système lymphatique au stade embryonnaire, alors que son homologue VEGF-D ne l'est pas, mais peut tout même contribuer à la lymphangiogénèse au stade adulte^{50,51}. En plus de son rôle dans la lymphangiogénèse, le VEGF-C et sa signalisation via VEGFR-3 sont également impliqués dans la propulsion de la lymphe en stimulant la contraction des vaisseaux lymphatiques⁵². Les plaquettes jouent également un rôle primordial dans la formation des vaisseaux lymphatiques au stade

embryonnaire et à l'âge adulte en permettant la séparation du système lymphatique et du système sanguin par agrégation^{53,54}. Cette séparation s'avère dépendante de l'activation plaquettaire et de la relâche de BMP-9 due à l'interaction entre la podoplanine exprimée par les LECs, et le récepteur C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2) exprimé par les plaquettes, menant à l'inhibition de la prolifération, de la migration et la formation de tubes des LECs^{54,55}. L'agrégation plaquettaire demeure également essentielle dans le maintien de l'intégrité lymphatique tout au long de la vie, soit en formant un thrombus empêchant le refoulement de sang dans la lymphe au niveau de la jonction lymphoveineuse liant les deux systèmes circulatoires⁵³. Finalement, le facteur de transcription *Forkhead box protein C2* (FOXC2) est impliqué dans l'organisation des jonctions entre les LECs, sa délétion causant une dysfonction lymphatique globale, notamment au niveau des jonctions intercellulaires, des valvules bilatérales ainsi que de la lumière lymphatique, menant à la mort⁵⁶.

1.2.1 Le système lymphatique et l'athérosclérose

En raison de son rôle au sein du système immunitaire, le système lymphatique est maintenant étudié dans plusieurs maladies inflammatoires chroniques et aiguës, d'où l'intérêt pour son implication dans l'athérosclérose^{31,57}. En 1981, Lemole a fait la revue de plusieurs publications associant l'obstruction lymphatique à l'apparition de plaques athérosclérotiques, et suggère que la stase lymphatique pourrait être impliquée dans la pathogenèse de l'athérosclérose⁵⁸. La présence de vaisseaux lymphatiques fut couramment observée dans l'adventice des artères chez les animaux, sous-entendant la potentielle implication du système lymphatique dans le drainage des cellules immunitaires et cytokines présentes dans l'adventice^{59,60}. Des capillaires lymphatiques furent également observés dans l'adventice et entourant le tissu adipeux de l'aorte, autant chez des souris en santé que des souris hypercholestérolémique (apoE^{-/-}); leur présence étant particulièrement abondante sous la plaque retrouvée dans le sinus aortique^{31,40}. Une étude effectuée sur 81 segments d'artères dans lesquels les vaisseaux lymphatiques furent identifiés et quantifiés a pu démontrer une corrélation positive entre le nombre de vaisseaux lymphatiques présents dans l'adventice et la progression de l'athérosclérose évaluée par l'épaisseur de l'intima chez l'humain⁶¹. Des vaisseaux lymphatiques ont également été observés jusque dans l'intima des lésions plus avancées chez l'humain⁶². Il a fallu cependant attendre l'avancée des techniques génétiques et chirurgicales sur

les modèles animaux avant de pouvoir lier quantitativement le système lymphatique au RCT⁴⁰. En 2013, une étude publiée par Martel *et al.* a d'abord su démontrer, grâce à des techniques d'ablation chirurgicale et génétique respectives des vaisseaux lymphatiques, que ces derniers sont des routes importantes pour le RCT et le drainage du cholestérol des tissus périphériques³¹. L'équipe a mis au point un modèle chirurgical de transplantation d'une aorte pré-chargée avec du cholestérol marqué d'une souris hypercholestérolémique (apoE^{-/-}), dans la cavité abdominale d'une souris (apoE^{-/-}) incapable de régression spontanée de la plaque³¹. Les traitements avec un anticorps neutralisant le VEGFR3, qui inhibent la reformation du système lymphatique autour de l'aorte, et l'utilisation d'un vecteur d'expression d'apoE, qui permet l'induction de l'efflux de cholestérol et la régression de la plaque, a permis de démontrer que le flux sanguin altéré par le transplant causait une réorientation des vaisseaux lymphatiques reformés³¹. De plus, suivant l'induction de l'efflux de cholestérol, des niveaux plus élevés de cholestérol total et de cholestérol estérifié étaient retrouvés dans les aortes transplantées des souris dont la reformation des vaisseaux lymphatique fut inhibée par l'anticorps neutralisant le VEGFR3, en comparaison avec les aortes de celles ayant été traitée avec l'anticorps isotype contrôle, démontrant l'importance des vaisseaux lymphatiques de l'aorte dans le RCT³¹. Dans la même optique, une étude publiée par Vuorio *et al.* dans laquelle deux modèle de souris transgéniques présentant une dysfonction lymphatique, soit les « Chy mice » présentant une mutation inactivant le VEGFR-3, ainsi que des souris exprimant une version soluble du VEGFR-3, furent croisés avec des souris athérosclérotiques (Ldlr^{-/-}/Apob_{100/100}), a su démontré une corrélation positive entre la dysfonction lymphatique et les niveaux de cholestérol plasmatiques, les niveaux de cholestérol et de triglycérides contenu dans les LDL et VLDL, et la progression de la plaque athérosclérotique⁶³. La dysfonction lymphatique reliée à l'athérosclérose fut étudiée plus en profondeur dans une étude publiée par Milasan *et al.* dans laquelle la fonction lymphatique fut caractérisée chez des souris de type sauvage (*wild-type*), des souris athérosclérotiques (Ldlr^{-/-}/Apob_{100/100}) et des souris athéroprotégées (Pcsk9^{-/-})³⁴. Il fut démontré que la dysfonction lymphatique touchait principalement les vaisseaux lymphatiques collecteurs et apparaissait aussitôt qu'à trois mois, soit avant même l'apparition de la plaque athérosclérotique³⁴. Cette dysfonction s'avérait indépendante du cholestérol, mais dépendante du LDLR, car l'augmentation de l'expression du LDLR due à l'absence du Pcsk9 s'est avérée corrélée positivement avec l'intégrité des collecteurs en comparaison avec celle des souris wild-type³⁴. Il y fut également confirmé qu'un traitement avec un agoniste spécifique du VEGFR-3, le

VEGF-C 152s, pouvait rétablir la fonction lymphatique avant le développement de l'athérosclérose chez les souris (Ldlr^{-/-}/Apob_{100/100}) indépendamment de la diminution de l'hypercholestérolémie³⁴. L'équipe a ensuite investigué les effets de l'apoA-1, principal constituant des HDL ayant plusieurs effets athéroprotecteurs rapportés dans la littérature, sur la dysfonction lymphatique liée à l'athérosclérose chez des souris Ldlr^{-/-}⁴². Il fut alors rapporté que l'injection d'apoA-1 par voie intradermale a su rétablir la fonction lymphatique par l'amélioration du transport des cellules immunes et par la diminution de la perméabilité en comparaison avec les souris contrôles, se traduisant par une diminution de la quantité de lipides contenue dans la lésion athérosclérotique⁴². Les effets protecteurs de l'apoA-1 sur la fonction lymphatique pourrait s'avérer dépendants des plaquettes, puisqu'il fut rapporté que le traitement des LECs avec de l'apoA-1 causait une augmentation de l'adhésion plaquettaire à ces dernières. L'observation d'un effet de « pont » ou de consolidation des LECs médié par les plaquettes adhérentes, dont les pseudopodes semblent relier les LECs, sous-entend un mécanisme potentiel pouvant renforcer les jonctions entre les LECs et préserver l'intégrité lymphatique⁴². Il fut également rapporté que le traitement des souris avec l'apoA-1 causait une diminution de l'agrégation des plaquettes isolée à partir de leur sang, suggérant que l'augmentation de l'adhésion plaquettaire aux LECs pourrait être causée par une diminution de leur agrégation⁴². Les plaquettes ne sont pas considérées comme des composants habituels de la lymphe, cependant leurs effets pourraient être médiés suite à une adhésion rapide à l'endothélium lymphatique au niveau de la jonction lymphoveineuse ou par la relâche de VEs dont la présence fut rapportée dans la lymphe^{42,43}.

1.3 Les vésicules extracellulaires

Le terme vésicules extracellulaires (VEs) est employé pour définir un large éventail de vésicules relâchées par les cellules⁶⁴. Les VEs constituent une population hétérogène de vésicules submicroniques hébergeant du matériel biologique de la cellule d'origine entouré d'une bicouche lipidique^{65,66}. Elles ont été identifiées dans plusieurs fluides corporels, tels que le plasma, l'urine, la salive, la bile, le lait maternel, le sperme, le liquide amniotique, le fluide cérébrospinal et le liquide d'ascite⁶⁷. Elles peuvent être relâchées par pratiquement tous les types cellulaires suivant leur activation ou leur apoptose, incluant les cellules endothéliales, les plaquettes, les globules rouges, les cellules musculaires lisses, les monocytes et les macrophages

ainsi que les cardiomyocytes^{65,68}. Autrefois considérées comme de simples débris cellulaires, elles sont maintenant considérées comme des médiateurs importants dans la communication cellulaire et comme de potentiels biomarqueurs de maladies ou de santé⁶⁶. Les vésicules extracellulaires peuvent contenir des protéines, des lipides, du matériel nucléaire, de l'ADN, des microARNs, des ARNs non codants et/ou des récepteurs et antigènes de surface qui proviennent des cellules dont elles originent, et qui dépendent des conditions physiologiques ou pathologiques dans lesquelles elles ont été formées et sécrétées^{21,66,69}. Les vésicules extracellulaires ont été associées avec plusieurs pathologies, notamment l'arthrite⁷⁰, la progression de tumeurs⁷¹, l'angiogenèse⁷², la métastase⁷¹, le diabète⁷³, l'hypertension⁷⁴, le syndrome métabolique⁷⁵, l'hypercholestérolémie⁷⁶ et les maladies cardiovasculaires incluant l'athérosclérose⁶⁵. La classification et caractérisation des vésicules demeure sujet de débats, mais on en distingue maintenant trois populations distinctes : les exosomes, les microvésicules et les corps apoptotiques (Tableau 1.1), classées selon leur taille et leur mécanisme de formation²¹.

1.3.1 Les exosomes

Les exosomes, vésicules de forme homogène mesurant de 40 à 100 nm et sécrétés par divers types cellulaires, constituent la sous-population de VEs présentant les plus petites tailles⁷⁷. On les retrouve dans plusieurs fluides physiologiques, tels le plasma, l'urine ou le sperme⁷⁷. Ils sont formés par processus actif de fusion de corps multivésiculaires avec la membrane plasmique suivi de leur diffusion dans le milieu extracellulaire^{21,65}. Les corps multivésiculaires sont formés par bourgeonnement à partir d'un endosome, lui-même le résultat d'un bourgeonnement interne de la membrane plasmique⁶⁶, et constituent alors des organelles de l'endosomes⁷⁷. Ils sont impliqués dans plusieurs fonctions liées à l'endocytose et au trafic de protéines, soit leur tri, recyclage, transport, stockage et libération⁷⁷. Ces corps multivésiculaires peuvent par la suite fusionner avec la membrane plasmique et être relâchées dans le milieu extracellulaire pour former des exosomes⁶⁶. Ils contiennent alors des protéines associées à l'endosomes, telles que les GTPase Rab, les SNAREs, les annexines et la flotilline. Ils hébergent également un ensemble de protéines conservées au travers de l'évolution, telles que Tsg101, Alix et les tétraspanines, des protéines membranaires incluant CD9, CD63, et CD81, et sont riches en lipides, tels le cholestérol et le ganglioside GM1^{21,77-79}. Les tétraspanines, sont couramment employés comme marqueurs généraux d'exosomes. Toutefois,

elles peuvent être exprimées par d'autres sous-types de VEs émergeant de la membrane plasmique en raison de leur présence à la surface de divers types cellulaires, et ont déjà été identifiées à la surface de microvésicules également⁸⁰.

1.3.2 Les microvésicules

Les microvésicules mesurent de 100 à 1000 nm et présentent des formes hétérogènes⁷⁷. Elles sont formées par remodelage du cytosquelette, et leur relâche est augmentée en condition inflammatoire, d'hypoxie ou d'activation^{21,81}. Un afflux cytosolique d'ions calciques peut perturber la distribution asymétrique des phospholipides constituant la bicouche membranaire par l'activation de la scramblase impliquée dans la translocation des phospholipides membranaire, résultant en une redistribution des phospholipides dans la membrane et la formation de vésicules. La dégradation du cytosquelette causée par la protéolyse dépendante des ions calciques favorise le bourgeonnement de ces vésicules qui peuvent alors exprimer à leur surface des phospholipides constituant normalement la couche membranaire interne telle que la phosphatidylsérine (PS) pouvant être utilisée pour les identifier⁶⁶. Toutefois, il a déjà été observé chez les VEs plasmiques que les microvésicules n'externalisent pas toutes la phosphatidylsérine^{21,82}. Elles peuvent héberger la flotillin-2, des sélectines, des intégrines et des métalloprotéinases⁷⁷.

1.3.3 Les corps apoptotiques

Les corps apoptotiques sont relâchés lors de l'apoptose et sont constitués de matériel apoptotique entouré d'une membrane perméable^{21,65}. Leur taille est nettement plus élevée que les autres sous-populations de VEs et peut varier entre 1 et 5 micromètres⁸³. Plusieurs changements affectent la morphologie cellulaire lors de l'apoptose, tels que la contraction de la cellule, le bourgeonnement de la membrane, l'externalisation de la phosphatidylsérine et la fragmentation de l'ADN⁸⁴. Il s'y produit alors des forces de contraction médiés par les filaments d'actines et myosines menant à la formation des corps apoptotiques⁸⁴. Elles peuvent contenir des organelles intactes, de l'ADN et des histones, et peuvent donc être marqués à l'iodure de propidium s'intercalant dans l'ADN^{77,85}. Ils sont impliqués dans le transfert horizontal d'ADN incluant de l'ADN tumoral pouvant résulter en l'induction d'un phénotype tumorigène, dans la présentation des épitopes aux lymphocytes T via l'internalisation par les cellules phagocytaires

et dans la présentation d'autoantigènes aux lymphocytes B^{85,86}. L'élimination rapide des corps apoptotiques des fluides corporels par les cellules phagocytaires complexifie leur caractérisation⁶⁹.

Tableau 1.1. Caractéristiques des trois populations de vésicules extracellulaires.

Caractéristique	Exosomes	Microvésicules	Corps apoptotiques
Caractéristiques communes	<ul style="list-style-type: none"> •Matériel biologique de la cellule d'origine (protéines, lipides, matériel nucléaire, ADN, microARNs, ARNs non codants, antigènes) •Bicouche lipidique •Identifiées dans différents fluides corporels •Associées à plusieurs pathologies 		
Taille	40 à 100 nm	100 à 1000 nm	1 à 5 µm
Mécanisme de formation	Processus actif de fusion de corps multivésiculaires avec la membrane plasmique	Remodelâge du cytosquelette	Relâche lors de l'apoptose
Identification	<ul style="list-style-type: none"> •Tsg101 •Alix •CD9, CD63, CD81 •GTPase Rab •SNAREs •Annexines •Flotilline 	<ul style="list-style-type: none"> •Marqueurs spécifiques de surface de la cellule d'origine •Phosphatidylsérine (Pas toujours*) •Flotillin-2 •Selectines •Intégrines •Métalloprotéinases 	<ul style="list-style-type: none"> •Iodure de propidium •Phosphatidylsérine

Tableau récapitulatif des principales caractéristiques des trois populations de vésicules extracellulaires.

1.3.4 L'internalisation des vésicules extracellulaires

Plusieurs mécanismes peuvent être impliqués dans l'internalisation des VEs dans des cellules cibles⁷⁷. Des protéines exprimées à la surface des vésicules extracellulaires peuvent notamment interagir avec des récepteurs à la surface de cellules cibles⁸⁷. Les tétraspanines sont exprimées abondamment par les VEs et sont impliquées habituellement dans l'adhésion, le déplacement, l'activation et la prolifération⁸⁷. On estime alors qu'elles pourraient potentiellement médier l'internalisation des VEs dans des cellules cibles⁸⁷. Il fut notamment démontré que l'inhibition de l'activité des tétraspanines avec des anticorps cause la diminution de l'internalisation de VEs dans des cellules cibles et que les tétraspanines sont impliquées dans la sélection de cellules cibles par les exosomes^{88,89}. Les intégrines et immunoglobulines, impliquées dans l'adhésion, la signalisation cellulaire, la transmigration des leucocytes et la présentation d'antigènes, seraient également impliquées dans l'intégration des VEs. Par exemple, le blocage de CD11a, son ligand ICAM-1, CD51 et CD61 ont chacun causé la diminution de l'intégration de VEs par les cellules dendritiques^{87,88}. Des expériences semblables ont également démontré le rôle potentiel des protéoglycans et des lectines dans l'internalisation des VEs⁸⁷. Les lectines DC-SIGN, DEC-205 et Galectin-5 ont notamment été associées à l'internalisation de VEs grâce à des expériences d'inhibition ou de compétition⁸⁷.

L'endocytose, processus actif par lequel les cellules internalisent des molécules ou particules, serait également un mécanisme largement impliqué dans l'internalisation des vésicules extracellulaires^{87,90}. Plusieurs études ont pu démontrer l'intégration de VEs dans des endosomes, parfois aussitôt qu'à 5 minutes, et que cette internalisation était nettement réduite à 4°C, démontrant que l'endocytose des VEs est un processus actif nécessitant de l'énergie^{88,91}. L'utilisation de la Cytochalasin D, capable d'inhiber l'endocytose par la dépolarisation des filaments d'actines, a également causé la diminution de l'intégration des VEs chez plusieurs types cellulaires^{88,91}. L'endocytose dépendante de clathrine et l'endocytose dépendante de la cavéoline implique deux mécanismes distincts. L'endocytose dépendante de la clathrine implique la formation progressive de vésicules recouverte de clathrine exprimant plusieurs récepteurs transmembranaires ainsi que leurs ligands leur permettant d'intégrer la cellule cible pour ensuite se débarrasser de la clathrine et fusionner avec un endosome⁸⁷. L'endocytose dépendante de la cavéoline implique plutôt l'invagination de cavéoles, des sous-domaines des radeaux lipidiques, qui sont formées par l'action de la cavéoline, une protéine située sur ces

dernières⁸⁷. Plusieurs études suggèrent que ces deux types d'endocytose sont impliqués dans l'internalisation de vésicules extracellulaires suite à des expériences d'inhibition⁹¹⁻⁹³.

Les VEs peuvent également être internalisé via macropinocytose et phagocytose⁸⁷. La macropinocytose implique l'invagination de la membrane cellulaire en une extension qui entoure une zone de fluide extracellulaire, puis sa fusion avec la membrane afin d'intérioriser la zone de fluide extracellulaire englobée en une vésicule⁸⁷. L'inhibition de l'échangeur Na⁺/H⁺ impliqué dans la macropinocytose avec de l'amiloride a inhibé l'internalisation des exosomes dans des macrophages *in vitro*⁹⁴. La phagocytose est induite par le contact physique avec des récepteurs à la surface de cellules phagocytes spécialisées, comme des macrophages, ayant préalablement formé des invaginations destinées à l'internalisation des agents donnés⁸⁷. L'usage de la wortmannin et de LY294002, des inhibiteurs de la PI3-kinase essentielle à la formation de phagosome, a causé l'inhibition dose-dépendante de l'internalisation des exosomes dans des macrophages⁹³. La phosphatidylsérine (PS) fréquemment externalisée par les vésicules extracellulaires serait également impliquée dans l'internalisation des VEs par phagocytose ou macropinocytose. Il a été démontré que la compétition de la PS avec un analogue O-phospho-L-sérine, et son inhibition par sa liaison avec l'annexine V, ont tous deux diminués l'internalisation des exosomes par des macrophages *in vitro*^{88,95}. L'internalisation des exosomes par fusion avec des cellules de mélanome fut également observée *in vitro* en condition de pH acide potentiellement dû à la condition lipidique des exosomes en condition acide⁹⁶. Plusieurs études suggèrent que l'internalisation des VEs pourrait potentiellement être spécifique à la cellule cible, car l'internalisation des VEs peut s'avérer parfois plus efficace chez un certain type cellulaire plutôt qu'un autre. Toutefois, ce questionnement demeure sujet de débat dans la recherche sur les VEs⁸⁷.

1.3.5 Les vésicules extracellulaires dans la communication cellulaire

Les vésicules extracellulaires exercent plusieurs fonctions et sont maintenant reconnues (spécialement les exosomes et vésicules extracellulaires) par la communauté scientifique comme des médiateurs importants de la communication cellulaire, autant locale que systémique⁶⁷. Les VEs peuvent intervenir dans le contrôle de la fonction de types cellulaires spécifiques, incluant des types distincts de ceux dont elles proviennent⁷⁷. Par exemple, les

exosomes peuvent exercer une communication paracrine locale, mais peuvent également entrer en circulation systémique pour exercer une communication plus endocrine⁷⁷. Leur bicouche membranaire leur confère la capacité de protéger leur cargo contre les enzymes qui pourraient les dégrader, comme la ribonucléase (RNase) ou la trypsine^{77,97}. Les VEs peuvent également transférer leur cargo en fusionnant avec la membrane de la cellule cible, soit par endocytose ou par phagocytose^{77,93,98}. Il fut notamment démontré que les ARN messagers et les micro ARN contenus dans les VEs peuvent être transférés dans des cellules cibles et y être traduits en protéines, ou y réguler l'expression de gènes via la traduction *de novo* ou la régulation post transcriptionnelle, démontrant alors que cet ARN peut être fonctionnel au sein de sa nouvelle cellule⁹⁹. Les VEs peuvent être impliquées dans le transfert d'ARN entre cellules, et peuvent y favoriser certaines cascades de signalisation spécifiques dans le but d'y induire des modifications phénotypiques^{87,100,101}. Le transfert horizontal de microARNs par vésiculation et la régulation subséquente de gènes au niveau de l'ARN messager et des protéines chez des types cellulaires différents furent notamment rapportés¹⁰².

1.3.6 Les vésicules extracellulaires dans l'athérosclérose

Les vésicules extracellulaires ont été associées à divers stades de l'athérosclérose²¹. Plusieurs facteurs de risques de l'athérosclérose sont associés avec l'augmentation des niveaux de VEs circulantes dans le sang, notamment le diabète, l'hypertension, la dyslipidémie et le tabagisme²¹. Les vésicules extracellulaires se retrouvent dans les lésions athérosclérotiques durant les stades initiaux jusqu'aux plus avancés^{103,104}. De provenance différente et de nature plus thrombogénique que les VEs circulant dans le plasma, on suppose que la concentration plus élevée de VEs contenue dans la lésion athérosclérotique est due à l'activation et/ou l'apoptose des cellules contenues dans celle-ci¹⁰³. Elles pourraient contribuer à l'augmentation de l'inflammation locale en stimulant la synthèse de cytokines proinflammatoire, telles que l'interleukine-6 et l'interleukine-8, par les cellules endothéliales et les leukocytes et ainsi accentuer le recrutement et la transmigration des monocytes dans la plaque¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. Les VEs pourraient également faciliter l'adhésion et la diapédèse des monocytes à travers l'endothélium en causant l'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion, telles que ICAM-1 ou VCAM-1 des cellules endothéliales ainsi que les récepteurs de ces molécules à la surface des monocytes, telles que CD11b, CD32 ou CD33¹⁰⁷⁻¹¹². Les vésicules extracellulaires circulantes

en conditions pathologiques, comme le syndrome métabolique, pourraient également contribuer à l'apparition d'une dysfonction endothéliale en interférant avec les propriétés antiathérogéniques des cellules endothéliales en plus d'altérer le tonus vasculaire et la relaxation dépendante de l'endothélium²¹. Elles peuvent causer une diminution de la synthèse d'oxyde nitrique par les cellules endothéliales en induisant la phosphorylation du site d'inhibition de la NO synthase, ou par l'augmentation du stress oxydatif local en augmentant la synthèse d'espèces réactives d'oxygène par la NADPH oxydase^{109,113-116}. Elles peuvent également causer une augmentation de la perméabilité endothéliale, potentiellement par l'augmentation de l'apoptose des cellules endothéliales due au transfert de caspase 3, du facteur de nécrose tumorale-alpha (TNF α), de l'enzyme de conversion du TNF α active ou d'enzymes Rho kinase actives à ces dernières¹¹⁷. Il fut également démontré que des vésicules extracellulaires dérivées de cellules cancéreuses et riches en cholestérol pouvaient stimuler la formation de cellules spumeuses en augmentant l'absorption de cholestérol par les macrophages proportionnellement au contenu en cholestérol des VEs et ce, autant en culture que dans des tissus¹¹⁸. Des exosomes relâchés par des lymphocytes T activés ont causé l'accumulation de cholestérol dans des monocytes et des macrophages en culture et stimulé leur production de TNF α suivant leur internalisation dépendante du récepteur de la phosphatidylsérine¹¹⁹. Le transport de caspases et l'accumulation de cholestérol lors de l'élimination de VEs par les macrophages et cellules spumeuses peuvent induire leur mort par apoptose et mener à l'accumulation de lipides extracellulaires dans le cœur lipidique de la lésion athérosclérotique^{120,121}. Les vésicules extracellulaires pourraient également contribuer au développement de la plaque en stimulant la prolifération des cellules musculaires lisses ayant migré entre le cœur lipidique et la lumière du vaisseau^{122,123}. Des études ont observé un enrichissement en métalloprotéinases chez des VEs dérivées de macrophages ou de cellules endothéliales, suggérant qu'elles pourraient contribuer à la dégradation du collagène de la matrice extracellulaire et à la fragilisation de la plaque athérosclérotique^{124,125}. Des VEs exprimant le ligand de CD40 peuvent se lier au récepteur CD40 à la surface des cellules endothéliales et en stimuler la prolifération ainsi que l'angiogenèse *in vivo*. Elles stimulent ainsi la néovascularisation et contribuent à l'instabilité de la lésion athérosclérotique¹²⁶. Les vésicules extracellulaires peuvent également induire la cascade de coagulation et la formation de thrombus par l'exposition du facteur tissulaire et la génération de thrombine^{103,127}.

Bien que plusieurs types cellulaires peuvent relâcher des vésicules extracellulaires qui pourraient s'avérer des joueurs importants dans la progression ou régression de l'athérosclérose, les travaux qui forment le corps de ce mémoire vont porter sur deux sous-types de VEs très abondants en circulation^{21,43,82}: les VEs dérivées des globules rouges (VE^{GR}) et des plaquettes (VE^{PLT}).

1.3.6.1 Les vésicules extracellulaires dérivées de globules rouges

Les globules rouges, ou érythrocytes, constituent le type cellulaire le plus abondant dans le sang, et leurs principales fonctions sont le transport de l'oxygène et du dioxyde de carbone, et la relâche d'adénosine triphosphate (ATP) et d'oxyde nitrique^{26,128}. Ils hébergent plusieurs enzymes et molécules exerçant des activités antioxydantes²⁶. Les globules rouges sont les cellules qui relâchent le plus de vésicules extracellulaires dans le sang; ils perdent, par vésiculation, environ 20% de leur membrane et augmentent ainsi leur concentration en hémoglobine d'environ 14% pendant la durée totale de leur vie^{26,129,130}. Les VEs dérivées d'érythrocytes circulants mesurent généralement entre 100 et 300 nm, et aborent principalement une forme sphérique⁸². Ces VEs sont totalement dépourvues de composantes du cytosquelette, et sont entourées d'une bicouche lipidique riche en phospholipides, protéines, cholestérol, hémoglobine résiduelle, acétylcholinestérase et composants des radeaux lipidiques, tels que le ganglioside M1 et la stomatine^{26,129}. Leur relâche est, de manière générale, la conséquence de la sénescence des érythrocytes reliée à leur vieillissement, et trois mécanismes ont été proposés pour l'expliquer²⁶. Le mécanisme d'éryptose s'apparente à l'apoptose et se produit lorsqu'un influx d'ions calciques au travers de canaux non spécifiques altérés cause l'activation de la scramblase, de la calpaïne et de la floppase dépendante de l'ATP ainsi que l'inhibition de la flippase dépendante de l'ATP. Ces phénomènes provoquent l'altération de l'asymétrie de la bicouche lipidique, l'externalisation de la phosphatidylsérine et la relâche de VEs^{26,130}. Le mécanisme du regroupement de la bande 3, une protéine transmembranaire importante de la membrane des globules rouges, consiste en l'oxydation de l'hémoglobine menant à la formation d'hémicrome non propice au transport de l'oxygène, à l'agrégation de multimères de la bande 3 dans la membrane, et à la dégradation de protéines du cytosquelette^{26,130}. Finalement, le mécanisme du stress oxydatif impliquerait la liaison de l'hémoglobine à la bande 3 causée par les ROS, puis à l'activation de canaux calciques calcium dépendant, la phosphorylation de

protéines impliquées, et l'agrégation de la bande 3 causant la vésiculation et relâche de VEs^{26,130}. L'exposition à des niveaux élevés de calcium et la diminution de la concentration d'ATP sont alors des conditions favorables à la relâche de VEs par les globules rouges¹²⁹. Par ailleurs, la formation de vésicules extracellulaires serait un moyen par lequel les globules rouges se débarrasseraient de leur contenu néfaste, comme l'hémoglobine dénaturée, le complexe d'attaque membranaire C5b-9, des néoantigènes de la bande 3, ou d'une accumulation d'immunoglobulines¹³⁰. Les VEG^R peuvent être impliquée dans la coagulation, car elles peuvent générer de la thrombine par un mécanisme dépendant du facteur XIIa¹³¹ et stimuler la formation de thrombus *in vivo* proportionnellement à leur exposition du facteur tissulaire (TF)¹³². Contrairement aux globules rouges intacts, les VEG^R ont été associée à l'augmentation du stress oxydatif, notamment par le transfert d'hème libre aux cellules endothéliales¹³³. Elles peuvent ainsi interférer avec la signalisation de l'oxyde nitrique et favoriser l'initiation d'une dysfonction endothéliale, une étape clé dans le développement de la lésion athérosclérotique²¹. Elles peuvent également exposer le facteur tissulaire et générer de la thrombine, et ainsi exercer ainsi une activité procoagulante qui peut favoriser la formation de thrombus lors de la rupture ou de l'érosion de la plaque athérosclérotique¹⁰³.

1.3.6.2 Les vésicules extracellulaires dérivées de plaquettes

Les plaquettes sont des éléments sanguins anucléées impliquées dans le maintien de l'intégrité vasculaire et dans l'homéostasie, notamment par l'initiation de la cascade de coagulation¹³⁴. Elles sont produites à partir des mégacaryocytes de la moelle osseuse et, tout comme ces derniers, peuvent relâcher des vésicules extracellulaires qui se retrouvent en circulation^{134,135}. Les EV^{PLT} peuvent mesurer de 100 à 1000 nm, et constituent la population de VEs la plus abondante dans le sang¹³⁶⁻¹³⁸. Les plaquettes peuvent également relâcher des exosomes mesurant de 50 à 150 nm via l'exocytose de corps multivésiculaires ou de granules alpha^{136,138}. Les mégacaryocytes dont proviennent les plaquettes peuvent également produire des VEs¹³⁶. Les plaquettes peuvent relâcher des VEs en réponse à l'activation par divers agonistes, tels que le collagène, la thrombine, le complexe d'attaque membranaire C5b-9, les lipopolysaccharides, certains complexes immuns et virus, mais également en réponse aux contraintes de cisaillement et lors du déclenchement de la voie de signalisation de la glycoprotéine GPIIb/IIIa^{64,138}. Les mécanismes impliqués dans la formation de vésicules

extracellulaires dérivées de plaquettes font l'objet de beaucoup de recherche et demeurent encore à être élucidés⁶⁴. Il fut démontré que lors de l'activation plaquettaire ou de l'exposition à des contraintes de cisaillement élevées, l'augmentation de calcium intracellulaire altère l'asymétrie de la bicouche lipidique membranaire et mène à la réorganisation du cytosquelette dépendante de la calpaïne, une protéase régulée par le calcium, résultant en la relâche de vésicules extracellulaires^{64,139}. L'observation par microscopie électronique à balayage a démontré que la vésiculation s'effectuait principalement près de l'extrémité des pseudopodes¹⁴⁰. Les plaquettes peuvent également relâcher des VEs en absence d'agoniste plaquettaire via la signalisation de GPIIb/IIIa, durant laquelle se produit une déstabilisation du cytosquelette indépendante de l'activation de la calpaïne¹⁴¹. Les VE^{PLT} peuvent transporter des ARN, ARN messagers, des microARN, ainsi que des mitochondries actives qu'elles peuvent relâcher^{64,142}. La composition en phospholipides des VE^{PLT} est intermédiaire à celle du plasma et des membranes des granules plaquettaires, mais présente des niveaux de cholestérol plus élevés en comparaison aux plaquettes, probablement dû à l'enrichissement en radeaux lipidiques¹⁴³. Les VE^{PLT} expriment plusieurs antigènes normalement exprimés par les plaquettes, incluant du facteur tissulaire, des sélectines, des facteurs de coagulation (V et VIII), des protéines de surface impliquée dans l'adhésion, telles que CD31, GPIb, GPIIb/IIIa et la P-selectin, des cytokines et des chimiokines, telles que (IL)-1 β , CXCL4, CXCL7 et CCL5, et des glycoprotéines^{64,144-146}. Les VE^{PLT} ont été associées à l'augmentation de la perméabilité endothéliale sanguine^{21,147} et pourraient ainsi favoriser la diapédèse de cellules immunes dans la plaque. Elles peuvent également favoriser le recrutement de cellules immunes, comme les leucocytes, au site de lésions en transférant des chimiokines, telles que CCL5, aux cellules endothéliales¹⁴⁸, ou en stimulant leur liaison par l'expression de P-sélectine^{21,149}. Il fut rapporté que les VE^{PLT} peuvent héberger la caspase 3 et causer l'apoptose de macrophages THP-1, et pourraient donc contribuer à l'accumulation de lipides extracellulaires dans la plaque athérosclérotique^{21,150,151}.

1.3.7 Les vésicules extracellulaires dans la lymphe

Les vésicules extracellulaires ont été identifiées dans plusieurs fluides corporels, incluant le plasma et l'urine⁶⁷. Toutefois, leur présence dans la lymphe n'a été reportée que récemment, et leur rôle sur le système lymphatique n'a pas encore été étudié⁴³. La lymphe est constituée de l'exsudat riche en protéines déversé dans les tissus périphériques par la circulation sanguine,

puis absorbé par les capillaires lymphatiques^{34,36}. Son retour dans le sang via la circulation lymphatique constitue une des principales fonctions du système lymphatique, soit l'homéostasie des fluides et l'absorption de cellules et de molécules des tissus périphériques. Considérant ce rôle du système lymphatique, il est sensé que des vésicules extracellulaires circulantes puissent également se retrouver dans la lymphe⁴³. Dans une perspective reliée à l'immunologie, il fut rapporté que les exosomes peuvent être transportés par les vaisseaux lymphatiques des tissus périphériques jusqu'aux ganglions lymphatiques où ils peuvent y résider pendant deux jours; l'internalisation des exosomes par les macrophages et les lymphocytes B joue un rôle important dans ce processus¹⁵². Des exosomes dérivées de mélanome peuvent également voyager par les vaisseaux lymphatiques pour s'accumuler dans les ganglions lymphatiques et y favoriser la métastase tumorale¹⁵³. Des travaux par Milasan *et al.* ont récemment démontré la présence de vésicules extracellulaires d'origines hétérogènes dans la lymphe de souris. L'équipe a su identifier des populations de VEs dérivées de globules rouges et de plaquettes dont le ratio de concentration était analogue à celui retrouvé dans le sang. De plus, leur concentration était plus grande chez des souris LDLR^{-/-} nourries avec une diète riche en cholestérol afin de développer un phénotype athérosclérotique⁴³. En prenant compte de l'implication de la dysfonction lymphatique dans le développement de l'athérosclérose, ces résultats suggèrent que les VEs présentes dans la lymphe pourraient servir de biomarqueurs de la dysfonction lymphatique associée à l'athérosclérose^{31,43}. Sachant que le système lymphatique est impliqué dans l'absorption du cholestérol contenu dans la lésion athérosclérotique³¹, il serait alors logique qu'il puisse également transporter les VEs qui s'y retrouvent, ce qui pourrait expliquer pourquoi la concentration de VEs dans la lymphe en conditions pathologiques est augmentée. Puisque notre laboratoire a démontré que la dysfonction lymphatique associée aux stades précoces du développement de l'athérosclérose touche à priori la capacité des vaisseaux collecteurs à propulser la lymphe, nous croyons que l'accumulation de VEs dans la lymphe serait d'abord due à ce défaut des vaisseaux collecteurs. Ainsi, les VEs seraient d'abord absorbés correctement par les vaisseaux lymphatiques initiaux, mais s'accumuleraient progressivement dans la lymphe en absence d'un mécanisme de propulsion lymphatique efficace. L'accumulation de VEs dans la lésion athérosclérotique avancée²¹ serait causée par un moins bon drainage par les vaisseaux lymphatiques due à la dysfonction lymphatique observée dans ces mêmes conditions^{31,43}. Les causes de ce mauvais fonctionnement des vaisseaux lymphatiques collecteurs lors de l'athérosclérose font présentement l'objet d'études dans notre laboratoire : la capacité de

contraction des vaisseaux lymphatiques de même que la perméabilité de ces derniers seraient des causes potentielles. Puisque la perméabilité endothéliale est augmentée en situation d'inflammation, nous croyons qu'un reflux de sang dans la lymphe pourrait alors se produire au niveau de la veine sous-clavière, là où le contenu de la lymphe se déverse dans la circulation sanguine^{2,43}. Comme les VE^{GR} sont associées avec l'augmentation du stress oxydatif pouvant mener à l'augmentation de la perméabilité endothéliale, il est possible que la présence de VE^{GR} et leur production de ROS dans les lésions athérosclérotiques soient une cause potentielle de cette augmentation de la perméabilité endothéliale^{4,133}. Considérant le rôle préétabli des plaquettes dans le maintien de l'intégrité lymphatique via les interactions entre le récepteur CLEC-2 et la podoplanine⁵⁵, et leur adhésion aux LECs, qui est potentiellement impliquée dans le rétablissement de la fonction lymphatique lors de l'athérosclérose, nous croyons que la présence augmentée de VE^{PLT} dans la lymphe lors de l'athérosclérose soit quant-à-elle impliquée dans le rétablissement de l'intégrité lymphatique (*Apolipoprotein A-1 Modulates Atherosclerosis Through Lymphatic Vessel-Dependant Mechanisms in Mice* en annexe)^{42,43}. Ces évidences suggèrent que l'accumulation massive de VEs dans la paroi des artères lors de l'athérosclérose pourrait s'avérer une cause, mais aussi une conséquence de la mauvaise absorption par les vaisseaux lymphatiques de l'adventice.

1.4 Résumé des connaissances sur le sujet

1. L'athérosclérose est caractérisée par l'accumulation de cholestérol dans la paroi artérielle, ce qui déclenche une réponse immunitaire inadéquate durant laquelle l'activation et l'apoptose cellulaire joue un rôle crucial, résultant souvent dans la formation de vésicules submicroniques nommées vésicules extracellulaires (VEs).
2. Plusieurs types cellulaires, tels que les cellules endothéliales, les plaquettes et les globules rouges, peuvent relâcher des VEs au sein même des lésions athérosclérotiques.
3. Certains sous-types de VEs sont associés à une exacerbation de la dysfonction endothéliale et à la progression subséquente de l'athérosclérose.
4. Le cholestérol de la plaque est mobilisé hors de la paroi artérielle préférentiellement par les vaisseaux lymphatiques situés dans l'adventice de la paroi artérielle afin de quitter la lésion athérosclérotique lors du transport inverse du cholestérol.

5. Des vésicules extracellulaires d'origines hétérogènes et analogues à leurs ratios de concentration dans le sang et la lésion athérosclérotique sont présentes dans la lymphe.
6. La présence de vésicules extracellulaires dans la lymphe est plus abondante chez des souris athérosclérotiques.

1.5 Hypothèse et objectifs de l'étude

Considérant les informations mentionnées précédemment, nous émettons l'hypothèse que, dépendamment de leurs origines, **l'accumulation massive de vésicules extracellulaires dans la paroi des artères peut être simultanément une cause et une conséquence de la mauvaise absorption par les vaisseaux lymphatiques de l'adventice lors du développement de l'athérosclérose (Figure 1.1).**

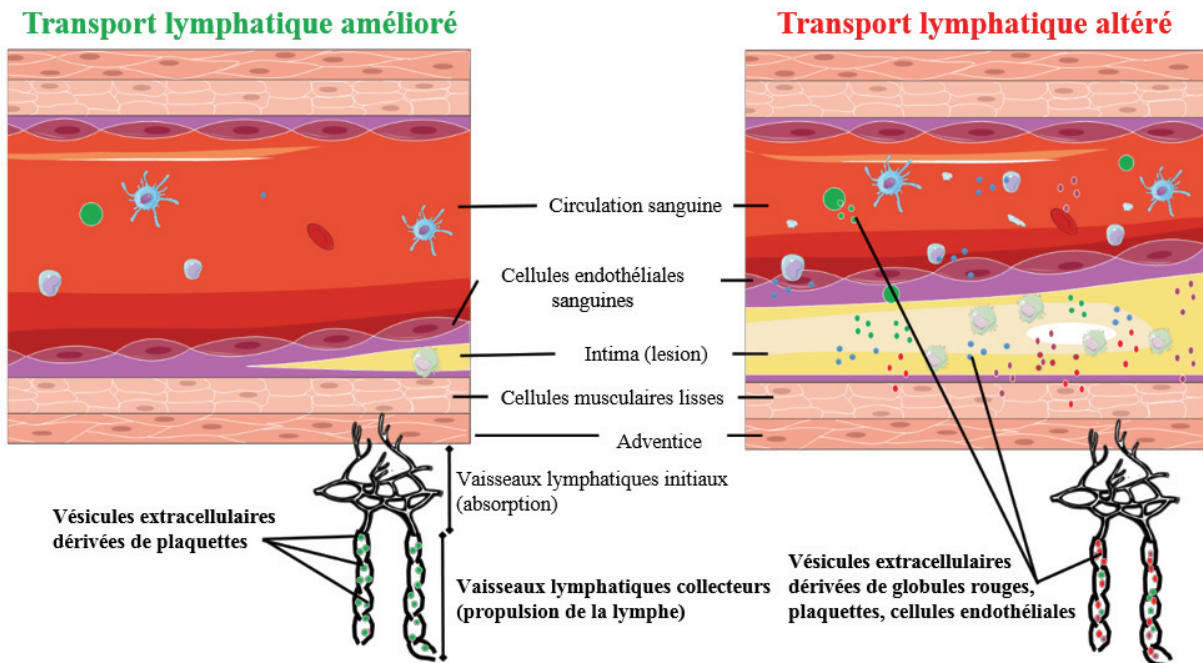


Figure 1.2 Hypothèse de recherche du présent mémoire. Les vésicules extracellulaires dérivées de plaquettes seraient impliquées dans le maintien de l'intégrité des vaisseaux lymphatiques. En conditions pathologiques, l'absorption des vésicules extracellulaires contenues dans la lésion athérosclérotique et leur accumulation dans la lymphe contribuerait à accentuer la dysfonction lymphatique observée dans ces mêmes conditions, ces effets seraient notamment causés par les vésicules extracellulaires dérivées de globules rouges.

Le rôle des vésicules extracellulaires dans l'intégrité du système lymphatique demeure inconnu. Nous nous sommes donné comme objectif global de poursuivre la recherche sur l'implication des vésicules extracellulaires dans la dysfonction lymphatique reliée à l'athérosclérose en investiguant si et comment les VEs dérivées de globules rouges et de plaquettes peuvent affecter l'intégrité des cellules endothéliales lymphatiques *in vitro*.

Afin de vérifier notre hypothèse, mon projet de maîtrise s'est développé en plusieurs étapes :

- Produire et quantifier des vésicules extracellulaires dérivées de globules rouges et dérivées de plaquettes à partir de cellules prélevées chez des volontaires sains.
- Mesurer l'adhésion et l'internalisation des VEs dérivées de globules rouges et de plaquettes par des cellules endothéliales lymphatiques *in vitro*.
- Évaluer les effets des VEs dérivées de globules rouges et de plaquettes sur l'intégrité des cellules endothéliales lymphatique *in vitro*. Pour ce faire, des tests ont été mis au point afin d'évaluer les effets d'un traitement de l'endothélium lymphatique avec des VEs dérivées de globules rouges et/ou de plaquettes sur les fonctions suivantes :
 1. La viabilité
 2. La prolifération
 3. Le cycle cellulaire
 4. La migration
 5. La production d'espèces réactives d'oxygène
 6. La mort cellulaire par apoptose ou par nécrose
 7. La perméabilité

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

2 Matériel et méthodes

2.1 Prélèvements sanguins chez les volontaires sains

Dans un premier temps, des sujets de 18 ans et plus, ne souffrant pas de maladie inflammatoire et/ou cardiovasculaire, et n'ayant pas consommé de médicaments antiplaquettaires ou antiinflammatoires pouvant affecter les cellules sanguines (Aspirine, Tylenol, Motrin, Advil) ainsi que toute forme d'antihistaminique (Bénadryl, Sudafed, Claritin) dans les 20 jours précédant le prélèvement sanguin, ont été recrutés pour participer à l'étude et ont fourni leur consentement éclairé sur une base volontaire. Ce protocole avait préalablement été approuvé par le comité d'éthique à la recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal. Le sang de ces volontaires sains a ensuite été prélevé dans des tubes contenant une solution anticoagulante à base d'acide acétique, citrate de sodium et dextrose, appelée ACD (*acid citrate dextrose*), puis centrifugé à 280 g pendant 10 minutes (température pièce, sans frein), dans le but de séparer les globules rouges (ou érythrocytes) des autres composantes sanguines, telles que les leucocytes, les plaquettes et le plasma¹⁵⁴.

2.2 Production de vésicules extracellulaires à partir de globules rouges sanguines

Dans le but de produire des VEs dérivées d'érythrocytes, la fraction de sang contenant les globules rouges a été soumise à un choc osmotique en incubant 2 ml de cette fraction dans 500 ml d'eau distillée et déionisée pendant 10 minutes à température pièce (Figure 2.1, A). La réaction fut arrêtée par l'ajout de 55 ml de PBS 10x pour rétablir l'osmolarité. La solution de PBS 1x contenant les VEs a été aliquotée et conservée à -80°C jusqu'à utilisation¹⁵⁴.

2.3 Production de vésicules extracellulaires dérivées de plaquettes circulantes

Dans le but de produire des VE^{PLT}, de l'ACD (Dextrose 4,9mg/ml, citrate de sodium 4,4 mg/ml, acide citrique anhydre 1,46 mg/ml) et un chélateur de calcium, l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA, 2mM) ont été ajoutés à la fraction sanguine contenant le plasma riche en plaquettes (PRP) dans le but de prévenir l'agrégation plaquettaire. Le PRP a

ensuite été centrifugé à 400 g pendant 5 minutes (température pièce), et le surnageant contenant les plaquettes a été centrifugé à 1300 g pendant 5 minutes (température pièce). Les plaquettes ont été resuspendues dans 2 ml de tampon Tyrode pH 6,5, une solution physiologique normalement utilisée pour prévenir l'activation plaquettaire, puis comptées et resuspendues à 100×10^6 plaquettes/ml dans du tampon Tyrode pH 7,4 supplémenté en CaCl_2 (5 mM) pour stimuler l'activation. Les plaquettes ont ensuite été activées avec de la thrombine (0,5 U/ml), un agoniste plaquettaire qui agit en se liant aux récepteurs activés par la protéinase (PAR), pendant deux heures à 37°C, puis l'activation a été arrêtée en y ajoutant 20 mM d'EDTA. La solution a été centrifugée à 2000 g pendant 10 minutes à deux reprises afin d'éliminer les plaquettes restantes. Le surnageant contenant les VE^{PLT} a été récolté, puis ultracentrifugé pendant 90 minutes à 18 000 g (18°C) dans des seaux oscillants. Le culot contenant les VE^{PLT} a été resuspendu dans du tampon Tyrode pH 7,4 supplémenté en CaCl_2 (5mM) et conservées à -80°C jusqu'à utilisation (Figure 2.1, B)¹⁵⁴.

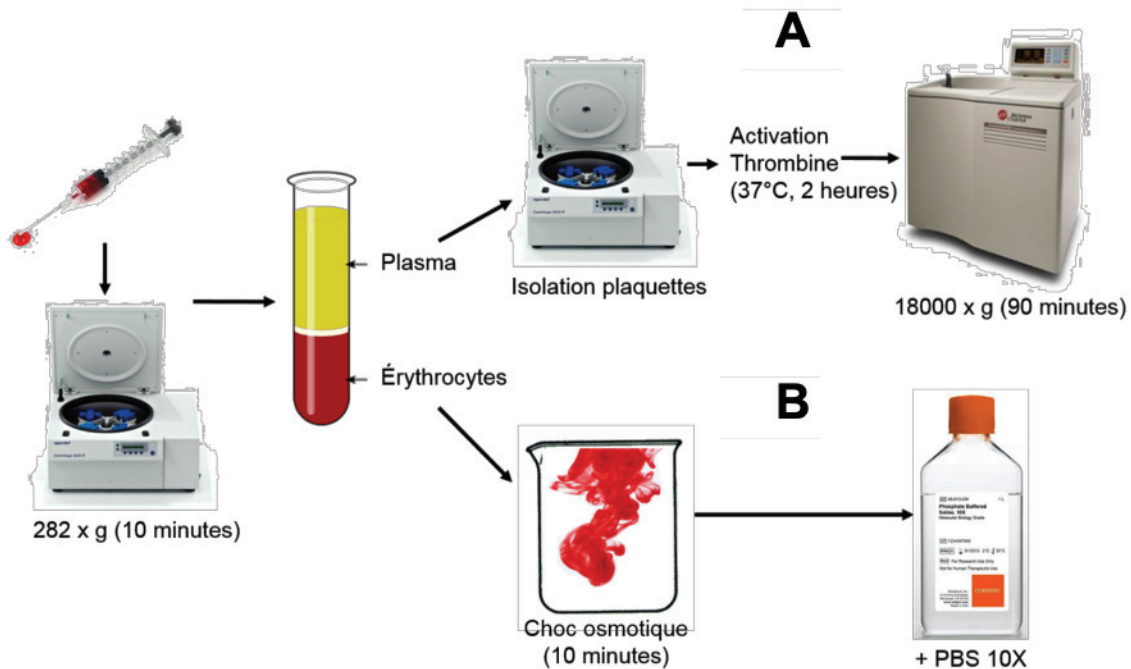


Figure 2.1 : Production de vésicules extracellulaires dérivées de plaquettes et de globules rouges circulants

2.4 Détermination de la taille des vésicules extracellulaires dérivées de cellules sanguines circulantes

La taille des vésicules ainsi générées a été évaluée grâce à une analyse du suivi individuel de particules (*Nanoparticle Tracking Analysis*, NTA), ce test exploite les propriétés de la lumière diffusée et du mouvement Brownien pour calculer la distribution de taille des particules en suspension dans un liquide donné¹⁵⁵. Les VEs ont été diluées dans du PBS (1/10), puis 3 vidéos de 60 secondes ont été utilisées pour déterminer le diamètre des VEs. Un cytomètre en flux à haute sensibilité BD FACSCelesta équipé d'un filtre 405/10 sur le laser violet en substitution au filtre de 405 nm dans le but d'améliorer la sensibilité et la précision de l'appareil, a aussi été utilisé. L'estimation de la taille des VEs a été déterminée à l'aide de billes de silice de tailles prédéterminées de 0,16 µm, 0,20 µm, 0,24 µm et 0,5 µm (Megamix-Plus SSC, BioCytex).

2.5 Quantification des vésicules extracellulaires par cytométrie en flux

Les VE^{GR} et VE^{PLT} ont été quantifiées par cytométrie en flux BD FACSCelesta grâce à l'ajout d'un nombre connu de microsphères de polystyrène de 3 µm de diamètre à chaque échantillon (MP-Count Beads, BioCytex).

2.6 Identification des sous-types de vésicules extracellulaires par cytométrie en flux

Dans le but d'identifier le phénotype des VEs préalablement isolées, les VE^{PLT} et VE^{GR} ont été marquées pendant 30 minutes à 37°C avec des anticorps anti-CD62p (ou p-sélectine, Biolegend) marquant les plaquettes activées et anti-CD235a (BD Biosciences) marquant les globules rouges, respectivement. Le marquage a été effectué dans un tampon contenant de l'HEPES (10 mM), du NaCl (140 mM) et du CaCl₂ (2,5 mM), aussi appelé tampon annexin V, et filtré à l'aide d'un filtre 0,2 µm. Les VEs ont également été marquées avec le marqueur d'estérase active CFSE (*carboxyfluorescein succinimidyl ester*, eBioscience, 5 µM), ajouté durant les 15 dernières minutes de marquage. Une fois dans la cellule, le groupement acétate du CFSE est clivé par les estérases pour générer une coloration fluorescente pénétrant la membrane cellulaire. Un détergent, le Triton X-100 (0,05%), a été ajouté aux tubes contrôles afin de dissoudre les bicouches lipidiques et confirmer l'observation de vésicules de provenance cellulaire.

2.7 Culture cellulaire

Des cellules microvasculaires endothéliales lymphatiques dermales adultes primaires (HMVEC-dLyAd) (Lonza) ont été cultivées dans du milieu de culture pour cellules endothéliales (EGM-2, Lonza) (MV2, PromoCell). Les cellules ont été conditionnées dans du milieu de culture dépourvu de VEs pendant au moins 4 heures avant les traitements. Les cellules furent traitées avec 2×10^6 VE^{GR}/ml ou 1×10^6 VE^{PLT}/ml, des concentrations physiologiques observées chez la souris⁴³. Les véhicules, soit le PBS et le tampon Tyrode, ont été utilisés comme contrôle pour les traitements avec VE^{GR} et VE^{PLT}, respectivement. Les cellules ont été utilisées jusqu'au septième passage. Afin de générer du milieu dépourvu de VEs, le FBS a été centrifugé à 50 000 g pendant 15 minutes à 4°C, puis centrifugé à 200 000 g pendant 18 heures à 4°C avant d'être filtré avec un filtre 0,22 µm et ajouté au milieu non reconstitué.

2.8 Mesure de l'adhésion des vésicules extracellulaires sur les LECs

La microscopie par immunofluorescence et la cytométrie en flux ont été utilisées pour évaluer l'adhésion des VE^{GR} et des VE^{PLT} aux LECs *in vitro*. Dans un premier temps, le *Cellvue Claret Far Red Fluorescent Cell Linker Kits* a été utilisé pour marquer les VEs pour la microscopie selon les recommandations du manufacturier¹⁵⁶. Cette technique permet de marquer la membrane en incorporant un colorant fluorescent dans sa portion membranaire. Les VEs ainsi marquées ont ensuite été récoltées par ultracentrifugation à 18 000 g durant 90 minutes à 18°C ou à 100 000 g durant 90 minutes à 4°C pour les VE^{PLT} ou VE^{GR}, respectivement. Des concentrations physiologiques⁴³ de VE^{GR} (2×10^6 /ml) et de VE^{PLT} (1×10^6 /ml) respectivement, ont été ajoutés à une monocouche de HMVECs confluite à 100% pour des périodes de 1, 2, 4, 8 et 16 heures. Les véhicules, soit le PBS et le tampon Tyrode, ont été utilisés comme contrôle pour les traitements avec VE^{GR} et VE^{PLT}, respectivement. Suivant la coincubation, les cellules ont été lavées avec du milieu de culture sans phénol, fixées avec du paraformaldéhyde 1% durant 15 minutes, puis marquées avec le DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole), une molécule fluorescente qui se lie à l'ADN pour ainsi mettre en évidence les noyaux cellulaires. Trois images aléatoires par pétri ont été prises par microscopie à fluorescence avec un microscope confocal LSM 710 (Zeiss) équipé avec un objectif 963/1.4 oil dic. Les images ont été analysées à l'aide du logiciel Image-J et l'aire occupée par les VEs a été normalisée par rapport au nombre de

cellules par champs. Pour l'analyse par cytométrie en flux (BD FACSCelesta), les VE^{GR} et VE^{PLT} ont été marquées au CFSE, tel que décrit précédemment dans la section *Identification des sous-types de vésicules extracellulaires par cytométrie en flux*, puis mises en culture avec des HMVECs confluentes à 100% pour des périodes de 1, 2, 4, 8 et 16 heures. Suivant la coincubation, le surnageant a été récolté, et les cellules ont été détachées avec de la trypsine, qui fut ensuite neutralisée par l'ajout de trypsin neutralizing solution (TNS). Les cellules et les vésicules contenues dans le surnageant ont été marquées avec des anticorps ciblant le VEGFR3, le CD235a et le CD62p dans le but d'identifier les cellules ou VEs de provenance de cellules endothéliales lymphatiques, d'érythrocytes, ou de plaquettes, respectivement. Les analyses ont été effectuées au cytomètre en flux.

2.9 Mesure de la viabilité

Le test du MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide, Trevigen) a été utilisé pour évaluer l'effet des VE^{GR} ou des VE^{PLT} sur la viabilité des LECs. Ce test vise à mesurer la conversion du sel de tétrazolium en formazan par les enzymes mitochondriales. Les cellules ont été cultivées ($7,5 \times 10^4$ /puit) dans des plaques de 96 puits. Suivant les traitements dans un volume total de 100 μ l, 10 μ l de sel de tétrazolium a été ajouté et les cellules ont été incubées à l'obscurité à 37°C. Après 4 heures, 200 μ l de diméthylsulfoxyde (DMSO) a été ajouté dans le but de dissoudre les cristaux de formazan et les cellules ont été incubées à température pièce pendant la nuit. L'absorbance à 570 nm a ensuite été mesurée à l'aide d'un lecteur de plaque (Synergy 2).

2.10 Mesure de la prolifération

Les LECs ont été cultivées ($3,8 \times 10^4$ /puit) dans des plaques de 12 puits jusqu'à confluence de 80%, puis traitées avec les VEs. Suivant les traitements, les cellules ont été fixées avec du PFA 2%, marquées avec un anticorps primaire anti-Ki-67 (Abcam), un antigène présent sur une protéine nucléaire exprimée par les cellules en prolifération, puis marquées avec un anticorps secondaire Alexa Fluor anti-488 (Jackson) et DAPI. Elles ont ensuite été analysées par microscopie par immunofluorescence avec un microscope LSM 710 (Zeiss). Trois images aléatoires ont été prises par puits. Les images ont été analysées à l'aide d'Image-J et le pourcentage de cellules positives en Ki-67 a été utilisé pour évaluer la prolifération.

2.11 Analyse du cycle cellulaire

Les LECs ont été cultivées ($9,6 \times 10^4$ /puit) dans des plaques de 6 puits jusqu'à confluence de 80%, puis traitées. Le DMSO (5%) a été utilisé comme contrôle négatif. Les cellules ont ensuite été passées, puis fixées et conservées dans de l'éthanol 70% froid à 4°C jusqu'à utilisation. Le jour de l'analyse, les cellules ont été lavées dans du PBS froid, puis marquées à l'iodure de propidium (0,05mg/ml) (Biotium) dans un tampon (0,1% sodium citrate, 0,1% Triton X-100). Les cellules ont ensuite été analysées par cytométrie en flux (BD Celesta), et les phases du cycle cellulaire ont été établies par l'intensité de signal de l'iodure de propidium.

2.12 Mesure de la migration

Les LECs ont été cultivées ($7,6 \times 10^4$ /puit) dans des plaques de 12 puits jusqu'à confluence de 100%. Un trait a été appliqué à l'aide d'un embout de pipette 1 ml transversalement au centre de la monocouche de cellules, dans le but de libérer cet espace de toutes cellules. Les cellules encore adhérentes ont ensuite été lavées avec du PBS, puis traitées avec des VEs dans un milieu supplémenté en FGF (50 ng/ml) (R&D System) et en VEGF-C (100 ng/ml) (R&D System) tel que rapporté dans la littérature¹⁵⁷. Des photos de la blessure ont été prises avant les traitements et suivant 4 et 24 heures de traitement. La migration a été évaluée par le pourcentage de la blessure initiale recouverte par des HMVECs après les traitements de durée donnée. Les images ont été analysées à l'aide d'Image-J.

2.13 Mesure de la production d'espèces réactives d'oxygène intracellulaires

Pour mesurer la production de ROS, les cellules ont été cultivées ($2,5 \times 10^4$ /puit) dans des plaques de 96 puits, puis traitées. La pyocyanine (10 μ M) (Sigma) a été utilisée comme contrôle positif de production de ROS. Elles ont ensuite été marquées avec le CMH2DCF-DA (2'-7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, Invitrogen) pendant 30 minutes à 37°C¹⁵⁸. Le dosage de la production de ROS a ensuite été effectué dans du milieu de culture frais sans CMH2DCF-DA. L'intensité de fluorescence a été mesurée à l'aide d'un lecteur de plaque Synergy 2 à chaque 1,13 minute, durant une heure. La mesure de la production de ROS intracellulaire a été effectuée sur des HMVECs en présence de VEs. Elle a également été effectuée sur des HMVECs ayant coïncubé avec des VEs pendant 2, 4 ou 24 heures, suivant leur lavage avec du

milieu non traité pour éliminer les VEs non adhérentes ou intégrées. Les données ont été normalisées par rapport aux HMVEC traitées avec le véhicule contrôle. La même procédure a été utilisée pour mesurer la production de ROS par les VE^{PLT} (1×10^6 VEs/ml) et par les VE^{GR} (2×10^6 VEs/ml) dans du PBS, avec ou sans superoxyde dismutase (100 U/ml) (Alfa Aesar), une enzyme antioxydante utilisée pour valider la présence de ROS. Les données ont été normalisées par rapport au véhicule contrôle dilué et marqué avec du CMH2DCF-DA dans du PBS.

2.14 Évaluation de l'apoptose et de la nécrose

L'apoptose a été mesurée et confirmée de plusieurs façons. Dans un premier temps, l'activation de la caspase 3, une protéase dont l'activation est impliquée dans l'initiation de l'apoptose cellulaire, a été mesurée dans des HMVECs cultivées dans des plaques de 12 puits ($3,8 \times 10^4$ /puits) jusqu'à confluence de 80%. La camptothécine (2 μ M) (G-Biosciences) a été utilisée comme contrôle positif. Les cellules ont été passées et lavées dans du PBS (2% FBS), puis fixées et perméabilisées à l'aide du Transcription Factor Buffer Set (BD Pharmigen). Les cellules ont été marquées avec un anticorps anti-caspase 3 activée (40 μ l/ml) (BD Biosciences) pendant 20 minutes à température pièce, puis lavées dans du tampon de perméabilisation et resuspendues dans du tampon PBS (2% FBS). Les cellules ont ensuite été analysées par cytométrie en flux (BD, Celesta) et l'activation de la caspase 3 a été évaluée par le pourcentage de cellules marquées. Dans un deuxième temps, l'apoptose a aussi été mesurée en évaluant l'externalisation de la phosphatidylsérine des LECs suite au traitement avec les VEs. Pour ce faire, les LECs ont été cultivées ($3,8 \times 10^4$ /puits) dans des plaques de 12 puits jusqu'à confluence de 80%, puis traitées. La dexaméthasone (10 μ M) (G-Biosciences) a été utilisée comme contrôle positif. Les cellules ont ensuite été passées, lavées dans du tampon d'annexin V, puis marquées avec l'iodure de propidium (2,5 μ g/ml) et un anticorps anti-annexin V (20 μ l/ml) (BD Biosciences), reconnaissant la phosphatidylsérine. Les cellules ont été analysées par cytométrie en flux (BD, Celesta). Les cellules positives en iodure de propidium, mais négatives en annexin V, ont été considérées comme nécrotiques. Les cellules positives en annexin V ont été considérées comme apoptotiques.

2.16 Évaluation de la perméabilité endothéliale

Les LECs ont été cultivées ($5,0 \times 10^5$ /inserts) sur des inserts de culture cellulaire *Transwell* (pores de $0,4 \mu\text{m}$) pour plaques de 24 puits jusqu'à confluence de 100%, puis traitées avec les VEs. Le TNF-alpha (10 ng/ml) a été utilisé comme contrôle positif afin d'augmenter la perméabilité endothéliale. Lors de la culture et lors des traitements, le milieu de culture ou le milieu traité ont été ajouté dans l'insert et dans le compartiment inférieur afin que les deux côtés de la cellule soit exposés au milieu donné. La perméabilité, soit la capacité d'une large molécule à traverser la monocouche de cellules, a été ensuite évaluée en ajoutant l'albumine conjugué à l'Alexa Fluor 488 (Invitrogen) (50 ng/ml) diluée dans du milieu de culture sans phénol dans l'insert durant 20 minutes à température pièce, puis dosée dans le compartiment inférieur avec un lecteur de plaque Synergy 2.

2.17 Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Prism. Le test de statistique non paramétrique Mann Whitney non pairé a été utilisé pour tous les tests, à l'exception du test de perméabilité, dans lequel le test de Student non pairé fut utilisé. La valeur $P < 0,05$ a été considéré comme significative.

Chapitre 3 : Résultats

3. Résultats

3.1 : Production efficace de vésicules extracellulaires dérivées de globules rouges ou de plaquettes à partir de sang humain

Dans le but de caractériser leurs effets sur une monocouche de cellules endothéliales lymphatiques en culture, nous avons d'abord produits des populations de VE^{GR} et de VE^{PLT} à partir de globules rouges et de plaquettes, respectivement, isolées du sang de volontaires sains, tel que décrit dans la section *Matériel et méthodes* (Figure 2.1). Afin de confirmer l'obtention de populations purifiées de vésicules d'origine cellulaire, nous avons quantifié et caractérisé les VEs produites à l'aide d'un cytomètre en flux spécialisé dans l'analyse de particules aussi petites que 100 nm (FACS Celesta). Nous avons d'abord fait l'acquisition au FACS des microbilles de silice de dimensions fixes allant de 160 à 500 um afin d'établir la taille des VEs produites et des microbilles de polystyrène de 3 um de concentration connue afin d'en estimer la concentration (Figure 3.1 A). Nous avons doublement marqué les populations de VEs avec le marqueur d'estérase active CFSE ainsi qu'avec un marqueur de surface spécifique, soit CD235a ou CD62p (P-sélectine) pour les VE^{GR} et VE^{PLT} , respectivement (Figure 3.1 B-C). Nous avons également utilisé le Triton X-100 pour dissoudre les membranes lipidiques et confirmer l'obtention de vésicules de provenance cellulaire (Figure 3.1 D-E). Les VE^{GR} produites (Figure 3.1 B) mesuraient entre 100 et 300 nm et semblaient plus petites que les VE^{PLT} dont la taille variait beaucoup plus et atteignaient des valeurs allant de 100 à 700 nm (Figure 3.1 C). Les échantillons avaient pratiquement tous des concentrations de 10^7 VEs/ml (Tableau supplémentaire 1). Afin de confirmer les observations obtenues par cytométrie en flux, nous avons également analysé certains échantillons de VEs produites par NTA (Figure 3.1 F-G). Les tailles observées par NTA correspondaient à celle observée par cytométrie en flux. Les échantillons de VE^{PLT} contenaient également plusieurs sous-populations de VEs de taille différentes (Figure 3.1 G). Contrairement aux VE^{PLT} produites *in vitro*, l'analyse par NTA d'un échantillon de VEs isolées du sang de patient a démontré la présence de VE^{PLT} dont la taille variait beaucoup moins et demeurerait majoritairement inférieure à 300 nm (Figure supplémentaire 1).

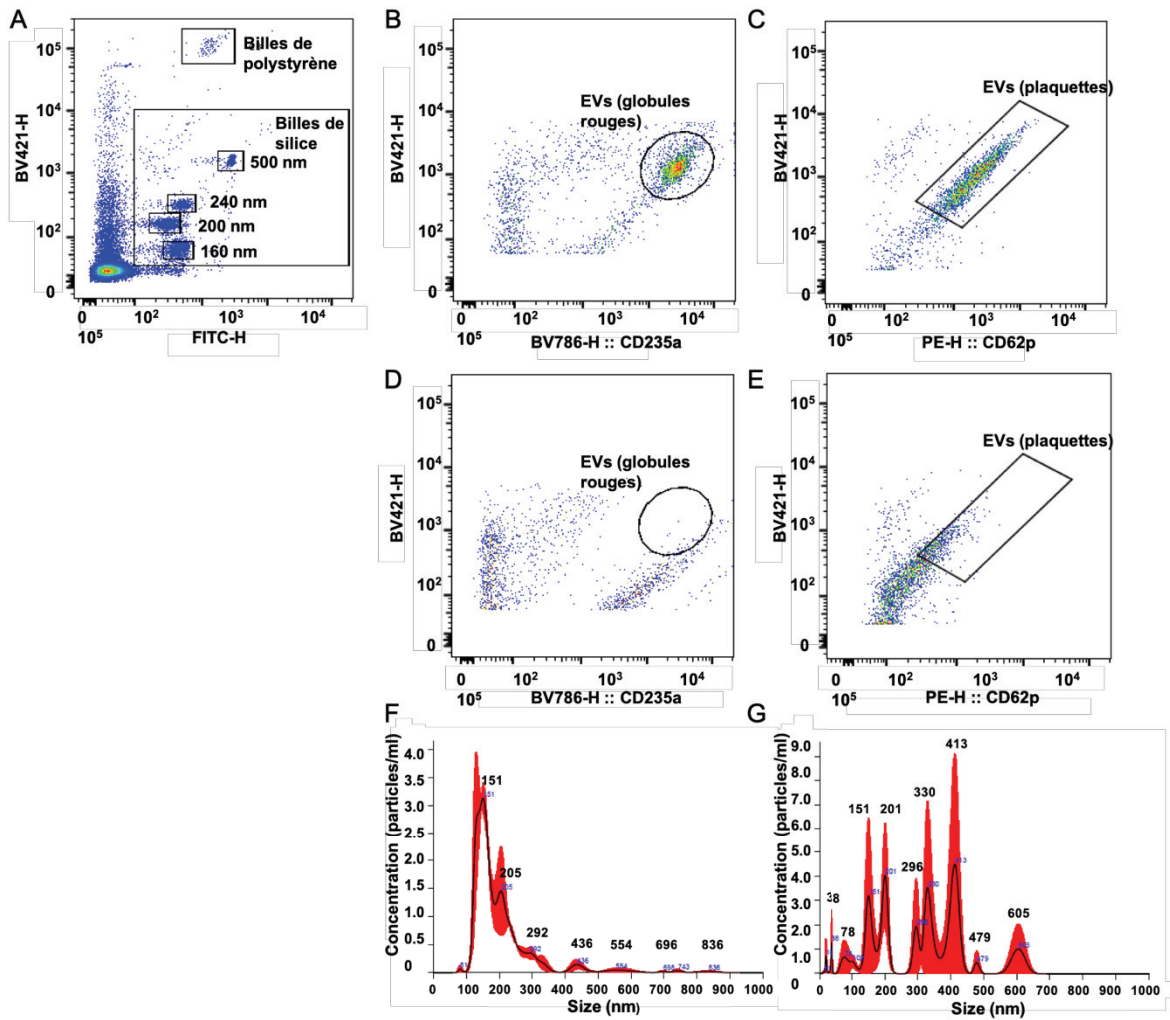


Figure 3.1. Quantification et caractérisation des échantillons de VE dérivées de globules rouges et de plaquettes. Les VE^{GR} et VE^{PLT} ont été quantifiées et caractérisées par cytométrie en flux (BD Celesta). (A) Des billes de polystyrène de 3 μm (encadré du haut) ont été utilisées pour estimer la concentration des VEs, et des microbilles de silice de taille de 160, 200, 240 et 500 nm (encadré du bas) ont été utilisées pour établir la taille des VEs dans chaque échantillon. Les VEs ont été identifiées comme positives au CFSE ainsi qu'au CD235a ou au CD62p pour (B) les VE^{GR} ou (C) les VE^{PLT} de plaquettes, respectivement. Le Triton X-100 (0,05%) a été utilisé pour dissoudre les membranes lipidiques et confirmer l'obtention (D) de VE^{GR} ou (E) de VE^{PLT}. Certains échantillons (F) de VE^{GR} ou (G) de VE^{PLT} ont également été analysés par nanoparticle tracking analysis pour en estimer la taille.

3.2 : Les cinétiques d'adhésion et d'internalisation des vésicules extracellulaires dérivées de globules rouges diffèrent de celles des vésicules extracellulaires dérivées de plaquettes *in vitro*

Afin de vérifier si nos deux populations de VEs produites peuvent adhérer sur un endothélium lymphatique et être internalisées par les cellules endothéliales, nous avons effectué une cinétique d'adhésion des VE^{GR} ou VE^{PLT} sur des HMVECs cultivées *in vitro*. Nous avons marqué les VEs à l'aide du marqueur membranaire à base d'éthanol Cellvue Claret, puis les avons coincubé avec des HMVECs pour des durées allant de une heure à 16 heures avant d'en faire l'analyse par immunofluorescence (Figure 3.2 A-D). Nous avons pu observer que les VE^{GR} ont adhéré progressivement aux HMVECs pour être internalisées, et semblaient s'accumuler autour du noyau jusqu'à 16 heures (Figure 3.2 A-B). Les VE^{PLT} ont adhéré progressivement aux HMVECs jusqu'à 4 heures, où elles s'accumulaient dans le cytoplasme et également autour du noyau (Figure 3.2 D). Par contre, leur présence dans la cellule chutait drastiquement par la suite jusqu'à 16 heures (Figure 3.2 D-E). Contrairement aux VE^{GR}, ces dernières semblaient parfois s'accumuler et former des réseaux sur les jonctions entre les cellules de la monocouche. Nous avons ensuite confirmé cette cinétique d'adhésion par cytométrie en flux. Nous avons alors effectué la même cinétique qu'en immunofluorescence, mais avons détaché les HMVECs avec de la trypsine, puis marqué les cellules pour l'analyse au cytomètre en flux. Nous avons alors pu observer une accumulation progressive de VE^{GR} à la surface des HMVECs jusqu'à 16 heures (Figure 3.2 C) ainsi qu'une accumulation progressive de VE^{PLT} à la surface des HMVECs jusqu'à 4 heures suivi d'une diminution de cette accumulation jusqu'à 16 heures (Figure 3.2 F), confirmant les observations effectuées par immunofluorescence. Ces résultats confirment que les VE^{GR} et VE^{PLT} semblent adhérer et être intégrées de manière et à une vitesse différente sur les HMVECs. La dégradation des VE^{GR} demeurent à être observée, potentiellement suivant des temps d'incubations supérieurs à 16 heures.

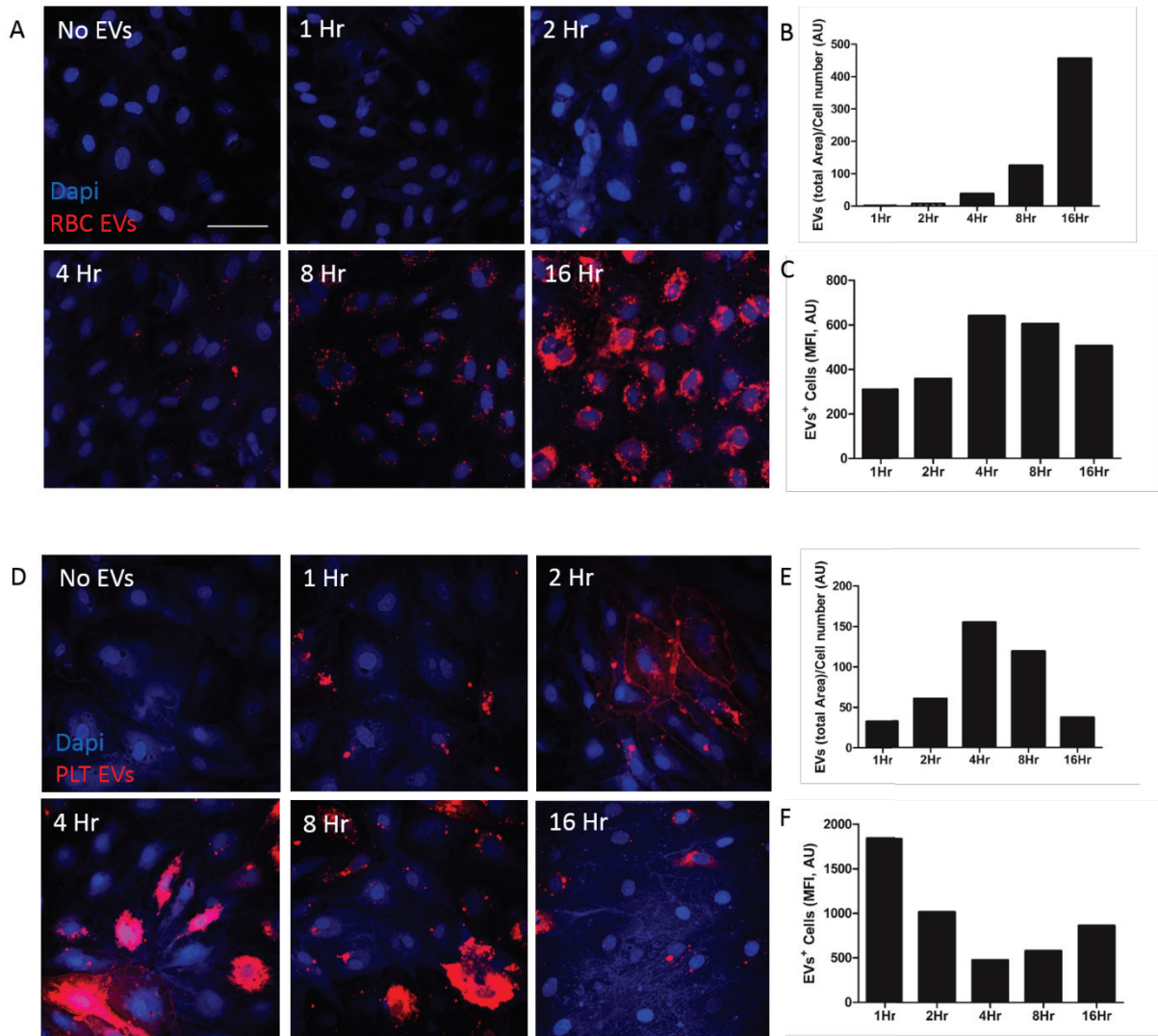


Figure 3.2. Adhésion et internalisation des VEs dérivées de globules rouges et de plaquettes sur les HMVECs. Images représentatives de la cinétique d'adhésion/internalisation (A) des VE^{GR} ou (D) des VE^{PLT} sur des HMVECs effectué par microscopie par immunofluorescence (Bleu : Dapi; Rouge : VEs). Quantification de l'aire totale occupée par (B) les VE^{GR} ou (E) les VE^{PLT} normalisée par le nombre de cellules observés en (A) et (D) respectivement. Cinétique d'adhésion/internalisation (C) des VE^{GR} ou (F) des VE^{PLT} sur HMVECs analysées par cytométrie en flux (BD, Celesta) et exprimée par moyenne d'intensité de fluorescence. Échelle = 10 μ m; N= 1-2 par groupe.

3.3 : Les vésicules extracellulaires dérivées de plaquettes causent la diminution de la prolifération des HMVECs

Pour déterminer si les VEs ont un effet sur la viabilité et le métabolisme des cellules endothéliales lymphatiques, nous avons utilisé le test MTT permettant la mesure du métabolisme cellulaire par la quantification de la réduction du sel de tétrazolium (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) en formazan par les enzymes mitochondriales (Figure 3.3 A-B). Le traitement des HMVECs avec des VE^{GR} n'a pas eu d'effet significatif sur la viabilité cellulaire suivant 4 heures (Figure supplémentaire 2) et 24 heures (Figure 3.3 A) en comparaison aux HMVECs traitées avec le contrôle. Contrairement aux VE^{GR}, le traitement des HMVECs avec des VE^{PLT} a causé une diminution de la viabilité cellulaire suivant 4 heures (Figure supplémentaire 2) et 24 heures en comparaison aux HMVECs traitées avec le contrôle. Afin de déterminer si cette diminution de la viabilité se présentait de concert avec une diminution de la prolifération cellulaire, nous avons marqués les HMVECs traitées avec un anticorps détectant l'antigène ki-67, un marqueur nucléaire de prolifération (Figure 3.3 C). Le traitement des HMVECs avec des VE^{GR} n'a pas eu d'effet significatif sur la prolifération suivant 24 heures en comparaison aux HMVECs traitées avec le contrôle (Figure 3.3 D), alors que le traitement des HMVECs avec des VE^{PLT} a causé une diminution significative de la prolifération suivant 24 heures en comparaison aux HMVECs traitées avec le contrôle (Figure 3.3 E). Dans le but d'établir si la diminution de la viabilité est également causée par une augmentation de la mort cellulaire, et sur quelle(s) phase(s) du cycle cellulaire se traduisait l'effet des VE^{GR} et VE^{PLT} sur la prolifération, nous avons marqué l'ADN des HMVECs traitées avec l'iodure de propidium et avons analysé le cycle cellulaire par cytométrie en flux (Figure 3.3 F). Le traitement des HMVECs avec des VE^{GR} n'a causé aucune variation significative dans aucune des phases du cycle cellulaire des HMVECs suivant 4 heures (Figure supplémentaire 2) et 24 heures (Figure 3.3 G) en comparaison aux HMVECs traitées avec le contrôle, alors que le traitement des HMVECs avec des VE^{PLT} a causé une diminution significative du nombre de cellules en phase S suivant 24 heures (Figure 3.3 H). Aucun des deux sous-types de VEs n'ont causé de variations significatives de l'apoptose cellulaire (Figure 3.3 G-H). Ces résultats suggèrent que les VE^{GR} en concentration physiologique n'altèrent pas le déroulement du cycle cellulaire des HMVECs *in vitro*, alors que les VE^{PLT} en concentration physiologique causeraient une diminution de la prolifération des HMVECs se traduisant potentiellement par l'inhibition de la répllication de leur ADN lors de la phase S *in vitro*.

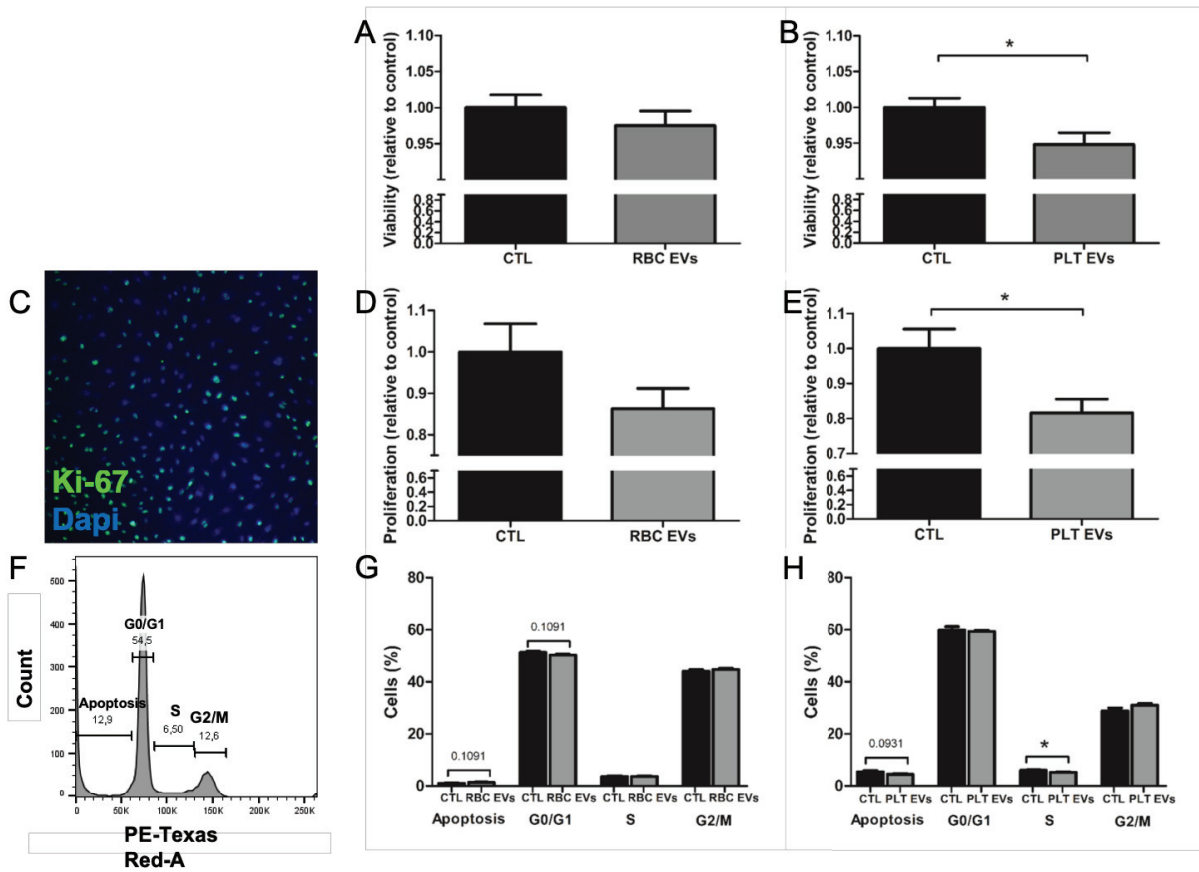


Figure 3.3. Effets des VE dérivées de globules rouges et de plaquettes sur la viabilité, la prolifération et le cycle cellulaire des HMVECs. Effets (A) des VE^{GR} ou (B) des VE^{PLT} sur la viabilité des HMVECs suivant 24 heures. (C) Image représentative d'un marquage au Ki-67 en microscopie par immunofluorescence (Bleu : Dapi; Vert : Ki-67). Quantification de la prolifération des HMVECs suite au traitement de 24 heures avec (D) des VE^{GR} ou (E) des VE^{PLT} . (F) Tracé représentatif du cycle cellulaire des HMVECs tel que détecté par cytométrie en flux (BD, Celesta). Effets (G) des VE^{GR} ou (H) des VE^{PLT} sur le cycle cellulaire des HMVECs suivant 24 heures. N= 6-7 par groupe; * $p < 0,05$ et ** $< 0,01$. Test de Mann Whitney non païré.

3.4 : Les vésicules extracellulaires dérivées de globules rouges et de plaquettes n'ont pas d'effet sur la capacité de migration des HMVECs

Tout comme la prolifération, la migration des LECs est primordiale pour la formation de nouveaux vaisseaux lymphatiques lors de la lymphangiogénèse. Nous avons voulu évaluer si les VEs avaient des effets sur la migration des HMVECs. Nous avons effectué un test de cicatrisation et régénération (Figure 3.4 A) durant lequel la capacité des HMVECs à migrer pour recouvrir la blessure volontaire fut évaluée en présence de VE^{GR} ou VE^{PLT} . Étonnamment, malgré la diminution de la prolifération des HMVECs causée par les VE^{PLT} , aucun des deux sous-types de VEs n'a affecté significativement la capacité de migration des HMVECs en comparaison avec leur contrôle respectif (Figure 3.4 B-C).

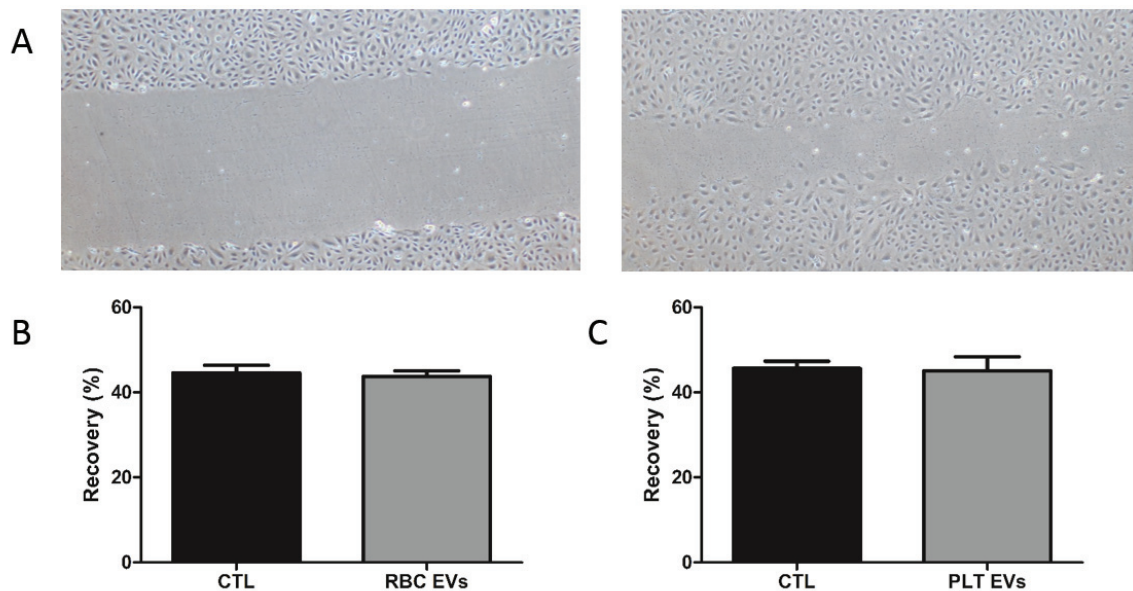


Figure 3.4. Effets des vésicules extracellulaires dérivées de globules rouges et de plaquettes sur la migration des HMVECs. (A) Images représentatives de la blessure volontaire initiale et son recouvrement par les cellules suivant 24 heures. Quantification de la migration des HMVECs en présence (B) de VE^{GR} ou (C) de VE^{PLT} suivant 24 heures. La migration a été évaluée par l'aire de la blessure initiale nouvellement recouverte par les HMVECs suivant les traitements (%). N= 6 par groupe; Test de Mann Whitney non pairé.

3.5 : Les VEs dérivées de globules rouges et de plaquettes causent l'augmentation et la diminution de la production d'espèces réactives d'oxygène par les HMVECs, respectivement

Il est fréquemment rapporté dans la littérature que les VEs peuvent jouer un rôle dans la modulation du stress oxydatif chez les cellules endothéliales sanguines¹⁵⁸. Comme il a également été rapporté que les espèces réactives d'oxygène inhibent la contraction des vaisseaux lymphatiques, nous avons évalué l'effet des VEs sur la production de ROS par les cellules endothéliales lymphatique *in vitro*¹⁵⁹. Nous avons d'abord évalué si les VEs produites *in vitro* peuvent produire elles-mêmes des ROS. Nous avons alors dilué les VE^{GR} et VE^{PLT} à concentration physiologique dans du PBS⁴³, puis avons mesuré leur production de ROS par cinétique suivant leur marquage avec le CMH2DCF-DA, un marqueur servant à la mesure des ROS intracellulaires (Figure 3.5 A-B). Les deux sous-types de VEs ont généré une production de ROS, mais les VE^{GR} (Figure 3.5 A) en ont produit à des niveaux dix fois plus élevés que les VE^{PLT} (Figure 3.5 B). L'addition de l'enzyme antioxydante superoxyde dismutase (SOD) fut utilisé pour confirmer la présence de ROS, car il était impossible d'enlever le CMH2DCF-DA sans enlever également les VEs en suspension. L'ajout de la SOD a causé une diminution de la production de ROS chez les deux sous-types de VEs, générant même des valeurs sous le seuil de détection chez les VE^{PLT}, et confirme ainsi la mesure d'espèce réactive d'oxygène.

Nous avons ensuite voulu savoir si ces VEs peuvent directement moduler le stress oxydatif local chez les HMVECs. Nous avons alors mesuré la production de ROS par les HMVECs en présence ou non de VE^{GR} (Figure 3.5 C) et de VE^{PLT} (Figure 3.5 D). Les VE^{GR} ont causé une augmentation significative de la production de ROS en comparaison avec le contrôle (Figure 3.5 C). Toutefois, malgré leur légère production de ROS, les VE^{PLT} ont causé une diminution significative de la production de ROS lorsque co-incubées avec les HMVECs en comparaison avec le contrôle (Figure 3.5 D). Nous avons par la suite voulu déterminer si les VEs peuvent moduler la production de ROS par les HMVECs suivant leur internalisation. Nous avons traité les HMVECs avec des VE^{GR} et des VE^{PLT} durant 2, 4 et 24 heures. Nous avons ensuite retiré le milieu contenant les VEs et lavé les cellules avec du milieu non traité avant de procéder au marquage avec le CMH2DCF-DA et à la mesure de la production de ROS (Figure 3.5 E-F). Les VE^{GR} ont causé une augmentation significative de la production de ROS par les HMVECs suivant des co-incubations dès 2 heures et jusqu'à 24 heures, en comparaison avec le contrôle

(Figure 3.5 E). Les VE^{PLT} ont causé une diminution significative de la production de ROS par les HMVECs suivant une coincubation de 24 heures en comparaison avec le contrôle (Figure 3.5 F). Ces résultats suggèrent que les VE^{GR} et VE^{PLT} peuvent moduler directement le stress oxydatif local chez les HMVECs et la production de ROS par les HMVECs à long terme. Les VE^{GR} semblent avoir un effet néfaste en causant une augmentation du stress oxydatif local et de la production de ROS par les HMVECs, alors que les VE^{PLT} semblent avoir un effet protecteur en causant une diminution du stress oxydatif local et de la production de ROS par les HMVECs.

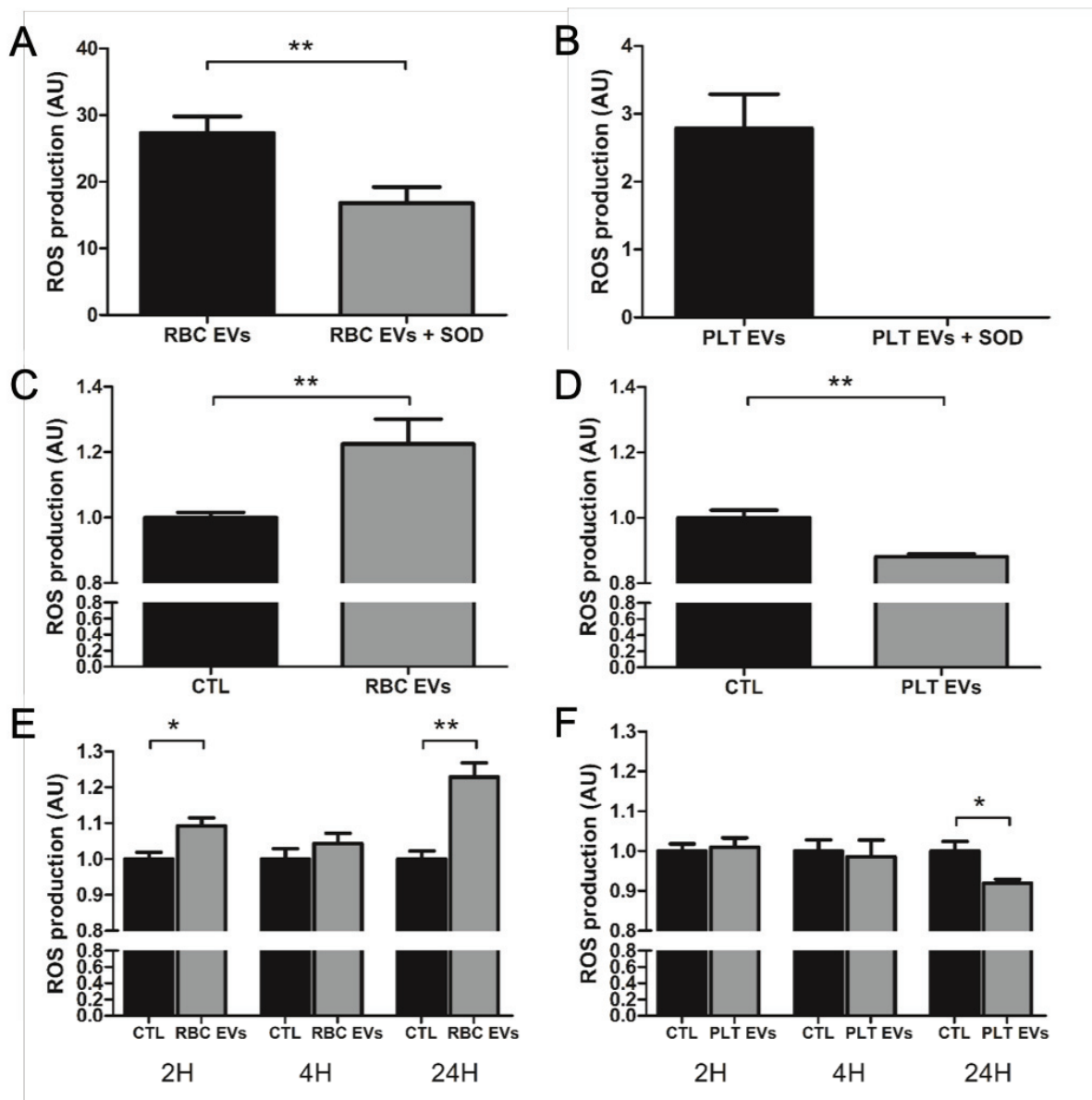


Figure 3.5. Effets des VEs dérivées de globules rouges et de plaquettes sur la production de ROS par les HMVECs. Quantification de la production de ROS par (A) les VE^{GR} ou (B) les VE^{PLT} . La superoxyde dismutase (SOD) (100U/ml) a été utilisée pour valider la présence de ROS. Quantification de la production de ROS par les HMVECs en présence (C) de VE^{GR} ou (D) de VE^{PLT} . Quantification de la production de ROS par les HMVECs suivant leur traitement avec (E) des VE^{GR} et (F) des VE^{PLT} durant 2, 4 et 24 heures. Le marquage avec le CMH2DCF-DA (2'-7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate) a été utilisé pour évaluer la production de ROS par les VEs et les HMVECs. N=6 par groupe; * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$. Test de Mann Whitney non païré.

3.6 : Les vésicules extracellulaires dérivées de globules rouges et de plaquettes causent la diminution de l'activation de la caspase 3 et les vésicules extracellulaires de plaquettes causent la diminution de la nécrose des HMVECs

Les espèces réactives d'oxygène et le stress oxydatif qu'elles engendrent sont fréquemment cause de mort cellulaire, qu'elle soit non physiologique comme la nécrose, ou programmée comme l'apoptose. Nous avons alors voulu savoir si la modulation de la production de ROS causée par les VE^{GR} ou VE^{PLT} peut résulter en une augmentation ou une diminution de la mort cellulaire. Nous avons d'abord marqué les HMVECs traitées avec des anticorps anti-caspase 3 activée afin d'évaluer si les VE^{GR} et VE^{PLT} peuvent induire l'activation de la caspase 3, une enzyme pro-apoptotique (Figure 3.6 A-B). Malgré l'augmentation de la production de ROS causée par les VE^{GR}, les deux sous-types de VEs ont causé une diminution de l'activation de la caspase 3 en comparaison avec leur contrôle respectifs suivant 24 heures (Figure 3.6 A-B). Nous avons ensuite doublement marqué les HMVECs avec de l'iodure de propidium et de l'annexin V reconnaissant la phosphatidylsérine dans le but d'en évaluer le pourcentage de cellules apoptotiques et nécrotiques (Figure 3.6 C-D). Aucun des deux sous-types de VEs n'a affecté significativement l'apoptose des HMVECs suivant 24 heures (Figure 3.6 C-D). Cependant, les VE^{PLT} ont causées une diminution significative de la nécrose chez les HMVECs en comparaison suivant 24 heures (Figure 3.6 F). Les VE^{GR} n'ont pas eu d'effets significatifs sur la nécrose des HMVECs suivant 24 heures (Figure 3.6 E). Ces résultats suggèrent que les VE^{GR} en concentration physiologique n'induisent pas la mort cellulaire des HMVECs, alors que les VE^{PLT} semblent démontrer un effet protecteur en prévenant la nécrose des HMVECs. La diminution de l'activation de la caspase 3 causée par les deux sous-types de VEs ne semble pas résulter en une diminution de l'apoptose des HMVECs.

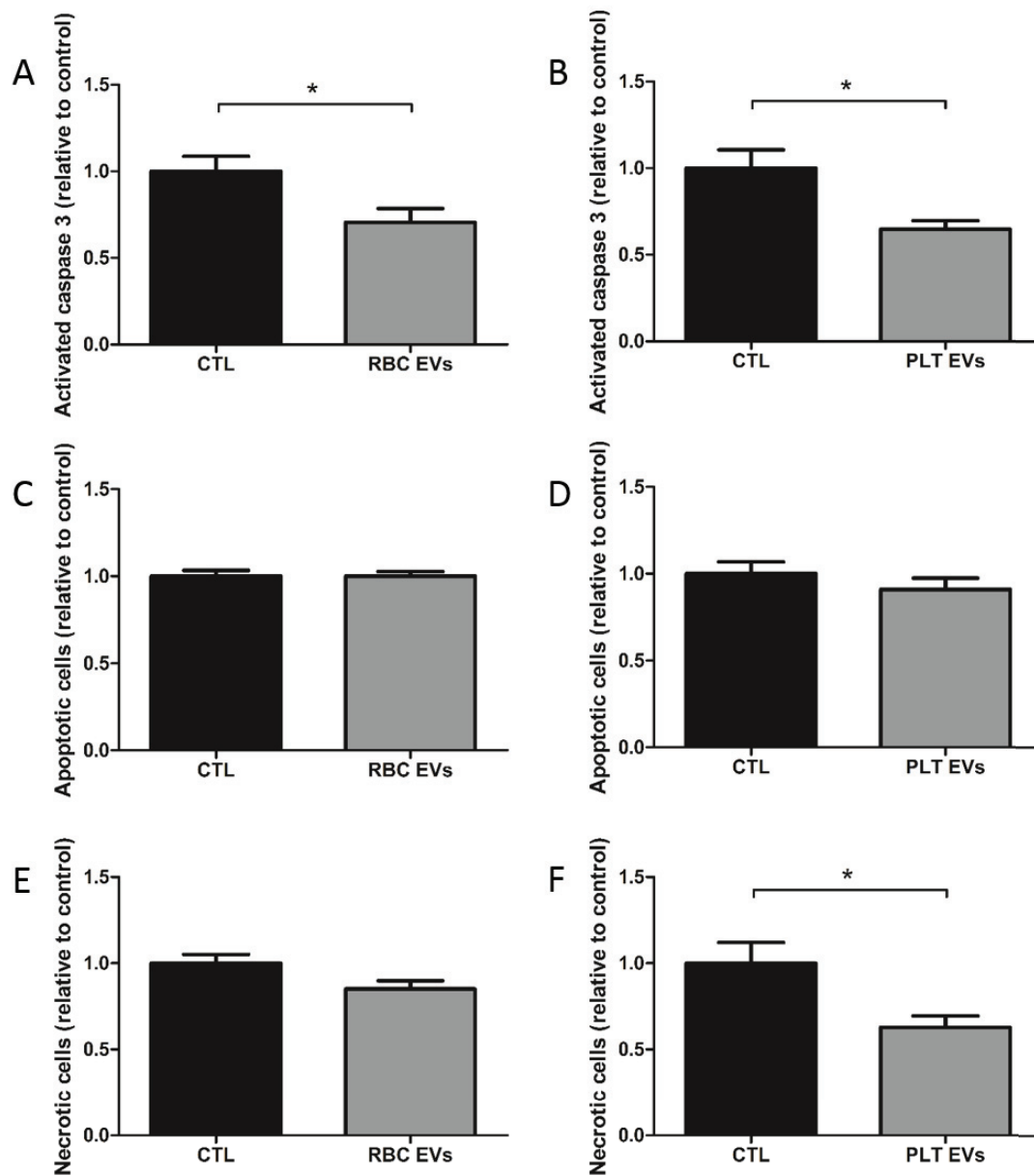


Figure 3.6. Effets des VEs dérivées de globules rouges et de plaquettes sur la mort cellulaire des HMVECs. Quantification de l'activation de la caspase 3 chez les HMVECs traitées avec (A) des VE^{GR} ou (B) des VE^{PLT} durant 24 heures. Le marquage avec des anticorps anti-caspase 3 activée a été utilisé pour évaluer l'activation de la caspase 3 chez les HMVECs. Quantification de l'apoptose chez les HMVECs traitées avec (C) des VE^{GR} ou (D) des VE^{PLT}. Quantification de la nécrose chez les HMVECs traitées avec (E) des VE^{GR} ou (F) des VE^{PLT}. Le marquage avec de l'iodure de propidium et des anticorps anti-annexin V a été utilisé pour évaluer l'apoptose et la nécrose chez les HMVECs. Les cellules ont été analysées par cytométrie en flux (BD, Celesta). N= 6-7 par groupe; * $p < 0,05$ et ** $< 0,01$. Test de Mann Whitney non païré.

3.7 : Les vésicules extracellulaires dérivées de globules rouges causent la diminution de la perméabilité des HMVECs

En situation d'inflammation, l'augmentation de la production de ROS joue un rôle important dans l'augmentation de la perméabilité des cellules endothéliales sanguines. Nous avons donc voulu savoir si la modulation de la génération de ROS causée par les VE^{GR} ou VE^{PLT} peut affecter la perméabilité des HMVECs. Nous avons effectué un test de perméabilité Transwell afin d'évaluer l'effet des VEs sur la perméabilité des HMVECs. Nous avons cultivé des HMVECs dans des inserts de culture cellulaire à pores de 0,4 µm jusqu'au recouvrement complet de l'insert avec un endothélium lymphatique confluent, puis nous avons traité les cellules avec des VE^{GR} ou VE^{PLT} durant 24 heures. Le passage de l'albumine 488 (40 kDa) de l'insert au travers de l'endothélium fut dosé à partir du milieu contenu dans le compartiment inférieur et utilisé comme mesure de la perméabilité endothéliale (Figure 3.7 A-B). Malgré leur stimulation de la production de ROS, les VE^{GR} ont causé une diminution significative de la perméabilité endothéliale (Figure 3.7 A). Les VE^{PLT} n'ont pas altéré significativement la perméabilité des HMVECs. Ces résultats suggèrent qu'en concentration physiologique, les deux sous-types de VEs ne contribueraient pas à l'épanchement de la lymphe en dehors des vaisseaux lymphatiques.

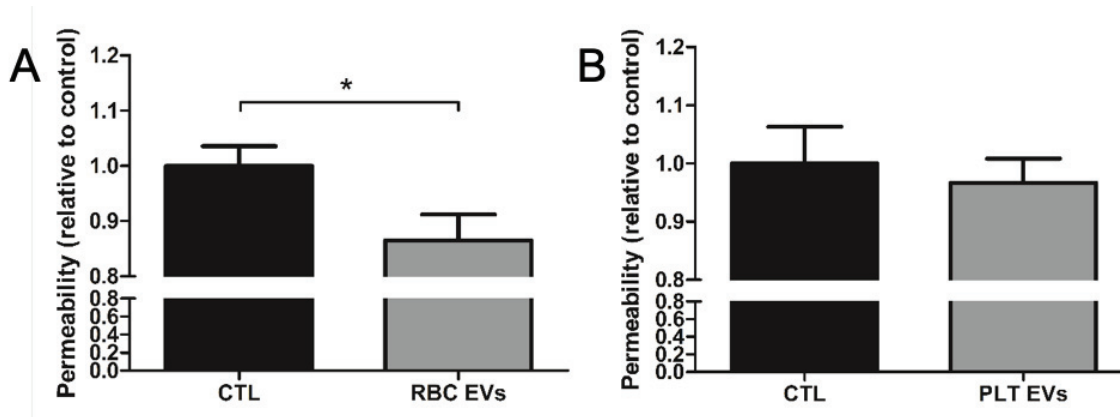


Figure 3.7. Effets des VEs dérivées de globules rouges et des VEs dérivées de plaquettes sur la perméabilité des HMVECs. Effet (A) des VE^{GR} ou (B) des VE^{PLT} sur la perméabilité des HMVECs suivant 24 heures. La perméabilité des HMVECs a été évaluée par un test de perméabilité Transwell. De l'albumine 488 diluée dans du milieu de culture sans phénol a été ajouté dans l'insert durant 20 minutes, puis dosée par fluorescence dans le compartiment inférieur avec un lecteur de plaque Synergy 2. N= 7 par groupe; * $p < 0,05$. Test de Student non païré.

Tableau 3.1. Effets des VEs dérivées de globules rouges et des VEs dérivées de plaquettes sur l'intégrité des HMVECs.

Fonction des LECs	VE^{GR} (2x10⁶/ml)	VE^{PLT} (1x10⁶/ml)
Viabilité	NS	Diminution
Prolifération	NS	Diminution
Cycle cellulaire	NS	Diminution (Phase S)
Migration	NS	NS
Production de ROS (VEs seulement)	Production	Production
Production de ROS (coincubation LECs et VEs)	Augmentation	Diminution
Production de ROS (prétraitement des LECs avec VEs)	Augmentation (2H et 24H)	Diminution (24H)
Activation de la caspase 3	Diminution	Diminution
Apoptose	NS	NS
Nécrose	NS	Diminution
Perméabilité	Diminution	NS

Tableau récapitulatif des résultats présentés dans la section *Résultats*. NS : Non significatif.

Chapitre 4 : Discussion, perspectives et conclusions

4.1 Discussion

L'implication du système lymphatique dans diverses pathologies attire de plus en plus l'attention de la communauté scientifique. La dysfonction lymphatique a notamment été associée à plusieurs aspects de la maladie cardiovasculaire, tel que le vieillissement¹⁶⁰, l'hypercholestérolémie⁶³ et l'athérosclérose³¹. Cette dysfonction, qui touche principalement les vaisseaux lymphatiques collecteurs responsables de la propulsion de la lymphe, s'avère notamment une cause majeure de la mauvaise mobilisation du cholestérol en dehors de la paroi artérielle lors du transport inverse du cholestérol^{31,34}. Cette mauvaise mobilisation pourrait ne pas être spécifique qu'au cholestérol, et toucher également d'autres molécules ou cellules qui tendent à s'accumuler dans les lésions athérosclérotiques, telles que les vésicules extracellulaires²¹. Récemment, des populations de VEs dérivées de globules rouges et de plaquettes ont notamment été identifiées dans la lymphe de souris, et ce, à des niveaux plus importants chez les souris athérosclérotiques⁴³. Il demeure possible que cette accumulation de VEs soit indépendante de la plaque athérosclérotique, et soit causée par leur absorption dans les organes irrigués par le sang où se trouvent les capillaires lymphatiques, ou par leur reflux dans la lymphe au niveau de la jonction lymphoveineuse en conditions d'hyperperméabilité, telles qu'observées lors de l'athérosclérose^{7,35}. Considérant ces résultats ainsi que l'implication des vésicules extracellulaires dans plusieurs conditions inflammatoires, incluant l'athérosclérose, il s'avère primordial de comprendre le fonctionnement des VEs dans la fonction lymphatique²¹.

Les globules rouges et les plaquettes sont les types cellulaires les plus abondants dans le sang⁸². Les plaquettes ont un rôle préétabli dans le maintien de l'intégrité lymphatique et, récemment, un effet de consolidation des cellules endothéliales lymphatiques médié par les plaquettes a été observé *in vitro*^{42,55}. Malgré qu'elles ne soient pas considérées comme une composante habituelle de la lymphe, il demeure possible que certains effets des plaquettes soient médiés par leur relâche de VEs dont on connaît maintenant la présence dans la lymphe⁴³. Les VEG^R sont associées avec une augmentation du stress oxydatif pouvant causer l'augmentation de la perméabilité endothéliale qui peut potentiellement justifier leur présence dans la lymphe, alors que les globules rouges y sont habituellement absents^{4,43,133}. Les présents résultats fournissent de nouvelles informations sur le potentiel des VEG^R et des VE^{PLT} dans l'intégrité des

cellules endothéliales lymphatiques, notamment au niveau de leur prolifération et de la production d'espèces réactives d'oxygène (Tableau 3.1).

Tout d'abord, la production de VE^{GR} et de VE^{PLT} à partir de cellules isolées du sang de volontaires sains nous a permis d'obtenir des populations purifiées de VEs en quantité amplement suffisante pour mener ces travaux préliminaires à bon escient. Deux processus distincts ont été effectués afin de produire des VE^{GR} et des VE^{PLT} (Figure 2.1). Les VE^{GR} ont été produites par choc osmotique¹⁵⁴, alors que les VE^{PLT} ont été produites grâce à un processus physiologique impliquant l'activation de plaquettes avec un agoniste plaquettaire, soit la thrombine¹⁵⁴. Le marquage à l'aide du CFSE et le marquage des antigènes spécifiques de surface CD235a et CD62p nous a permis de confirmer par cytométrie en flux la pureté de nos échantillons et l'obtention de vésicules contenant des estérases actives et s'apparentant à leur cellule d'origine. L'ajout du Triton X-100 a causé un changement dans la morphologie des fragments observés par cytométrie en flux, et nous a permis de confirmer que les vésicules produites étaient entourées d'une bicouche lipidique et étaient bel et bien de provenance cellulaire. L'usage de microbilles de silice de dimensions connues nous a permis de confirmer que la taille des vésicules produites était conforme aux tailles des VEs rapportées dans la littérature. L'utilisation d'une seconde méthode d'observation des VEs, le NTA, a su confirmer les observations effectuées à l'aide de la cytométrie en flux. L'utilisation de microbilles de références pour estimer la taille des vésicules extracellulaires est controversée, car la différence entre les indices de réfraction des microbilles et des VEs peut perturber la relation entre leurs tailles respectives et causer l'intrusion d'autres types cellulaires plus larges dans la région d'intérêt lors de l'analyse par cytométrie en flux^{161,162}. Toutefois, l'usage de microbilles de silice limite ces imprécisions, car leur indice de réfraction est d'environ 1,432¹⁶³ et s'avère très proche de celui des VEs sanguines (1,398), incluant les VE^{PLT} (1,390), déterminés par NTA¹⁶⁴.

L'ajout de microbilles de polystyrène de concentration connue nous a permis de quantifier les VEs. Nous pouvons observer que les VE^{PLT} sont généralement plus grosses que les VE^{GR} (400 nm vs 200 nm, en moyenne) et ne semblent pas inclure la sous population d'exosomes normalement relâchée par les plaquettes en circulation et pouvant mesurer de 30 à 100 nm¹⁶⁵. Il est probable que cette différence dans la taille des deux populations de VEs soit due à l'étape d'ultracentrifugation requise pour récolter les VE^{PLT} , étape manquante dans la

production de EV^{GR} . Pour comprendre si cette méthode de production de VE^{PLT} , pourtant bien décrite dans la littérature¹⁵⁴, pouvait affecter leur taille, nous avons pris avantage d'un autre projet du laboratoire du Dre Martel et avons comparé les VEs obtenus avec des VEs purifiés directement depuis du plasma humain par une méthode de tri cellulaire effectué avec un appareil ultrasécialisé récemment acquis par notre équipe dans le cadre d'un financement du Fond Canadien d'innovation (FCI, en collaboration avec l'équipe du Dr John Rioux – BDFACS FUSION). Ces VEs positifs en $CD41^{+}CFSE^{+}$ ont été aussi analysés par NTA, et les résultats ont révélés que les VE^{PLT} directement isolées du sang de patient sans nécessité de centrifugation était en moyenne plus petite que celle observée chez les VEs produites *in vitro*. Ceci suggère que l'ultracentrifugation utilisée n'a pas permis l'obtention des vésicules de plus petites tailles normalement retrouvées dans le plasma humain. Or, une étape d'ultracentrifugation plus rapide et plus longue pourrait résulter en l'obtention d'une population de VE^{PLT} de tailles plus hétérogènes. Une autre source potentielle de variabilité par rapport aux populations physiologiques serait le choix de l'agoniste plaquettaire. Nous avons choisi la thrombine, car il s'agit d'un puissant agoniste qui est le plus couramment utilisé pour générer des VE^{PLT} *in vitro*¹³⁶. Cependant, une étude de Milioli *et al.* a récemment démontré que la composition en protéines des VE^{PLT} dépend directement de l'agoniste choisi pour les activer; les agonistes plus puissants générant des VEs contenant plus de protéines d'activation plaquettaire que de protéines de dégranulation et de la chaîne de transport d'électron¹³⁶. Comme plusieurs agonistes plaquettaires sont présents à différents niveaux en circulation, il est d'autant plus probable que des populations hétérogènes distinctes puissent être observées en circulation et différer des populations produites *in vitro*. Les tailles observées chez les VE^{GR} correspondent à celles observées en circulation, comme il a été rapporté que la majorité des VE^{GR} circulantes mesurent entre 100 et 300 nm⁸². Le choc osmotique est fréquemment utilisé afin de produire des VE^{GR} *in vitro*, mais elles peuvent également être prélevées du surnageant des poches de transfusion contenant des concentrations élevées de VE^{GR} augmentant avec le temps de conservation^{166,167}. D'autres processus auraient pu être employés pour produire des vésicules extracellulaires dérivées d'érythrocyte, comme l'incubation des globules rouges avec du calcium et l'ionophore calcique A23187, la déplétion de l'ATP, ou l'incubation avec des amphiphiles ou de l'acide lysophosphatidique¹²⁹.

Par la suite, nous avons pu observer que nos échantillons de VE^{GR} et de VE^{PLT} adhèrent et sont internalisées par les HMVECs *in vitro*, suggérant la potentielle interaction de ces deux sous-types de VEs circulant dans la lymphe⁴³ avec l'endothélium lymphatique *in vivo*. Cependant, les expériences effectuées ne nous permettent pas de conclure si les deux sous-types de VEs adhèrent activement ou passivement aux HMVECs. Des expériences similaires effectuées à 4°C, en présence de cytochalasine D inhibant la polymérisation de l'actine, ou en présence d'EDTA pourraient permettre de conclure si l'adhésion et l'internalisation des deux sous-types de VEs sont médiées par des processus actifs⁸⁸. De plus, les mécanismes impliqués dans cette adhésion et intégration des VEs demeurent à être élucidés et peuvent différer selon le sous-type de VEs en raison des différentes vitesses d'adhésion et localisations observées chez les VE^{GR} et VE^{PLT}, respectivement. L'ajout d'inhibiteurs de l'endocytose dépendante de la clathrine (chlorpromazine) et de la micropinocytose (amiloride) pourrait confirmer si ces mécanismes sont impliqués dans l'intégration des VE^{PLT} et des VE^{GR} par les HMVECs *in vitro*.

La vitesse d'adhésion et d'intégration, et la localisation des VEs dans les HMVECs diffèrent chez les deux sous-types de VEs. L'adhésion et l'internalisation des VE^{GR} est progressive jusqu'à 16 heures et semble se retrouver autour des noyaux des HMVECs, alors que l'adhésion des VE^{PLT} semble atteindre un pic vers 4 heures et semble se retrouver en réseaux sur les jonctions entre les HMVECs en plus de sur leur noyaux et cytoplasme. Nos résultats suggèrent que les VE^{PLT} sont intégrées et dégradées par les HMVECs suivant 4 heures de coincubation, car leur présence dans les cellules chutait ensuite drastiquement jusqu'à 16 heures. Comme les plaquettes sont impliquées dans le maintien de l'intégrité lymphatique via la liaison du récepteur CLEC-2 exprimée par les plaquettes avec la podoplanine exprimée par les LECs⁵⁵, il est possible que cette affinité soit la cause de l'adhésion plus rapide des VE^{PLT} aux HMVECs *in vitro*. La liaison du CLEC-2 à la podoplanine supporte notamment l'adhésion des plaquettes aux LECs dans des conditions de flux veineux durant lesquelles l'activité de la podoplanine est accrue¹⁶⁸. De plus, son expression est maintenue sur les plaquettes activées et les vésicules extracellulaires qu'elles relâchent¹⁶⁹. Dans des conditions de flux rapide, l'augmentation des forces de cisaillement cause l'adhésion des plaquettes au facteur de Von Willebrand (VWF), une glycoprotéine adhésive plasmatique, notamment par la liaison avec GPIb et GpIIb/IIIa¹⁷⁰. Comme le VWF est relâché des granules α des plaquettes et est exprimé par les cellules endothéliales lymphatiques^{170,171}, il est possible, en condition de flux, qu'il puisse favoriser

l'adhésion de vésicules extracellulaires dérivées de plaquettes aux LECs dans l'optique que les VEs expriment GPIb et/ou GpIIb/IIIa tel que rapporté dans la littérature^{144,172}. L'adhésion des VE^{PLT} et des VE^{GR} à un endothélium lymphatique en condition de flux demeure à être investiguée. Toutefois, il est possible que les résultats obtenus ne s'avèrent pas pertinents *in vivo* considérant que le flux lymphatique est très lent en comparaison au flux sanguin (3-5 litres/jours vs 5-6 litres/minutes)⁵³. Considérant les multiples antigènes pouvant être exprimés autant par les VE^{PLT} que les plaquettes, il serait alors possible que les deux puissent se faire compétition pour les sites d'adhésion aux LECs¹⁴⁴. Toutefois, les plaquettes ne sont pas considérées comme des composantes habituelles de la lymphe alors que les VE^{PLT} ont été identifiés dans la lymphe de souris en santé et malades^{42,43}. Il est alors possible que les effets des plaquettes sur les LECs puissent être médiés par la relâche de VE^{PLT}^{42,43}.

L'élimination des VEs par les cellules est habituellement médiée par des récepteurs spécifiques de la phosphatidylsérine sur la cellule, tel que Del-1, la lactadhérine, CD36, CD14, CD68 et CD31¹⁷³. Comme CD31, également nommé PECAM-1 (*platelet and endothelial cell adhesion molecule*), est exprimé par les LECs au niveau des jonctions entre les cellules¹⁷⁴, il est alors possible qu'il soit également impliqué dans l'adhésion des VEs aux HMVECs *in vitro*. De plus, CD31 est impliqué dans des interactions homophiles avec d'autres cellules, ce qui permet notamment l'adhérence et la migration transendothéliale des monocytes et lymphocytes exprimant CD31¹⁷⁵. Il pourrait alors engendrer l'adhérence des VE^{PLT}, car ces dernières conservent généralement le CD31 également exprimé par les plaquettes¹⁴⁴. Il fut notamment rapporté que CD31 est impliqué dans l'adhésion et l'agrégation plaquettaire sur endothélium sanguin lésé¹⁷⁶⁻¹⁷⁸. L'interaction homophile de CD31 pourrait potentiellement expliquer l'adhésion et intégration plus rapide des VE^{PLT} et leur accumulation en réseaux au niveau des jonctions entre les HMVECs en comparaison avec les VE^{GR} qui peuvent également exprimer la phosphatidylsérine, mais pas CD31. Il fut tout de même rapporté par Wautier *et al.* que les globules rouges de patients souffrants d'occlusion de la veine de la rétine exprimaient jusqu'à deux fois plus de phosphatidylsérine que les globules rouges de patients en santé et que cette expression corrélait avec l'adhésion des globules rouges aux cellules endothéliales *in vitro*¹⁷⁹. L'usage d'anticorps liant la phosphatidylsérine et l'annexine V ont également inhibé l'adhésion de ces globules rouges, autant en condition statique que de flux¹⁷⁹. Il est alors fort probable que la liaison de la phosphatidylsérine à des récepteurs, tel que CD31, à la surface des HMVECs

soit en partie responsable de l'adhésion des VE^{GR} et des VE^{PLT} aux HMVECs *in vitro*. Comme les VEs n'expriment pas toutes la phosphatidylsérine, les mécanismes derrière l'internalisation des VEs négatives en phosphatidylsérine demeurent inconnus, mais pourraient inclure la liaison d'antigènes spécifiques de surface avec des récepteurs¹⁷³. L'internalisation plus lentes des VE^{GR} par les HMVECs pourraient également résulter d'une adhésion passive à l'endothélium. Leur dégradation dans la cellule reste à être observée et pourrait avoir lieu suivant 16 heures de coincubation, ce pourquoi ces expériences devraient être répétées et prolongées. Le marquage des cellules avec un marqueur membranaire, tel que le CellMask (Invitrogen), devrait également y être effectué dans le but de s'assurer de la localisation exacte des VEs dans les LECs.

Ensuite, nous avons évalué l'effet des VE^{GR} et des VE^{PLT} sur la viabilité, la prolifération, le cycle cellulaire et la migration des cellules endothéliales lymphatiques *in vitro*. Nous avons démontré que les VE^{PLT} diminuent significativement l'entrée des HMVECs en phase S du cycle cellulaire, soit la réplication de leur ADN. Les VE^{PLT} ont également diminué significativement la prolifération des HMVECs, confirmée par la diminution des cellules exprimant l'antigène Ki-67. Considérant l'expression maximale de Ki-67 durant la phase S du cycle cellulaire¹⁸⁰, il est probable que le retard de l'entrée en phase S des HMVECs se soit traduit par la diminution de leur prolifération. Ces effets concordent avec ceux des plaquettes dont elles dérivent. En effet, il fut démontré, dans une étude d'Osada *et al.*, que les plaquettes inhibent la prolifération, la migration et la formation de tubes par les LECs afin de favoriser la séparation entre les vaisseaux lymphatiques et les vaisseaux sanguins et prévenir le refoulement de sang dans la lymphe⁵⁵. Ils suggèrent que la liaison de la podoplanine avec le récepteur CLEC-2 lors du développement causerait l'activation des plaquettes et le transfert du contenu de leurs granules- α aux LECs. Ils ont ensuite démontré que le surnageant des plaquettes activées au poly(PHG), une fibre de collagène synthétique agissant comme agoniste, causait l'inhibition de la prolifération, la migration et la formation de tubes par les LECs. Ils ont finalement identifié le BMP-9, membre de la famille des TGF- β contenu dans les granules alpha des plaquettes, comme médiateur important des effets observés⁵⁵. Comme nous avons activé les plaquettes afin de produire des VEs, il est alors possible que nos échantillons de VE^{PLT} puissent héberger du BMP-9 ou d'autres protéines habituellement contenues dans les granules alpha et potentiellement impliqué dans l'inhibition de la lymphangiogénèse, tel que les TGF- β , PF4, les angiostatines ou les endostatines⁵⁵. Leur transfert de ces protéines aux HMVECs serait alors une cause de

l'inhibition de la prolifération chez ces dernières⁵⁵. Il serait alors intéressant de vérifier, potentiellement par Western blot, l'expression de ces protéines dans nos échantillons de VE^{PLT}. Une autre étude publiée par Finney *et al.* a également démontré que les plaquettes inhibent la migration des LECs dans un mécanisme dépendant de CLEC-2, mais n'ont pas observé ces mêmes résultats avec le surnageant de plaquettes activées à la rhodocytine normalement capable de se lier à l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ exprimée par les LECs¹⁸¹. Ils ont également démontré qu'un traitement avec un anticorps anti-podoplanine et un anticorps secondaire de réticulation a causé la diminution de la migration des LECs médiée par VEGF-C, démontrant que l'inhibition dépend du contact entre les plaquettes et les LECs¹⁸¹. Il est possible que les résultats divergents des deux études soient causés par l'interférence de la rhodocytine avec l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ exprimée par les LECs, car poly(PHG) est un agoniste de GPVI qui n'est pas exprimé par les LECs, mais il est également possible que l'usage de deux agonistes plaquettaire différents aie causé la relâche d'un éventail différents de granules⁵⁵. Ces hypothèses pourraient expliquer pourquoi nous n'avons pas observé de diminution significative de la migration des LECs lorsque traitées avec nos VE^{PLT} produites à l'aide d'un agoniste plaquettaire différent, la thrombine, et concordent également avec l'étude de Westerman *et al.* selon laquelle la composition en protéines des VE^{PLT} dépend directement de l'agoniste utilisé pour l'activation¹³⁶. Comme Osada *et al.* ont démontré que d'autres protéines contenues dans les granules alpha, telles que TGF-B et PF4, pouvaient inhiber certaines fonctions distinctes impliquées dans la lymphangiogénèse, il est possible qu'une de ces protéines soit exprimée à des niveaux plus élevés que BMP-9 dans nos échantillons de VE^{PLT} et cause ainsi une inhibition de la prolifération sans toutefois affecter significativement la migration des HMVECs⁵⁵. Il est alors d'autant plus important d'effectuer la protéomique de nos échantillons de VEs.

Nous avons également observé une diminution non significative de la viabilité et de la prolifération des HMVECs lorsque traitées avec des VE^{GR}. Dans une perspective reliée au diabète, Wu *et al.* ont mis en évidence qu'en condition d'hyperglycémie, les ROS causent la phosphorylation indépendante du ligand de VEGFR-3 dans le Golgi et l'augmentation de l'expression d'epsines, des protéines adaptatrices d'endocytose¹⁸². Cette augmentation d'expression d'epsines augmente leur capacité à se lier au VEGFR-3 et la dégradation du VEGFR-3 nouvellement synthétisé, menant à la diminution de la biodisponibilité du VEGFR3 et l'abrogation de la lymphangiogénèse¹⁸². Comme nous avons confirmé que nos échantillons

de VE^{GR} produisaient des ROS et causaient l'augmentation de la production de ROS par les HMVECs, il est possible que cette augmentation du stress oxydatif engendre une diminution de leur prolifération. Malgré le fait que cette diminution s'avère non significative, il demeure possible qu'une exposition chronique à long terme ou à une concentration pathologique plus élevée de VE^{GR} puisse causer une diminution significative de la prolifération et de la migration des HMVECs. Il sera nécessaire d'investiguer cette possibilité et intéressant d'y mesurer l'expression de VEGFR3 et des epsines 1 et 2 afin de confirmer si la diminution de la prolifération peut être due à l'augmentation de la production de ROS en présence de VE^{GR}.

Par la suite, nous avons démontré que les deux sous-types de VEs peuvent moduler la production de ROS intracellulaire par les HMVECs. Nous avons d'abord pu constater que les VE^{GR} produisent des ROS et causent également l'augmentation de la production de ROS par les HMVECs lorsqu'ils sont coincubés. Afin de confirmer que les VEs peuvent également moduler la production de ROS une fois internalisées par les HMVECs, nous avons démontré que des prétraitements des HMVECs avec des VE^{GR} ont causé une augmentation significative de la production de ROS par les HMVECs suivant 2 heures et 24 heures. Contrairement aux globules rouges fonctionnels hébergeant plusieurs antioxydants capables d'éliminer les espèces réactives d'oxygène, les VE^{GR} sont habituellement associées avec une activité pro-oxydante²⁶. Il fut démontré que, chez des patients souffrants de dépranocytose, les VE^{GR} contiennent une portion non négligeable de l'hème libre plasmatique et peuvent le transférer aux cellules endothéliales sanguines et induire l'augmentation du stress oxydatif, la dysfonction endothéliale et les vaso-occlusions¹³³. Il n'est alors pas surprenant que les VE^{GR} puissent causer l'augmentation de la production de ROS par les HMVECs. Le mécanisme par lequel ceci peut se produire pourrait s'expliquer par le transport, au sein des VE^{GR}, d'enzymes catalysant la production de ROS, telle que la NADPH oxydase active, pour ainsi causer une augmentation de la production de ROS chez les HMVECs ciblées. Des résultats similaires ont été obtenus dans des cellules endothéliales de l'artère coronaire humaine (HCAEC) traitées avec des VEs dérivées de HCAEC produites en condition hyperglycémique dans une perspective reliée au diabète¹⁰⁹.

Nous avons ensuite constaté que les VE^{PLT} produisent également des ROS, mais à des niveaux nettement inférieurs à ceux produits par les VE^{GR}. Toutefois, les VE^{PLT} ont causé une diminution significative de la production de ROS par les HMVECs lorsque coincubées, mais

également une fois intégrées suivant un prétraitement de 24 heures. Il fut démontré que les plaquettes produisaient de l'oxyde nitrique dans des niveaux inférieurs aux cellules endothéliales, et qu'elles pouvaient contenir les isoformes NOS2 et principalement NOS3 de la synthase d'oxyde nitrique¹⁸³. L'augmentation du calcium intracellulaire lors de l'activation plaquettaire induit notamment l'activation de la NOS3 et la production de NO menant à l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, mais elles peuvent également en produire au repos puisque NOS3 et son ARNm ont été détectées dans les plaquettes, autant en condition physiologique qu'en condition pathologique¹⁸³. Comme les plaquettes relâchent également des VEs lors de leur activation, il est possible que ces dernières puissent alors y intégrer la NOS3 sous forme de protéine ou d'ARNm. Une étude de Horn *et al.* a démontré que des VEs circulantes constituées principalement de VEs dérivées de plaquettes et dérivées de cellules endothéliales contenaient une forme fonctionnelle de NOS3 dont les niveaux et l'activité diminuait chez les patients atteints de maladies cardiovasculaires¹⁸⁴. Considérant l'effet antioxydant du NO en présence de SOD à concentration physiologique, il est possible que la diminution de la production de ROS par les HMVECs en présence de VE^{PLT} soit causée par l'augmentation de la biodisponibilité du NO engendrée par sa synthèse par les VE^{PLT}. L'oxyde nitrique induit également l'expression de la SOD extracellulaire dont la dismutation du O₂⁻ en peroxyde d'hydrogène peut causer l'augmentation de l'expression et de l'activité de NOS3 dans les cellules endothéliales¹⁸³. Dans l'optique où les VE^{PLT} produisent du NO, il est alors possible que cette synthèse mène à l'augmentation de l'expression de la SOD extracellulaire provoquant à son tour la hausse de l'expression et de l'activité de NOS3 dans les HMVECs, ce qui pourrait expliquer la diminution de la synthèse de ROS observée dans ces dernières suivant un traitement de 24 heures avec les VE^{PLT}. On ne peut écarter l'hypothèse que les VE^{PLT} puissent moduler les niveaux d'ARNm et/ou de phosphorylation de NOS3 et de sa voie de signalisation, ou moduler l'activité de la NADPH oxydase, tel qu'il fut démontré dans des HUVECs traitées avec des VEs dérivées de cellules endothéliales¹⁵⁸. Ces avenues devront être investiguées davantage.

Nous avons par la suite investigué les effets potentiels que pouvait engendrer la modulation de la production de ROS par les VE^{GR} et les VE^{PLT}. Comme les niveaux élevés de ROS sont habituellement associés à une augmentation de la mort cellulaire par apoptose ou par nécrose¹⁸⁵, nous avons d'abord évalué l'effet des VE^{GR} et des VE^{PLT} sur l'activation de la caspase 3, une enzyme proapoptotique, la mort par apoptose et par nécrose chez les HMVECs.

Nous avons pu constater que les VE^{PLT} entraînent une diminution significative de l'activation de la caspase 3 et de la nécrose chez les HMVECs, mais n'ont pas d'impact sur l'externalisation de la phosphatidylsérine des HMVECs. Tel que mentionné plus haut, nous soupçonnons que les VE^{PLT} causent l'augmentation de la biodisponibilité de l'oxyde nitrique. Il fut couramment rapporté que le NO exerce des effets antiapoptotiques et est impliqué dans le maintien de l'intégrité des cellules endothéliales¹⁸⁶. L'oxyde nitrique, produit autant de façon exogène qu'endogène et à concentration physiologique, peut prévenir la mort cellulaire en présence de facteurs proinflammatoires, tels que le TNF α , le lipopolysaccharide (LPS) ou les ROS, de facteurs proathérosclérotiques, tels que le LDL oxydé et l'angiotensine II, ainsi qu'en absence de sérum¹⁸⁶. Dans l'éventualité où les VE^{PLT} relâchent du NO ou causent l'augmentation de sa synthèse par les HMVECs, il s'avère alors logique qu'elles puissent également causer la diminution de la mort cellulaire. Il est alors possible que la diminution de l'activation de la caspase 3 et de la nécrose en présence de VE^{PLT} soit causée par l'augmentation de la biodisponibilité du NO. L'absence de résultats significatifs au niveau de l'apoptose pourrait alors être due à l'absence de facteurs pouvant induire l'apoptose dans les conditions expérimentales, tel que mentionné précédemment¹⁸⁶. Nous avons également émis l'hypothèse que l'adhésion des VE^{PLT} aux HMVECs pourrait être partiellement médiée par l'interaction homophile de CD31. L'interaction homophile de CD31 déclenche la voie de signalisation de son domaine cytoplasmique qui est impliquée dans la cytoprotection et la survie cellulaire, notamment en inhibant la voie intrinsèque de l'apoptose induite par Bax par un mécanisme qui demeure à être investigué, mais qui cause une diminution des dommages mitochondriaux et de la libération de cytochrome c¹⁸⁷⁻¹⁹⁰. Il s'agirait alors d'une autre voie possiblement impliquée dans la diminution de la mort cellulaire programmée des HMVECs en présence de VE^{PLT} considérant qu'elles expriment habituellement CD31 comme les plaquettes¹⁴⁴.

À notre surprise, malgré l'augmentation du stress oxydatif engendré par les VE^{GR} chez les HMVECs, nous avons pu remarquer que les VE^{GR} causent une diminution significative de l'activation de la caspase 3 chez les HMVECs suivant 24 heures et ne causent pas d'augmentation significative de l'apoptose et de la nécrose. Les niveaux élevés de ROS entraînent habituellement l'augmentation de la mort cellulaire par apoptose ou par nécrose. Toutefois, à des niveaux relativement bas, les ROS peuvent favoriser l'autophagie, soit la dégradation de protéines et d'organelles cellulaires impliquée dans le maintien de l'homéostasie,

au détriment de l'apoptose, notamment par la modulation de l'activité de facteurs de transcription et de cascades de signalisation de kinases^{191,192}. Il est alors possible que l'augmentation de la production de ROS causée par les VE^{GR} en concentration physiologique ne soit suffisante que pour favoriser l'autophagie au détriment de l'apoptose, ce qui pourrait expliquer pourquoi nous observons une diminution de l'activation de la caspase 3 en leur présence. Il serait alors intéressant d'évaluer leurs effets sur les voies de signalisations impliquées dans l'autophagie, mais également leurs effets sur la mort cellulaire à des concentrations pathologiques plus élevées. L'utilisation d'un inhibiteur de ROS, tel que le N-acétylcystéine (NAC)¹⁹³, ou d'une enzyme antioxydante, telle que la SOD, permettrait alors d'étudier si les effets observés sont causés entre autre par l'augmentation du stress oxydatif.

Dans une étude récente, Kitazume *et al.* ont rapporté que la propriété lectine de CD31 impliquée dans les interactions hétérophiles du récepteur contribuerait à la survie cellulaire des cellules endothéliales en étant impliquée dans la transduction de signaux de survie¹⁹⁴. Considérant la capacité de CD31 à lier la phosphatidylsérine et la potentielle internalisation des VEs via cette interaction, il est alors possible que la supposée liaison des VEs exprimant la phosphatidylsérine avec CD31 à la surface des HMVECs soit impliquée dans la transduction de signaux de survie. Ceci pourrait expliquer pourquoi on observe une diminution de l'activation de la caspase 3 en présence de VE^{GR} ou de VE^{PLT}. L'absence d'effets au niveau de l'apoptose et de la nécrose chez les HMVECs traitées avec des VE^{GR} serait alors également due à l'absence d'agents ou de conditions pouvant induire la mort cellulaire. Comme la caspase-3 induit l'externalisation de la phosphatidylsérine en activant la scramblase Xkr8 par clivage lors de l'apoptose¹⁹⁵, il s'avère logique qu'une diminution de l'activation de la caspase 3 ne soit pas associé à une augmentation de l'externalisation de la phosphatidylsérine. Les deux tests confirment alors que des concentrations physiologiques des deux sous-types de VEs ne stimulent pas l'apoptose chez les HMVECs.

Finalement, considérant que des niveaux élevés de ROS sont habituellement une cause d'une perméabilité endothéliale accrue, nous avons voulu évaluer l'effet des VE^{GR} et des VE^{PLT} sur la perméabilité des LECs *in vitro*¹⁹⁶. Nous avons observé une diminution significative de la perméabilité des HMVECs ayant été traitées avec des VE^{GR} pendant 24 heures. Ces résultats nous laissent croire que les VE^{GR} en concentration physiologique ne produisent pas assez de

ROS et qu'une concentration pathologique plus élevée s'avère nécessaire pour causer l'augmentation de la perméabilité des HMVECs. Tel que mentionné précédemment, nous avons comme hypothèse que les niveaux de ROS produits par les VE^{GR} en concentration physiologique sont potentiellement juste assez élevés pour induire l'autophagie au détriment de l'apoptose¹⁹⁰. Dans une étude récente, Patella *et al.* ont suggéré, grâce à une analyse protéomique approfondie, que l'autophagie est nécessaire pour maintenir les niveaux intracellulaires de ROS requis pour maintenir la perméabilité endothéliale *in vitro* et la perméabilité vasculaire *in vivo*¹⁹². Il est alors possible que les VE^{GR} causent la diminution de la perméabilité des HMVECs via la stimulation de l'autophagie, ce qui confirme que nous devrions investiguer plus en profondeur les effets des VEs sur les voies de signalisation impliquées dans l'autophagie chez les LECs. Pour ce faire, l'activité du facteur nucléaire κ B (NF- κ B), de la protéine p53 et du *nuclear factor (erythroid-derived) 2-like* (Nrf2), tous impliqués dans l'activation de l'autophagie et de l'apoptose, peuvent être mesurée en présence de VEs¹⁹¹. Encore une fois, l'usage d'un inhibiteur de ROS ou d'une enzyme antioxydante nous permettrait de conclure si les effets observés sont en partie médiés par les espèces réactives d'oxygène.

Dans nos travaux publiés précédemment, nous avons pu observer que, lorsqu'adhérées à un endothélium lymphatique, les plaquettes semblent lier et exercer un effet de consolidation des LECs⁴². Considérant ces résultats ainsi que l'implication des plaquettes dans l'intégrité des vaisseaux lymphatiques via la liaison entre CLEC-2 et la podoplanine, nous pensons que les VE^{PLT} causeraient une diminution de la perméabilité des HMVECs. Toutefois, nous n'avons pas constaté de variations significatives de la perméabilité des HMVECs suivant leur traitement avec des VE^{PLT}. Nous pensons que les effets des VE^{PLT} sur les HMVECs seraient partiellement dus à leur modulation de la synthèse de NO par la NOS3 endothéliale ou plaquettaire. Le NO synthétisé par la NOS3 joue un rôle important dans l'induction de l'hyperperméabilité en condition inflammatoire, mais n'est pas essentiel au contrôle de la perméabilité en condition basale¹⁹⁷. Il est alors logique que la synthèse de NO induite par les VE^{PLT} n'ait pas d'impact sur la perméabilité, considérant qu'aucun facteur proinflammatoire n'étaient présents dans les conditions expérimentales. Le rôle du NO dans l'intégrité des vaisseaux lymphatiques est également controversé¹⁹⁸. Dans une perspective reliée au diabète, il fut démontré que chez des souris diabétiques déficientes en récepteur de la leptine (db/db), la déficience en NO provoque l'augmentation drastique de la perméabilité des vaisseaux lymphatiques collecteurs en

comparaison avec des souris en santé¹⁹⁸. L'augmentation de la biodisponibilité du NO corrige ce défaut chez les souris diabétiques en diminuant la perméabilité des collecteurs aux niveaux observés chez les souris en santé, mais cause également l'augmentation de la perméabilité des collecteurs chez ces souris en santé¹⁹⁸. Ces résultats présentent ainsi deux rôles opposés du NO dans la perméabilité des vaisseaux lymphatiques, qui peuvent entre autres être expliqués par l'activité de la phosphodiesterase 3, une enzyme qui entraîne l'augmentation de la perméabilité par la dégradation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et qui est inhibée par la signalisation en aval du NO, chez les souris diabétiques db/db¹⁹⁸. Selon cette optique, il est alors logique que la potentielle augmentation de la biodisponibilité du NO en présence de VE^{PLT} ne diminue pas la perméabilité des HMVECs considérant qu'il s'agit d'un endothélium lymphatique en santé. Cette augmentation ne serait toutefois pas assez importante pour causer une augmentation significative de la perméabilité des HMVECs. D'autre part, le rôle de CD31 dans le maintien de l'intégrité de la barrière de perméabilité cellulaire est reconnu depuis longtemps, l'inhibition de CD31 causant une augmentation de la perméabilité endothéliale autant *in vitro* qu'*in vivo*¹⁹⁹. Il est alors possible que l'interaction homophile entre le potentiel CD31 exprimé par les VE^{PLT} et celui exprimé par les HMVECs soit également impliqué dans le maintien de la perméabilité de ces dernières, mais il est encore une fois impossible d'y conclure due à l'absence d'agent proinflammatoire dans les conditions d'expérimentation actuelles.

4.2 Perspectives

Ce projet de maîtrise est instigateur de plusieurs projets phares du laboratoire de Dre Martel, et des investigations sont actuellement en cours pour finaliser ces travaux. Par exemple, il sera prioritaire de mieux caractériser les sous-populations de VEs obtenues, soit par l'analyse de l'expression de leurs protéines de surface (ex. expression de CD31, ligand potentiel homophile sur les cellules endothéliales lymphatiques) et par la mesure de leur contenu en protéines et en microARN¹⁰². Il sera également intéressant de vérifier si les VE^{PLT} peuvent relâcher du VWF soluble en condition statique ou de flux. Puisque nous pensons également qu'elles pourraient inhiber la prolifération des HMVECs via le transfert de BMP-9 ou d'autres protéines habituellement contenues dans les granules alpha des plaquettes, et qu'elles pourraient médier la synthèse d'oxyde nitrique en hébergeant de la NOS3 active, l'expression de ces

protéines devra également être investiguée. Comme nous avons constaté que les VE^{GR} produisaient et causaient l'augmentation de la production d'espèces réactives d'oxygène par les HMVECs, il sera alors nécessaire de confirmer que les VE^{GR} que nous avons produites contiennent de l'hème libre, et de vérifier si elles peuvent également héberger des enzymes catalysant la production de ROS, telle que la NADPH oxydase par Western blot. De plus, comme les récepteurs spécifiques de la phosphatidylsérine engendrent l'internalisation des VEs exprimant la phosphatidylsérine, il sera important de vérifier quelle proportion de nos échantillons de VE^{GR} et de VE^{PLT} exprime la phosphatidylsérine et si l'annexine V peut inhiber l'adhésion des deux sous-types de VEs aux HMVECs. Plusieurs variables pré-analytiques peuvent causer de la variation chez les populations de VEs isolées à partir du sang, telles que l'âge, le sexe, le jeûne, le rythme circadien, l'exercice, la nutrition, l'indice de masse corporel, la médication et les maladies, sans exclure le fait que les VEs utilisées dans le cadre de ce projet ont été produites *in vitro*²⁰⁰. Finalement, il sera intéressant de comparer le protéome de nos échantillons de VEs avec celui des VEs circulantes prélevées de façon standardisée chez des patients sains et des patients présentant différentes manifestations de la maladie athérosclérotique afin de confirmer à quel point nos échantillons sont représentatifs des populations de VEs circulantes observées chez l'humain.

Par la suite, il sera indispensable d'évaluer les potentielles cascades de signalisation pouvant être impliquées dans les différents effets de nos populations de VE^{GR} et VE^{PLT} sur l'intégrité des HMVECs *in vitro*. Nous soupçonnons la liaison homophile entre le CD31 exprimé par les VE^{PLT} et le CD31 exprimé par les HMVECs, et la subséquente cascade de signalisation au travers du domaine cytoplasmique de CD31, d'être impliquées dans la protection des LECs contre la mort cellulaire par apoptose et l'augmentation de la perméabilité en situation inflammatoire. Nous pensons également que les VE^{GR} exprimant la phosphatidylsérine pourraient induire cette cascade de signalisation via la liaison hétérophile avec CD31. Il sera alors nécessaire d'évaluer si les VE^{GR} et les VE^{PLT} peuvent causer la régulation à la hausse de la voie de signalisation de CD31 et si l'inhibition de CD31 avec des anticorps peut renverser ou atténuer les effets causés par les VEs. Comme les VE^{PLT} et les VE^{GR} ont modulé la production de ROS à la baisse et à la hausse, respectivement, il sera essentiel d'évaluer leur effet sur l'expression, l'activation et l'inhibition de la NOS3 endothéliale. Nous avons également émis comme hypothèse que les niveaux de ROS produits par les HMVECs

suivant leur traitement avec des concentrations physiologiques de VE^{GR} sont potentiellement justes assez élevés pour induire l'autophagie au détriment de l'apoptose menant également à l'inhibition de l'hyperperméabilité en condition inflammatoire. Il serait alors intéressant de vérifier cette hypothèse en évaluant l'effet de concentrations physiologiques de VE^{GR} sur l'activité de facteurs de transcriptions et de cascade de signalisation de kinases impliquées dans l'autophagie.

Il serait également intéressant de caractériser l'effet des VEs sur d'autres fonctions ou paramètres de l'intégrité des cellules endothéliales lymphatiques. Premièrement, comme nous soupçonnons que la diminution de la production d'espèces réactives d'oxygène médiée par les VE^{PLT} est potentiellement causée par l'augmentation de la synthèse d'oxyde nitrique par les HMVECs, il sera requis d'évaluer l'effet des EV^{PLT} et des EV^{GR} sur la synthèse de NO par les HMVECs *in vitro*. Nous pensons également que les VE^{GR} pourraient interférer avec la synthèse de NO en raison de leur stimulation du stress oxydatif²⁶. Il sera alors nécessaire d'évaluer l'activation ou l'inhibition de la synthase d'oxyde nitrique, la NOS3²¹. Les VE^{GR} sont reconnus pour être entouré d'une bicouche lipidique riche en phospholipides, cholestérol et radeaux lipidiques²⁶. Il serait donc indiqué d'évaluer les effets des VE^{GR} et des VE^{PLT} sur le profil lipidique des HMVECs *in vitro*. Nous avons déjà des résultats préliminaires démontrant l'augmentation des ratios de cholestérol estérifiés sur cholestérol totaux (EC/TC) chez les HMVECs traitées avec des VE^{GR} (Figure supplémentaire 5), démontrant la potentielle intégration des VEs dans les HMVECs.

Considérant certains effets opposés engendrés par les VE^{GR} et les VE^{PLT} sur l'intégrité des HMVECs *in vitro*, et le fait que les deux sous-types ont été identifiées dans la lymphe de souris⁴³, il sera intéressant de réévaluer leurs effets sur les fonctions précédentes lorsqu'elles sont toutes les deux coïncubées à leur concentration physiologique respectives avec les HMVECs. Comme il fut démontré qu'un traitement qui potentialise l'effet des plaquettes augmente le bon fonctionnement des vaisseaux lymphatiques⁴², il s'avère possible que les VE^{PLT} puissent protéger contre les effets néfastes des VE^{GR} en conditions pathologiques. Nous soupçonnons que les concentrations physiologiques de globules rouges ne sont pas assez élevées pour induire l'augmentation de la mort cellulaire par apoptose et de la perméabilité. Il sera alors essentiel de réévaluer les fonctions étudiées en présence de concentrations pathologiques plus

élevées de VE^{GR} et de VE^{PLT} . Dans une optique semblable, il sera intéressant d'évaluer si les VE^{PLT} peuvent rétablir l'intégrité d'un endothélium lymphatique dysfonctionnel. L'ajout de cytokines proinflammatoires et proathérosclérotiques, telles que le $TNF-\alpha$, l'interleukine-1 (IL-1) ou l'interleukine-6 (IL-6), aux conditions expérimentales aux conditions expérimentales serait pertinent pour réaliser cet objectif. En effet, ces cytokines jouent un rôle primordial dans l'inflammation occasionnée par l'athérosclérose, et sont impliquées dans l'augmentation de la perméabilité endothéliale lymphatique ainsi que dans la dysfonction de la barrière endothéliale lymphatique^{201,202}. De plus, il fut rapporté que le $TNF-\alpha$ exerce un effet délétère sur plusieurs fonctions des LECs évaluées dans le présent mémoire¹⁵⁷. L'ajout de telles conditions sera nécessaire afin de mieux comprendre le rôle potentiel des VE^{PLT} dans le maintien ou le rétablissement de la perméabilité, et dans la survie cellulaire. Finalement, afin de traiter les LECs avec des concentrations physiologiques de VEs⁴³, nous avons dû utiliser une concentration de VE^{GR} deux fois plus élevée que celle des VE^{PLT} . Il sera finalement intéressant de traiter les LECs avec des concentrations identiques de VE^{GR} et de VE^{PLT} pour nous permettre de mieux comparer leurs effets sans biais occasionné par la différence de concentrations.

Les résultats présentés s'avèrent de bons résultats préliminaires et ont permis la mise en place de protocoles permettant d'évaluer nos hypothèses à partir de VEs circulantes prélevées chez des patients sains et des patients présentant différentes manifestations de la maladie athérosclérotique. Des études visant à mieux comprendre les effets des VEs isolées chez des patients sains et malades sur l'endothélium lymphatique sont justement en cours au laboratoire. L'usage d'un trieur cellulaire FacsFusion permet l'isolation de l'entièreté des vésicules extracellulaires circulantes ainsi que l'isolation de populations de VEs spécifiques basées sur des antigènes spécifiques de surface, à partir du plasma de patients pour en caractériser le contenu ou tester leurs effets sur les HMVECs en utilisant des concentrations de VEs autologues à leur composition dans le sang.

4.3 Conclusion

Les présents travaux fournissent de nouvelles informations sur le potentiel rôle des VE^{GR} et des VE^{PLT} dans la dysfonction lymphatique reliée à l'athérosclérose. Dans un premier temps,

nous avons produit des populations purifiées de vésicules extracellulaires dérivées de globules rouges et de plaquettes et avons observé leur adhérence et intégration à une monocouche de cellules endothéliales lymphatiques *in vitro*. Nous avons par la suite démontré que les VE^{PLT} causent la diminution de l'entrée en phase S du cycle cellulaire se traduisant par une diminution de la prolifération des HMVECs, confirmant que, comme les plaquettes elles-mêmes, elles pourraient être impliquées dans le maintien de l'intégrité du système lymphatique, en contribuant à sa séparation du système sanguin. Les VE^{GR} et VE^{PLT} semblent influencer la production d'espèces réactives d'oxygène par les LECs, à la hausse et à la baisse respectivement, ce qui pourrait contribuer à la survie cellulaire en concentration physiologique, mais pourrait également induire la mort cellulaire et l'hyperperméabilité en concentration pathologique. Les données recueillies mettent en évidence des mécanismes potentiels et de nouvelles voies d'investigation afin de mieux comprendre l'implication des vésicules extracellulaires dans la dysfonction lymphatique reliée à l'athérosclérose.

Bibliographie

- 1 Herrington, W., Lacey, B., Sherliker, P., Armitage, J. & Lewington, S. Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease. *Circ Res* **118**, 535-546, doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.307611 (2016).
- 2 Gistera, A. & Hansson, G. K. The immunology of atherosclerosis. *Nat Rev Nephrol* **13**, 368-380, doi:10.1038/nrneph.2017.51 (2017).
- 3 Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* **340**, 115-126, doi:10.1056/NEJM199901143400207 (1999).
- 4 Badimon, L. & Vilahur, G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J Intern Med* **276**, 618-632, doi:10.1111/joim.12296 (2014).
- 5 Bitton, A. & Gaziano, T. A. The Framingham Heart Study's impact on global risk assessment. *Prog Cardiovasc Dis* **53**, 68-78, doi:10.1016/j.pcad.2010.04.001 (2010).
- 6 Mahmood, S. S., Levy, D., Vasan, R. S. & Wang, T. J. The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: a historical perspective. *The Lancet* **383**, 999-1008, doi:10.1016/s0140-6736(13)61752-3 (2014).
- 7 Davignon, J. & Ganz, P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* **109**, III27-32, doi:10.1161/01.CIR.0000131515.03336.f8 (2004).
- 8 Gimbrone, M. A., Jr. & Garcia-Cardena, G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res* **118**, 620-636, doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306301 (2016).
- 9 Durand, M. J. & Gutterman, D. D. Diversity in mechanisms of endothelium-dependent vasodilation in health and disease. *Microcirculation* **20**, 239-247, doi:10.1111/micc.12040 (2013).
- 10 Hansson, G. K. & Hermansson, A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol* **12**, 204-212, doi:10.1038/ni.2001 (2011).
- 11 Nakashima, Y., Raines, E. W., Plump, A.S., Breslow, J.L. & Ross, R. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**,842-851, (1998).

- 12 Swirski, F. K. *et al.* Monocyte accumulation in mouse atherogenesis is progressive and proportional to extent of disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 10340-10345, doi:10.1073/pnas.0604260103 (2006).
- 13 Swirski, F. K. *et al.* Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. *J Clin Invest* **117**, 195-205, doi:10.1172/JCI29950 (2007).
- 14 Cheong, C. & Choi, J. H. Dendritic cells and regulatory T cells in atherosclerosis. *Mol Cells* **34**, 341-347, doi:10.1007/s10059-012-0128-9 (2012).
- 15 Gordon, S. & Taylor, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* **5**, 953-964, doi:10.1038/nri1733 (2005).
- 16 Robbins, C. S. *et al.* Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat Med* **19**, 1166-1172, doi:10.1038/nm.3258 (2013).
- 17 Kunjathoor, V. V. *et al.* Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J Biol Chem* **277**, 49982-49988, doi:10.1074/jbc.M209649200 (2002).
- 18 Buono, C., Anzinger, J. J., Amar, M. & Kruth, H. S. Fluorescent pegylated nanoparticles demonstrate fluid-phase pinocytosis by macrophages in mouse atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* **119**, 1373-1381, doi:10.1172/JCI35548 (2009).
- 19 Park, Y. M., Febbraio, M. & Silverstein, R. L. CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima. *J Clin Invest* **119**, 136-145, doi:10.1172/JCI35535 (2009).
- 20 Williams, J. W. *et al.* Limited Macrophage Positional Dynamics in Progressing or Regressing Murine Atherosclerotic Plaques-Brief Report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **38**, 1702-1710, doi:10.1161/ATVBAHA.118.311319 (2018).
- 21 Boulanger, C. M., Loyer, X., Rautou, P. E. & Amabile, N. Extracellular vesicles in coronary artery disease. *Nat Rev Cardiol* **14**, 259-272, doi:10.1038/nrcardio.2017.7 (2017).
- 22 Chaabane, C., Coen, M. & Bochaton-Piallat, M. L. Smooth muscle cell phenotypic switch: implications for foam cell formation. *Curr Opin Lipidol* **25**, 374-379, doi:10.1097/MOL.000000000000113 (2014).

- 23 Choi, H. Y. *et al.* ATP-binding cassette transporter A1 expression and apolipoprotein A-I binding are impaired in intima-type arterial smooth muscle cells. *Circulation* **119**, 3223-3231, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.841130 (2009).
- 24 Shah, P. K., Falk, E., Badimon, J.J. , Fernandez-Ortiz, A., Mailhac, A., Villareal-Levy, G., Fallon, J. T., Regnstrom, J. Fuster, V. Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation* **92**, 1565-1569. (1995).
- 25 Kolodgie, F. D., Gold, H. K., Burke, A. P., Fowler, D. R., Kruth, H. S., Weber, D. K., Farb, A., Guerrero, L. J., Hayase, M., Kutys, R., Narula, J., Finn, A. V. & Virmani, R. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med* **349**, 2316-2325, doi:10.1056/NEJMoa035655 (2003).
- 26 Harisa, G. I., Badran, M. M. & Alanazi, F. K. Erythrocyte nanovesicles: Biogenesis, biological roles and therapeutic approach: Erythrocyte nanovesicles. *Saudi Pharm J* **25**, 8-17, doi:10.1016/j.jsps.2015.06.010 (2017).
- 27 Tritschler, T., Kraaijpoel, N., Le Gal, G. & Wells, P. S. Venous Thromboembolism: Advances in Diagnosis and Treatment. *JAMA* **320**, 1583-1594, doi:10.1001/jama.2018.14346 (2018).
- 28 Stirling, J., Muramatsu, K. & Shirai, T. Cerebral Embolism as a Cause of Stroke and Transient Ischemic Attack. *Echocardiography* **13**, 513-518. (1996).
- 29 Marques, L. R. *et al.* Reverse Cholesterol Transport: Molecular Mechanisms and the Non-medical Approach to Enhance HDL Cholesterol. *Front Physiol* **9**, 526, doi:10.3389/fphys.2018.00526 (2018).
- 30 Temel, R. E. *et al.* Biliary sterol secretion is not required for macrophage reverse cholesterol transport. *Cell Metab* **12**, 96-102, doi:10.1016/j.cmet.2010.05.011 (2010).
- 31 Martel, C. *et al.* Lymphatic vasculature mediates macrophage reverse cholesterol transport in mice. *J Clin Invest* **123**, 1571-1579, doi:10.1172/JCI63685 (2013).
- 32 Tall, A. R. & Yvan-Charvet, L. Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* **15**, 104-116, doi:10.1038/nri3793 (2015).
- 33 Leaf, D. A. The effect of physical exercise on reverse cholesterol transport. *Metabolism* **52**, 950-957, doi:10.1016/s0026-0495(03)00147-1 (2003).

- 34 Milasan, A., Dallaire, F., Mayer, G. & Martel, C. Effects of LDL Receptor Modulation on Lymphatic Function. *Sci Rep* **6**, 27862, doi:10.1038/srep27862 (2016).
- 35 Baluk, P. *et al.* Functionally specialized junctions between endothelial cells of lymphatic vessels. *J Exp Med* **204**, 2349-2362, doi:10.1084/jem.20062596 (2007).
- 36 Cueni, L. N. & Detmar, M. The lymphatic system in health and disease. *Lymphat Res Biol* **6**, 109-122, doi:10.1089/lrb.2008.1008 (2008).
- 37 Tammela, T. & Alitalo, K. Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise. *Cell* **140**, 460-476, doi:10.1016/j.cell.2010.01.045 (2010).
- 38 Kim, K. W. & Song, J. H. Emerging Roles of Lymphatic Vasculature in Immunity. *Immune Netw* **17**, 68-76, doi:10.4110/in.2017.17.1.68 (2017).
- 39 Randolph, G. J., Ivanov, S., Zinselmeyer, B. H. & Scallan, J. P. The Lymphatic System: Integral Roles in Immunity. *Annu Rev Immunol* **35**, 31-52, doi:10.1146/annurev-immunol-041015-055354 (2017).
- 40 Milasan, A., Ledoux, J. & Martel, C. Lymphatic network in atherosclerosis: the underestimated path. *Future Sci OA* **1**, doi: [10.4155/fso.15.61] (2015).
- 41 Ee, L. C., Zheng, S., Yao, L. & Tso, P. Lymphatic absorption of fatty acids and cholesterol in the neonatal rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**, 325-331. doi: 10.1152/ajpgi.2000.279.2.G325 (2000).
- 42 Milasan, A. *et al.* Apolipoprotein A-I Modulates Atherosclerosis Through Lymphatic Vessel-Dependent Mechanisms in Mice. *J Am Heart Assoc* **6**, doi:10.1161/JAHA.117.006892 (2017).
- 43 Milasan, A. *et al.* Extracellular vesicles are present in mouse lymph and their level differs in atherosclerosis. *J Extracell Vesicles* **5**, 31427, doi:10.3402/jev.v5.31427 (2016).
- 44 Zawieja, D. Lymphatic biology and the microcirculation: past, present and future. *Microcirculation* **12**, 141-150, doi:10.1080/10739680590900003 (2005).
- 45 Trevaskis, N. L., Kaminskis, L. M. & Porter, C. J. From sewer to saviour - targeting the lymphatic system to promote drug exposure and activity. *Nat Rev Drug Discov* **14**, 781-803, doi:10.1038/nrd4608 (2015).
- 46 Wigle, J.T. & Oliver, G. Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* **98**, 769-778, (1999).

- 47 Karkkainen, M. J. *et al.* Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* **5**, 74-80, doi:10.1038/ni1013 (2004).
- 48 Petrova, T. V., Mäkinen, T., Mäkelä, T. P., Saarela, J., Virtanen, I., Ferrell, R. E., Finegold, D. N., Kerjaschki, D., Ylä-Herttuala, S. & Alitalo, K. Lymphatic endothelial reprogramming of vascular endothelial cells by the Prox-1 homeobox transcription factor. *EMBO J* **21**, 4593-4599. doi:10.1093/emboj/cdf470 (2002).
- 49 Jeltsch, M., Kaipainen, A., Joukov, V., Meng, X., Lakso, M., Rauvala, H., Swartz, M., Fukumura, D., Jain, R. K. & Alitalo, K. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* **276**, 1423-1425. doi:10.1126/science.276.5317.1423 (1997).
- 50 Baldwin, M. E. *et al.* Vascular endothelial growth factor D is dispensable for development of the lymphatic system. *Mol Cell Biol* **25**, 2441-2449, doi:10.1128/MCB.25.6.2441-2449.2005 (2005).
- 51 Bui, H. M. *et al.* Proteolytic activation defines distinct lymphangiogenic mechanisms for VEGFC and VEGFD. *J Clin Invest* **126**, 2167-2180, doi:10.1172/JCI83967 (2016).
- 52 Breslin, J. W. *et al.* Vascular endothelial growth factor-C stimulates the lymphatic pump by a VEGF receptor-3-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**, H709-718, doi:10.1152/ajpheart.00102.2007 (2007).
- 53 Hess, P. R. *et al.* Platelets mediate lymphovenous hemostasis to maintain blood-lymphatic separation throughout life. *J Clin Invest* **124**, 273-284, doi:10.1172/JCI70422 (2014).
- 54 Uhrin, P. *et al.* Novel function for blood platelets and podoplanin in developmental separation of blood and lymphatic circulation. *Blood* **115**, 3997-4005, doi:10.1182/blood-2009-04-216069 (2010).
- 55 Osada, M. *et al.* Platelet activation receptor CLEC-2 regulates blood/lymphatic vessel separation by inhibiting proliferation, migration, and tube formation of lymphatic endothelial cells. *J Biol Chem* **287**, 22241-22252, doi:10.1074/jbc.M111.329987 (2012).
- 56 Sabine, A. *et al.* FOXC2 and fluid shear stress stabilize postnatal lymphatic vasculature. *J Clin Invest* **125**, 3861-3877, doi:10.1172/JCI80454 (2015).

- 57 Potteaux, S. *et al.* Suppressed monocyte recruitment drives macrophage removal from atherosclerotic plaques of Apoe^{-/-} mice during disease regression. *J Clin Invest* **121**, 2025-2036, doi:10.1172/JCI43802 (2011).
- 58 Lemole, G. M. The role of lymphostasis in atherogenesis. *Ann Thorac Surg* **31**, 290-293, (1981).
- 59 Xu, X., Lin, H., Lv, H., Zhang, M. & Zhang, Y. Adventitial lymphatic vessels -- an important role in atherosclerosis. *Med Hypotheses* **69**, 1238-1241, doi:10.1016/j.mehy.2007.04.007 (2007).
- 60 Sacchi, G., Weber, E. & Comparini, L. Histological framework of lymphatic vasa vasorum of major arteries: an experimental study. *Lymphology* **23**, 135-139. (1990)
- 61 Drozd, K., Janczak, D., Dziegiel, P., Podhorska, M., Piotrowska, A., Patrzalek, D., Andrzejak, R. & Szuba, A. Adventitial lymphatics and atherosclerosis. *Lymphology* **45**, 26-33. (2012).
- 62 Kholova, I. *et al.* Lymphatic vasculature is increased in heart valves, ischaemic and inflamed hearts and in cholesterol-rich and calcified atherosclerotic lesions. *Eur J Clin Invest* **41**, 487-497, doi:10.1111/j.1365-2362.2010.02431.x (2011).
- 63 Vuorio, T. *et al.* Lymphatic vessel insufficiency in hypercholesterolemic mice alters lipoprotein levels and promotes atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **34**, 1162-1170, doi:10.1161/ATVBAHA.114.302528 (2014).
- 64 Zaldivia, M. T. K., McFadyen, J. D., Lim, B., Wang, X. & Peter, K. Platelet-Derived Microvesicles in Cardiovascular Diseases. *Front Cardiovasc Med* **4**, 74, doi:10.3389/fcvm.2017.00074 (2017).
- 65 Jansen, F., Nickenig, G. & Werner, N. Extracellular Vesicles in Cardiovascular Disease: Potential Applications in Diagnosis, Prognosis, and Epidemiology. *Circ Res* **120**, 1649-1657, doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.310752 (2017).
- 66 Shao, H. *et al.* New Technologies for Analysis of Extracellular Vesicles. *Chem Rev* **118**, 1917-1950, doi:10.1021/acs.chemrev.7b00534 (2018).
- 67 Gould, S. J. & Raposo, G. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* **2**, doi:10.3402/jev.v2i0.20389 (2013).
- 68 Zappulli, V., Friis, K. P., Fitzpatrick, Z., Maguire, C. A. & Breakefield, X. O. Extracellular vesicles and intercellular communication within the nervous system. *J Clin Invest* **126**, 1198-1207, doi:10.1172/JCI81134 (2016).

- 69 Pitt, J. M., Kroemer, G. & Zitvogel, L. Extracellular vesicles: masters of intercellular communication and potential clinical interventions. *J Clin Invest* **126**, 1139-1143, doi:10.1172/JCI87316 (2016).
- 70 Boilard, E. *et al.* Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science* **327**, 580-583, doi:10.1126/science.1181928 (2010).
- 71 Becker, A. *et al.* Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis. *Cancer Cell* **30**, 836-848, doi:10.1016/j.ccell.2016.10.009 (2016).
- 72 Todorova, D., Simoncini, S., Lacroix, R., Sabatier, F. & Dignat-George, F. Extracellular Vesicles in Angiogenesis. *Circ Res* **120**, 1658-1673, doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.309681 (2017).
- 73 Sabatier, F., Darmon, P., Hugel, B., Combes, V., Sanmarco, M., Velut, J. G., Arnoux, D., Charpiot, P., Freyssinet, J. M., Oliver, C., Sampol, J. & Dignat-George, F. Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes* **51**, 2840-2845, doi:org/10.2337/diabetes.51.9.2840 (2002).
- 74 Salih, M., Fenton, R. A., Zietse, R. & Hoorn, E. J. Urinary extracellular vesicles as markers to assess kidney sodium transport. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **25**, 67-72, doi:10.1097/MNH.000000000000192 (2016).
- 75 Diamant, M. *et al.* Elevated Numbers of Tissue-Factor Exposing Microparticles Correlate With Components of the Metabolic Syndrome in Uncomplicated Type 2 Diabetes Mellitus. *Circulation* **106**, 2442-2447, doi:10.1161/01.Cir.0000036596.59665.C6 (2002).
- 76 Pirro, M. *et al.* Increased ratio of CD31+/CD42- microparticles to endothelial progenitors as a novel marker of atherosclerosis in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 2530-2535, doi:10.1161/01.ATV.0000243941.72375.15 (2006).
- 77 Borges, F. T., Reis, L. A. & Schor, N. Extracellular vesicles: structure, function, and potential clinical uses in renal diseases. *Braz J Med Biol Res* **46**, 824-830, doi:10.1590/1414-431X20132964 (2013).
- 78 Osteikoetxea, X. *et al.* Improved characterization of EV preparations based on protein to lipid ratio and lipid properties. *PLoS One* **10**, e0121184, doi:10.1371/journal.pone.0121184 (2015).

- 79 Kowal, J. *et al.* Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E968-977, doi:10.1073/pnas.1521230113 (2016).
- 80 Willms, E., Cabanas, C., Mager, I., Wood, M. J. A. & Vader, P. Extracellular Vesicle Heterogeneity: Subpopulations, Isolation Techniques, and Diverse Functions in Cancer Progression. *Front Immunol* **9**, 738, doi:10.3389/fimmu.2018.00738 (2018).
- 81 Morel, O., Jesel, L., Freyssinet, J. M. & Toti, F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**, 15-26, doi:10.1161/ATVBAHA.109.200956 (2011).
- 82 Arraud, N. *et al.* Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *J Thromb Haemost* **12**, 614-627, doi:10.1111/jth.12554 (2014).
- 83 Atkin-Smith, G. K. *et al.* Isolation of cell type-specific apoptotic bodies by fluorescence-activated cell sorting. *Sci Rep* **7**, 39846, doi:10.1038/srep39846 (2017).
- 84 Coleman, M. L., Sahai, E. A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A. & Olson, M.F. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol* **3**, 339-345. doi: 10.1038/35070009 (2001).
- 85 Gyorgy, B. *et al.* Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci* **68**, 2667-2688, doi:10.1007/s00018-011-0689-3 (2011).
- 86 Bergsmedh, A. *et al.* Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6407-6411, doi:10.1073/pnas.101129998 (2001).
- 87 Mulcahy, L. A., Pink, R. C. & Carter, D. R. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles* **3**, doi:10.3402/jev.v3.24641 (2014).
- 88 Morelli, A. E. *et al.* Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood* **104**, 3257-3266, doi:10.1182/blood-2004-03-0824 (2004).
- 89 Rana, S., Yue, S., Stadel, D. & Zoller, M. Toward tailored exosomes: the exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection. *Int J Biochem Cell Biol* **44**, 1574-1584, doi:10.1016/j.biocel.2012.06.018 (2012).
- 90 Schmid, S. L., Sorkin, A. & Zerial, M. Endocytosis: Past, present, and future. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**, a022509, doi:10.1101/cshperspect.a022509 (2014).

- 91 Escreveente, C., Keller, S., Altevogt, P. & Costa, J. Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells. *BMC Cancer* **11**, 108, doi:10.1186/1471-2407-11-108 (2011).
- 92 Nanbo, A., Kawanishi, E., Yoshida, R. & Yoshiyama, H. Exosomes derived from Epstein-Barr virus-infected cells are internalized via caveola-dependent endocytosis and promote phenotypic modulation in target cells. *J Virol* **87**, 10334-10347, doi:10.1128/JVI.01310-13 (2013).
- 93 Feng, D. *et al.* Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic* **11**, 675-687, doi:10.1111/j.1600-0854.2010.01041.x (2010).
- 94 Fitzner, D. *et al.* Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *J Cell Sci* **124**, 447-458, doi:10.1242/jcs.074088 (2011).
- 95 Yuyama, K., Sun, H., Mitsutake, S. & Igarashi, Y. Sphingolipid-modulated exosome secretion promotes clearance of amyloid-beta by microglia. *J Biol Chem* **287**, 10977-10989, doi:10.1074/jbc.M111.324616 (2012).
- 96 Parolini, I. *et al.* Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J Biol Chem* **284**, 34211-34222, doi:10.1074/jbc.M109.041152 (2009).
- 97 Koga, Y. *et al.* Exosome can prevent RNase from degrading microRNA in feces. *J Gastrointest Oncol* **2**, 215-222, doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2011.015 (2011).
- 98 Tian, T., Wang, Y., Wang, H., Zhu, Z. & Xiao, Z. Visualizing of the cellular uptake and intracellular trafficking of exosomes by live-cell microscopy. *J Cell Biochem* **111**, 488-496, doi:10.1002/jcb.22733 (2010).
- 99 Valadi, H. *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* **9**, 654-659, doi:10.1038/ncb1596 (2007).
- 100 Al-Mayah, A. H., Irons, S. L., Pink, R. C., Carter, D. R. & Kadhim, M. A. Possible role of exosomes containing RNA in mediating nontargeted effect of ionizing radiation. *Radiat Res* **177**, 539-545, (2012).
- 101 Aliotta, J. M. *et al.* Microvesicle entry into marrow cells mediates tissue-specific changes in mRNA by direct delivery of mRNA and induction of transcription. *Exp Hematol* **38**, 233-245, doi:10.1016/j.exphem.2010.01.002 (2010).
- 102 Laffont, B. *et al.* Activated platelets can deliver mRNA regulatory Ago2*microRNA complexes to endothelial cells via microparticles. *Blood* **122**, 253-261, doi:10.1182/blood-2013-03-492801 (2013).

- 103 Leroyer, A. S. *et al.* Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol* **49**, 772-777, doi:10.1016/j.jacc.2006.10.053 (2007).
- 104 Bobryshev, Y. V., Killingsworth, M. C. & Orekhov, A. N. Increased shedding of microvesicles from intimal smooth muscle cells in athero-prone areas of the human aorta: implications for understanding of the predisease stage. *Pathobiology* **80**, 24-31, doi:10.1159/000339430 (2013).
- 105 Mesri, M. & Altieri, D. C. Endothelial cell activation by leukocyte microparticles. *J Immunol* **161**, 4382-4387, (1998).
- 106 Mesri, M. & Altieri, D.C. Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway. *J Biol Chem* **274**, 23111-23118, (1999).
- 107 Barry, O.P., Praticò, D., Savani, R.C. & FitzGerald, G.A. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest* **102**, 136-144. doi: 10.1172/JCI2592 (1998).
- 108 Rautou, P. E. *et al.* Microparticles from human atherosclerotic plaques promote endothelial ICAM-1-dependent monocyte adhesion and transendothelial migration. *Circ Res* **108**, 335-343, doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.237420 (2011).
- 109 Jansen, F. *et al.* High glucose condition increases NADPH oxidase activity in endothelial microparticles that promote vascular inflammation. *Cardiovasc Res* **98**, 94-106, doi:10.1093/cvr/cvt013 (2013).
- 110 Huber, J., Vales, A., Mitulovic, G., Blumer, M., Schmid, R., Witztum, J. L., Binder, B.R. & Leitinger, N. Oxidized membrane vesicles and blebs from apoptotic cells contain biologically active oxidized phospholipids that induce monocyte-endothelial interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 101-107, doi: org/10.1161/hq0102.101525 (2002).
- 111 Nomura, S., Tandon, N.N., Nakamura, T., Cone, J., Fukuhara, S. & Kambayashi, J. High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells. *Atherosclerosis* **158**, 277-287, doi:org/10.1016/S0021-9150(01)00433-6 (2001).

- 112 Fink, K. *et al.* Selenium prevents microparticle-induced endothelial inflammation in patients after cardiopulmonary resuscitation. *Crit Care* **19**, 58, doi:10.1186/s13054-015-0774-3 (2015).
- 113 Amabile, N. *et al.* Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* **16**, 3381-3388, doi:10.1681/ASN.2005050535 (2005).
- 114 Agouni, A. *et al.* Endothelial dysfunction caused by circulating microparticles from patients with metabolic syndrome. *Am J Pathol* **173**, 1210-1219, doi:10.2353/ajpath.2008.080228 (2008).
- 115 Brodsky, S. V., Zhang, F., Nasjletti, A. & Goligorsky, M. S. Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **286**, H1910-H1915, doi:10.1152/ajpheart.01172.2003 (2004).
- 116 Boulanger, C. M., Scoazec, A., Ebrahimian, T., Henry, P., Mathieu, E., Tedgui, A. & Mallat, Z. Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation* **104**, 2649-2652, (2001).
- 117 Edrissi, H., Schock, S. C., Hakim, A. M. & Thompson, C. S. Microparticles generated during chronic cerebral ischemia increase the permeability of microvascular endothelial barriers in vitro. *Brain Res* **1634**, 83-93, doi:10.1016/j.brainres.2015.12.032 (2016).
- 118 Keyel, P. A., Tkacheva, O. A., Larregina, A. T. & Salter, R. D. Coordinate stimulation of macrophages by microparticles and TLR ligands induces foam cell formation. *J Immunol* **189**, 4621-4629, doi:10.4049/jimmunol.1200828 (2012).
- 119 Zakharova, L., Svetlova, M. & Fomina, A. F. T cell exosomes induce cholesterol accumulation in human monocytes via phosphatidylserine receptor. *J Cell Physiol* **212**, 174-181, doi:10.1002/jcp.21013 (2007).
- 120 Huber, L. C. *et al.* The role of membrane lipids in the induction of macrophage apoptosis by microparticles. *Apoptosis* **12**, 363-374, doi:10.1007/s10495-006-0622-7 (2007).
- 121 Böing, A. N., Hau, C. M., Sturk, A. & Nieuwland, R. Platelet microparticles contain active caspase 3. *Platelets* **19**, 96-103, doi:10.1080/09537100701777295 (2008).

- 122 Pakala, R. Serotonin and thromboxane A2 stimulate platelet-derived microparticle-induced smooth muscle cell proliferation. *Cardiovasc Radiat Med* **5**, 20-26, doi:10.1016/j.carrad.2003.12.002 (2004).
- 123 Weber, A., Köppen, H. O., Schrör, K. Platelet-derived microparticles stimulate coronary artery smooth muscle cell mitogenesis by a PDGF-independent mechanism. *Thromb Res* **98**, 461-466, doi:org/10.1016/S0049-3848(00)00192-4 (2000).
- 124 Li, C. J. *et al.* Novel proteolytic microvesicles released from human macrophages after exposure to tobacco smoke. *Am J Pathol* **182**, 1552-1562, doi:10.1016/j.ajpath.2013.01.035 (2013).
- 125 Lozito, T. P. & Tuan, R. S. Endothelial cell microparticles act as centers of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) activation and vascular matrix remodeling. *J Cell Physiol* **227**, 534-549, doi:10.1002/jcp.22744 (2012).
- 126 Leroyer, A. S. *et al.* CD40 ligand+ microparticles from human atherosclerotic plaques stimulate endothelial proliferation and angiogenesis a potential mechanism for intraplaque neovascularization. *J Am Coll Cardiol* **52**, 1302-1311, doi:10.1016/j.jacc.2008.07.032 (2008).
- 127 Mallat, Z., Hugel, B., Ohan, J., Lesèche, G., Freyssinet, J. M. & Tedgui, A. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation* **99**, 348-353, doi:org/10.1161/01.CIR.99.3.348 (1999).
- 128 Alaarg, A., Schiffelers, R. M., van Solinge, W. W. & van Wijk, R. Red blood cell vesiculation in hereditary hemolytic anemia. *Front Physiol* **4**, 365, doi:10.3389/fphys.2013.00365 (2013).
- 129 Jank, H. & Salzer, U. Vesicles generated during storage of red blood cells enhance the generation of radical oxygen species in activated neutrophils. *ScientificWorldJournal* **11**, 173-185, doi:10.1100/tsw.2011.25 (2011).
- 130 Tissot, J.-D. *et al.* Blood microvesicles: From proteomics to physiology. *Translational Proteomics* **1**, 38-52, doi:10.1016/j.trprot.2013.04.004 (2013).
- 131 Van Der Meijden, P. E. *et al.* Platelet- and erythrocyte-derived microparticles trigger thrombin generation via factor XIIa. *J Thromb Haemost* **10**, 1355-1362, doi:10.1111/j.1538-7836.2012.04758.x (2012).

- 132 Biró, E., Sturk-Maquelin, K. N., Vogel, G. M., Meuleman, D. G., Smit, M.J. , Hack, C.E. , Sturk, A. & Nieuwland, R. Human cell-derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a tissue factor-dependent manner. *J Thromb Haemost* **1**, 2561-2568, doi:org/10.1046/j.1538-7836.2003.00456.x (2003).
- 133 Camus, S. M., De Moraes, J.A., Bonnin, P., Abbyad, P., Le Jeune, S., Lionnet, F., Loufrani, L., Grimaud, L., Lambry, J. C., Charue, D., Kiger, L., Renard, J. M., Larroque, C., Le Clésiau, H., Tedgui, A., Bruneval, P., Barja-Fidalgo, C., Alexandrou, A., Tharaux, P.L., Boulanger, C. M. & Blanc-Brude, O. P. Circulating cell membrane microparticles transfer heme to endothelial cells and trigger vasoocclusions in sickle cell disease. *Blood* **125**, 3805-3814, doi:10.1182/blood-2014-07-589283 (2015).
- 134 Ghoshal, K. & Bhattacharyya, M. Overview of platelet physiology: its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis. *ScientificWorldJournal* **2014**, 781857, doi:10.1155/2014/781857 (2014).
- 135 Boilard, E. Extracellular vesicles and their content in bioactive lipid mediators: more than a sack of microRNA. *J Lipid Res* **59**, 2037-2046, doi:10.1194/jlr.R084640 (2018).
- 136 Milioli, M. *et al.* Quantitative proteomics analysis of platelet-derived microparticles reveals distinct protein signatures when stimulated by different physiological agonists. *J Proteomics* **121**, 56-66, doi:10.1016/j.jprot.2015.03.013 (2015).
- 137 Kailashiya, J. Platelet-derived microparticles analysis: Techniques, challenges and recommendations. *Anal Biochem* **546**, 78-85, doi:10.1016/j.ab.2018.01.030 (2018).
- 138 Boilard, E., Duchez, A. C. & Brisson, A. The diversity of platelet microparticles. *Curr Opin Hematol* **22**, 437-444, doi:10.1097/MOH.000000000000166 (2015).
- 139 Pasquet, J. M., Dachary-Prigent, J. & Nurdent, A. T. Calcium influx is a determining factor of calpain activation and microparticle formation in platelets. *Eur J Biochem* **239**, 647-654, (1996).
- 140 Yano, Y., Kambayashi, J., Shiba, E., Sakon, M., Oiki, E., Fukuda, K., Kawasaki, T. & Mori, T. The role of protein phosphorylation and cytoskeletal reorganization in microparticle formation from the platelet plasma membrane. *Biochem J* **299**, 303-308, (1994).
- 141 Cauwenberghs, S. *et al.* Shedding of procoagulant microparticles from unstimulated platelets by integrin-mediated destabilization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett* **580**, 5313-5320, doi:10.1016/j.febslet.2006.08.082 (2006).

- 142 Boudreau, L. H. *et al.* Platelets release mitochondria serving as substrate for bactericidal group IIA-secreted phospholipase A2 to promote inflammation. *Blood* **124**, 2173-2183, doi:10.1182/blood-2014-05-573543 (2014).
- 143 Biró, E., Akkerman, J. W., Hoek, F. J., Gorter, G., Pronk, L. M., Sturk, A. & Nieuwland, R. The phospholipid composition and cholesterol content of platelet-derived microparticles: a comparison with platelet membrane fractions. *J Thromb Haemost* **3**, 2754-2763, doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01646.x (2005).
- 144 Antwi-Baffour, S. *et al.* Understanding the biosynthesis of platelets-derived extracellular vesicles. *Immun Inflamm Dis* **3**, 133-140, doi:10.1002/iid3.66 (2015).
- 145 Tabas, I., Garcia-Cardena, G. & Owens, G. K. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *J Cell Biol* **209**, 13-22, doi:10.1083/jcb.201412052 (2015).
- 146 Müller, I., Klocke, A., Alex, M., Kotsch, M., Luther, T., Morgenstern, E., Zieseniss, S., Zahler, S., Preissner, K. & Engelmann, B. Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB J* **17**, 476-478, doi:10.1096/fj.02-0574fje (2003).
- 147 Marcos-Ramiro, B., Oliva Nacarino, P., Serrano-Pertierra, E., Blanco-Gelaz, M. A., Weksler, B.B., Romero, I. A., Couraud, P. O., Tuñón A, López-Larrea, C., Millán, J. & Cernuda-Morollón, E. Microparticles in multiple sclerosis and clinically isolated syndrome: effect on endothelial barrier function. *BMC Neurosci* **15**, doi:10.1186/1471-2202-15-110. (2014).
- 148 Mause, S. F., von Hundelshausen, P., Zerneck, A., Koenen, R. R. & Weber, C. Platelet microparticles: a transcellular delivery system for RANTES promoting monocyte recruitment on endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 1512-1518, doi:10.1161/01.ATV.0000170133.43608.37 (2005).
- 149 Forlow, S. B., McEver, R. P. & Nollert, M. U. Leukocyte-leukocyte interactions mediated by platelet microparticles under flow. *Blood* **95**, 1317-1323, (2000).
- 150 Mayr, M. *et al.* Proteomics, metabolomics, and immunomics on microparticles derived from human atherosclerotic plaques. *Circ Cardiovasc Genet* **2**, 379-388, doi:10.1161/CIRCGENETICS.108.842849 (2009).
- 151 Böing, A. N., Hau, C. M., Sturk, A. & Nieuwland, R. Platelet microparticles contain active caspase 3. *Platelets* **19**, 96-103, doi:10.1080/09537100701777295. (2008).

- 152 Srinivasan, S., Vannberg, F. O. & Dixon, J. B. Lymphatic transport of exosomes as a rapid route of information dissemination to the lymph node. *Sci Rep* **6**, 24436, doi:10.1038/srep24436 (2016).
- 153 Hood, J. L., San, R. S. & Wickline, S. A. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Res* **71**, 3792-3801, doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-4455 (2011).
- 154 Rousseau, M. *et al.* Detection and quantification of microparticles from different cellular lineages using flow cytometry. Evaluation of the impact of secreted phospholipase A2 on microparticle assessment. *PLoS One* **10**, e0116812, doi:10.1371/journal.pone.0116812 (2015).
- 155 Lovett, J. A. C., Durcan, P. J. & Myburgh, K. H. Investigation of Circulating Extracellular Vesicle MicroRNA Following Two Consecutive Bouts of Muscle-Damaging Exercise. *Front Physiol* **9**, 1149, doi:10.3389/fphys.2018.01149 (2018).
- 156 Zolnierowicz, J., Ambrozek-Latecka, M., Kawiak, J., Wasilewska, D. & Hoser, G. Monitoring cell proliferation in vitro with different cellular fluorescent dyes. *Folia Histochem Cytobiol* **51**, 193-200, doi:10.5603/FHC.2013.0027. (2013).
- 157 Bisioendial, R. *et al.* Apolipoprotein A-I Limits the Negative Effect of Tumor Necrosis Factor on Lymphangiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **35**, 2443-2450, doi:10.1161/ATVBAHA.115.305777 (2015).
- 158 Mahmoud, A. M. *et al.* Endothelial microparticles prevent lipid-induced endothelial damage via Akt/eNOS signaling and reduced oxidative stress. *FASEB J* **31**, 4636-4648, doi:10.1096/fj.201601244RR (2017).
- 159 Zawieja, D. C., Greiner, S.T., Davis, K. L., Hinds, W.M. & Granger, H. J. Reactive oxygen metabolites inhibit spontaneous lymphatic contractions. *Am J Physiol* **260**, 1935-1943, doi:10.1152/ajpheart.1991.260.6.H1935 (1991).
- 160 Zolla, V., Nizamutdinova, I. T., Scharf, B., Clement, C.C., Maejima, D., Akl, T., Nagai, T., Luciani, P., Leroux, J.C., Halin, C., Stukes, S., Tiwari, S., Casadevall, A., Jacobs, W. R, Jr., Entenberg, D., Zawieja, D. C., Condeelis, J., Fooksman, D. R., Gashev, A. A. & Santambrogio, L. Aging-related anatomical and biochemical changes in lymphatic collectors impair lymph transport, fluid homeostasis, and pathogen clearance. *Aging Cell* **14**, 582-594, doi:10.1111/accel.12330 (2015).

- 161 Cointe, S. *et al.* Standardization of microparticle enumeration across different flow cytometry platforms: results of a multicenter collaborative workshop. *J Thromb Haemost* **15**, 187-193, doi:10.1111/jth.13514 (2017).
- 162 Robert, S., Poncelet, P., Lacroix, R., Raoult, D. & Dignat-George, F. More on: calibration for the measurement of microparticles: value of calibrated polystyrene beads for flow cytometry-based sizing of biological microparticles. *J Thromb Haemost* **9**, 1676-1678; author reply 1681-1672, doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04387.x (2011).
- 163 van der Pol, E. *et al.* Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry, nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing. *J Thromb Haemost* **12**, 1182-1192, doi:10.1111/jth.12602 (2014).
- 164 Gardiner, C. *et al.* Measurement of refractive index by nanoparticle tracking analysis reveals heterogeneity in extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* **3**, 25361, doi:10.3402/jev.v3.25361 (2014).
- 165 Tao, S. C., Guo, S. C. & Zhang, C. Q. Platelet-derived Extracellular Vesicles: An Emerging Therapeutic Approach. *Int J Biol Sci* **13**, 828-834, doi:10.7150/ijbs.19776 (2017).
- 166 Straat, M., Boing, A. N., Tuij-De Boer, A., Nieuwland, R. & Juffermans, N. P. Extracellular Vesicles from Red Blood Cell Products Induce a Strong Pro-Inflammatory Host Response, Dependent on Both Numbers and Storage Duration. *Transfus Med Hemother* **43**, 302-305, doi:10.1159/000442681 (2016).
- 167 Almizraq, R. J., Holovati, J. L. & Acker, J. P. Characteristics of Extracellular Vesicles in Red Blood Concentrates Change with Storage Time and Blood Manufacturing Method. *Transfus Med Hemother* **45**, 185-193, doi:10.1159/000486137 (2018).
- 168 Navarro-Nunez, L. *et al.* Platelet adhesion to podoplanin under flow is mediated by the receptor CLEC-2 and stabilised by Src/Syk-dependent platelet signalling. *Thromb Haemost* **113**, 1109-1120, doi:10.1160/TH14-09-0762 (2015).
- 169 Gitz, E., Pollitt, A. Y., Gitz-Francois, J.J., Alshehri, O., Mori, J., Montague, S., Nash, G.B., Douglas, M.R., Gardiner, E. E., Andrews, R. K., Buckley, C. D., Harrison, P. & Watson SP2. CLEC-2 expression is maintained on activated platelets and on platelet microparticles. *Blood* **124**, 2262-2270, doi:10.1182/blood-2014-05-572818 (2014).

- 170 Tomokiyo, K., Kamikubo, Y., Hanada, T., Araki, T., Nakatomi, Y., Ogata, Y., Jung, S. M., Nakagaki, T. & Moroi, M. Von Willebrand factor accelerates platelet adhesion and thrombus formation on a collagen surface in platelet-reduced blood under flow conditions. *Blood* **105**, 1078-1084, doi:10.1182/blood-2004-05-1827 (2005).
- 171 Pusztaszeri, M. P., Seelentag, W. & Bosman, F. T. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* **54**, 385-395, doi:10.1369/jhc.4A6514.2005 (2006).
- 172 Vajen, T. *et al.* Platelet extracellular vesicles induce a pro-inflammatory smooth muscle cell phenotype. *J Extracell Vesicles* **6**, 1322454, doi:10.1080/20013078.2017.1322454 (2017).
- 173 Li, K. Y., Zheng, L., Wang, Q. & Hu, Y. W. Characteristics of erythrocyte-derived microvesicles and its relation with atherosclerosis. *Atherosclerosis* **255**, 140-144, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2016.10.043 (2016).
- 174 Torzicky, M. *et al.* Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) and CD99 are critical in lymphatic transmigration of human dendritic cells. *J Invest Dermatol* **132**, 1149-1157, doi:10.1038/jid.2011.420 (2012).
- 175 Lertkiatmongkol, P., Liao, D., Mei, H., Hu, Y. & Newman, P. J. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *Curr Opin Hematol* **23**, 253-259, doi:10.1097/MOH.0000000000000239 (2016).
- 176 Gaugler, M. H., Vereycken-Holler, V., Squiban, C. & Aigueperse J. PECAM-1 (CD31) is required for interactions of platelets with endothelial cells after irradiation. *J Thromb Haemost* **2**, 2020-2026, doi:10.1111/j.1538-7836.2004.00951.x (2004).
- 177 Rosenblum, W. I., Murata, S., Nelson, G. H., Werner, P. K., Ranken, R. & Harmon, R.C. Anti-CD31 delays platelet adhesion/aggregation at sites of endothelial injury in mouse cerebral arterioles. *Am J Pathol* **145**, 33-36, (1994).
- 178 Rosenblum, W. I., Nelson, G. H., Wormley, B., Werner, P., Wang, J. & Shih, C. C. Role of platelet-endothelial cell adhesion molecule (PECAM) in platelet adhesion/aggregation over injured but not denuded endothelium in vivo and ex vivo. *Stroke* **27**, 709-711, (1996).

- 179 Wautier, M. P. *et al.* Red blood cell phosphatidylserine exposure is responsible for increased erythrocyte adhesion to endothelium in central retinal vein occlusion. *J Thromb Haemost* **9**, 1049-1055, doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04251.x (2011).
- 180 Bruno, S. & Darzynkiewicz, Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif* **25**, 31-40, (1992).
- 181 Finney, B. A., Schweighoffer, E., Navarro-Núñez, L., Bénézech, C., Barone, F., Hughes, C. E., Langan, S. A., Lowe, K. L., Pollitt, A. Y., Mourao-Sa, D., Sheardown, S., Nash, G. B., Smithers, N., Reis e Sousa, C., Tybulewicz, V. L. & Watson, S. P., CLEC-2 and Syk in the megakaryocytic/platelet lineage are essential for development. *Blood*. 2012 Feb 16;119(7):1747-56. doi: 10.1182/blood-2011-09-380709. (2012)
- 182 Wu, H. *et al.* Epsin deficiency promotes lymphangiogenesis through regulation of VEGFR3 degradation in diabetes. *J Clin Invest* **128**, 4025-4043, doi:10.1172/JCI96063 (2018).
- 183 Gkaliagkousi, E. & Albert Ferro, Nitric oxide signalling in the regulation of cardiovascular and platelet function. *Front Biosci (Lndmark Ed)* **16**, 1873-1897, (2001).
- 184 Horn, P. *et al.* Circulating microparticles carry a functional endothelial nitric oxide synthase that is decreased in patients with endothelial dysfunction. *J Am Heart Assoc* **2**, e003764, doi:10.1161/JAHA.112.003764 (2012).
- 185 Ryter, S. W., Kim, H. P., Hoetzel, A., Park, J. W., Nakahira, K., Wang, X. & Choi, A. M. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* **9**, 49-89, doi:10.1089/ars.2007.9.49 (2007).
- 186 Dimmeler, S. & Zeiher, A. M. Nitric oxide - an endothelial cell survival factor. *Cell death Differ* **6**, 964-968, doi :10.1038/sj.cdd.4400581 (1999).
- 187 Gao, C. *et al.* PECAM-1 functions as a specific and potent inhibitor of mitochondrial-dependent apoptosis. *Blood* **102**, 169-179, doi:10.1182/blood-2003-01-0003 (2003).
- 188 Bird, I. N., Taylor, V., Newton, J. P., Spragg, J. H., Simmons, D. L., Salmon, M. & Buckley, C. D., Homophilic PECAM-1(CD31) interactions prevent endothelial cell apoptosis but do not support cell spreading or migration. *Journal of Cell Science* **112**, 1989-1997, (1999).

- 189 Noble, K. E., Wickremasinghe, R. G., DeCornet, C., Panayiotidis, P. & Yong, K. L.,
Monocytes Stimulate Expression of the Bcl-2 Family Member, A1, in Endothelial
Cells and Confer Protection Against Apoptosis. *J Immunol* **162**, 1376-1383, (1999).
- 190 Evans, P. C., Taylor, E. R., Kilshaw, P. J. Signaling through CD31 protects endothelial
cells from apoptosis. *Transplantation* **71**, 457-460, (2001).
- 191 Kaminsky, V. O. & Zhivotovsky, B. Free radicals in cross talk between autophagy
and apoptosis. *Antioxid Redox Signal* **21**, 86-102, doi:10.1089/ars.2013.5746 (2014).
- 192 Patella, F. *et al.* In-Depth Proteomics Identifies a Role for Autophagy in Controlling
Reactive Oxygen Species Mediated Endothelial Permeability. *J Proteome Res* **15**,
2187-2197, doi:10.1021/acs.jproteome.6b00166 (2016).
- 193 Gan, P., Gao, Z., Zhao, X. & Qi, G. Surfactin inducing mitochondria-dependent ROS
to activate MAPKs, NF-kappaB and inflammasomes in macrophages for adjuvant
activity. *Sci Rep* **6**, 39303, doi:10.1038/srep39303 (2016).
- 194 Kitazume, S. *et al.* Interaction of platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM)
with alpha2,6-sialylated glycan regulates its cell surface residency and anti-apoptotic
role. *J Biol Chem* **289**, 27604-27613, doi:10.1074/jbc.M114.563585 (2014).
- 195 Suzuki, J., Denning, D. P., Imanishi, E., Horvitz, H. R. & Nagata, S. Xk-Related
Protein 8 and CED-8 Promote Phosphatidylserine Exposure in Apoptotic Cells.
Science **341** (6144), 403-406. doi: 10.1126/science.1236758 (2013).
- 196 Di, A., Mehta, D. & Malik, A. B. ROS-activated calcium signaling mechanisms
regulating endothelial barrier function. *Cell Calcium* **60**, 163-171,
doi:10.1016/j.ceca.2016.02.002 (2016).
- 197 Hatakeyama, T. *et al.* Endothelial nitric oxide synthase regulates microvascular
hyperpermeability in vivo. *J Physiol* **574**, 275-281, doi:10.1113/jphysiol.2006.108175
(2006).
- 198 Scallan, J. P., Hill, M. A. & Davis, M. J. Lymphatic vascular integrity is disrupted in
type 2 diabetes due to impaired nitric oxide signalling. *Cardiovasc Res* **107**, 89-97,
doi:10.1093/cvr/cvv117 (2015).
- 199 Ferrero, E., Ferrero, M. E., Pardi, R. & Zocchi, M. R. The platelet endothelial cell
adhesion molecule-1 (PECAM1) contributes to endothelial barrier function. *FEBS Lett*
374, 323-326, (1995).

- 200 They, C. *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* **7**, 1535750, doi:10.1080/20013078.2018.1535750 (2018).
- 201 Mangoni, A. A. *et al.* Protective Effects of Methotrexate against Proatherosclerotic Cytokines: A Review of the Evidence. *Mediators Inflamm* **2017**, 9632846, doi:10.1155/2017/9632846 (2017).
- 202 Cromer, W. E. *et al.* The effects of inflammatory cytokines on lymphatic endothelial barrier function. *Angiogenesis* **17**, 395-406, doi:10.1007/s10456-013-9393-2 (2014).

Tableaux et Figures supplémentaires

Tableaux supplémentaires

Tableau supplémentaire 1. Concentrations des échantillons de vésicules extracellulaires (VEs) dérivées de globules rouges et de plaquettes

Échantillon	Provenance	Concentration (VEs/ml)
1	Globules rouges	3.234E+07
2	Globules rouges	4.887E+07
3	Globules rouges	6.062E+07
4	Globules rouges	6.169E+07
5	Globules rouges	6.065E+07
6	Globules rouges	6.408E+07
7	Globules rouges	6.800E+07
8	Plaquettes	7.047E+07
9	Plaquettes	9.868E+06
10	Plaquettes	4.443E+07
11	Plaquettes	3.531E+07
12	Plaquettes	8.395E+07
13	Plaquettes	7.206E+07
14	Plaquettes	1.524E+08

Les VEs ont été produites à partir de globules rouges et plaquettes circulants prélevés chez des volontaires sains tel que décrit dans la section *Matériel et méthodes*.

Figures supplémentaires

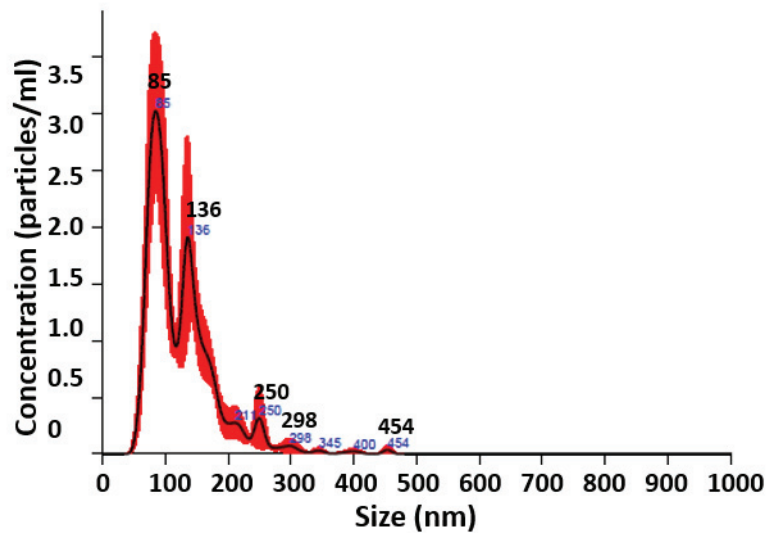


Figure supplémentaire 1. Caractérisation de VEs d'origine plaquettaire et isolées du sang de patient. Un échantillon de VEs dérivées de plaquettes isolées du sang de patient à l'aide d'un trieur cellulaire FacsFusion a été analysé par nanoparticle tracking analysis (NTA) pour en estimer la taille.

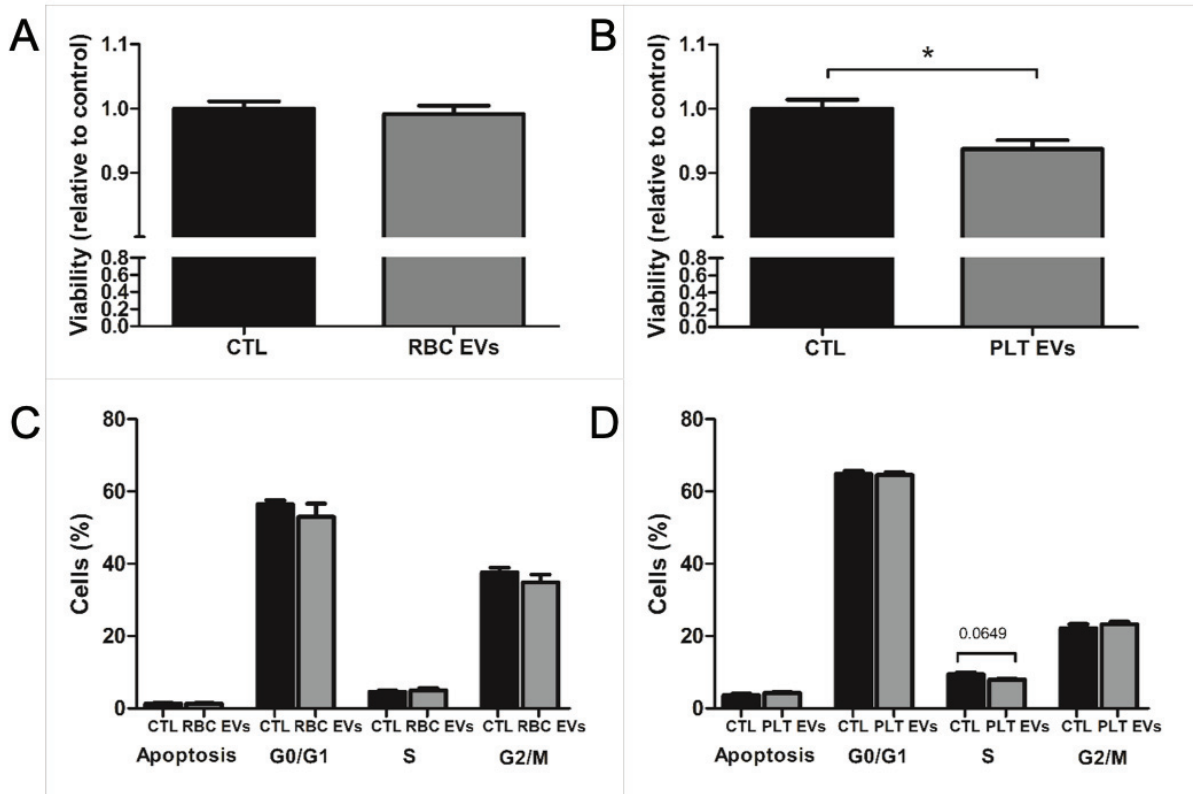


Figure supplémentaire 2. Effets des VE dérivées de globules rouges et de plaquettes sur la viabilité et le cycle cellulaire des HMVECs. Effets (A) des VE^{GR} ou (B) des VE^{PLT} sur la viabilité des HMVECs suivant 4 heures. Effets (C) des VE^{GR} ou (D) des VE^{PLT} sur le cycle cellulaire des HMVECs suivant 4 heures. N= 6-7 par groupe; * $p < 0,05$. Test de Mann Whitney non pairé.

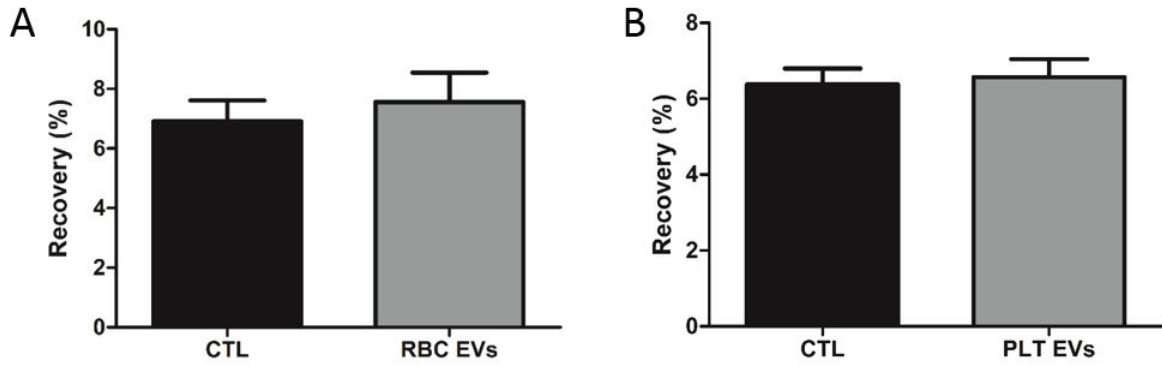


Figure supplémentaire 3. Effets des vésicules extracellulaires dérivées de globules rouges et de plaquettes sur la migration des HMVECs. Quantification de la migration des HMVECs en présence (A) de VE^{GR} ou (B) de VE^{PLT} suivant 4 heures. La migration a été évaluée par l'aire de la blessure initiale nouvellement recouverte par les HMVECs suivant les traitements (%). N= 6 par groupe; Test de Mann Whitney non pairé.

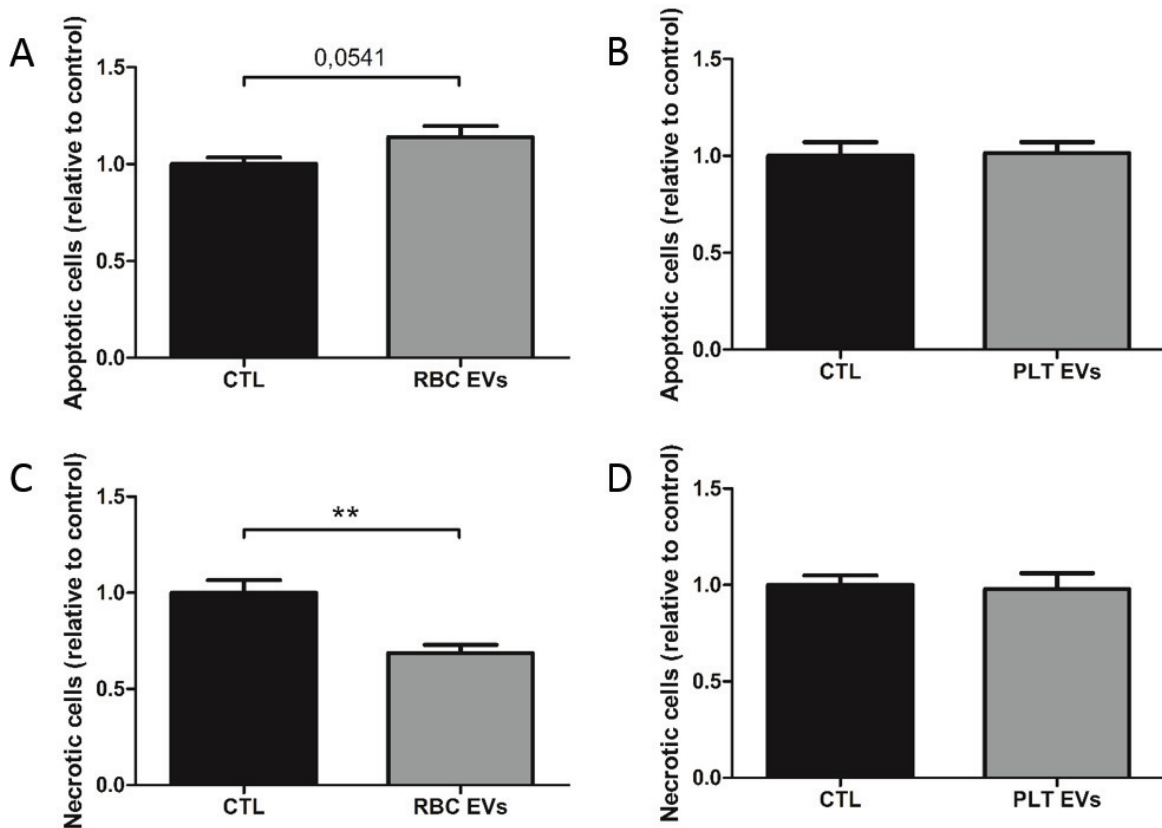


Figure supplémentaire 4. Effets des VEs dérivées de globules rouges et des VEs dérivées de plaquettes sur la mort cellulaire des HMVECs. Quantification de l'apoptose chez les HMVECs traitées avec (A) des VE^{GR} ou (B) des VE^{PLT} . Quantification de la nécrose chez les HMVECs traitées avec (C) des VE^{GR} ou (D) des VE^{PLT} . Le marquage avec de l'iodure de propidium et des anticorps anti-annexin V a été utilisé pour évaluer l'apoptose et la nécrose chez les HMVECs. Les cellules ont été analysées par cytométrie en flux (BD, Celesta). N= 6-7 par groupe; * $p < 0,05$ et ** $< 0,01$. Test de Mann Whitney non païré.

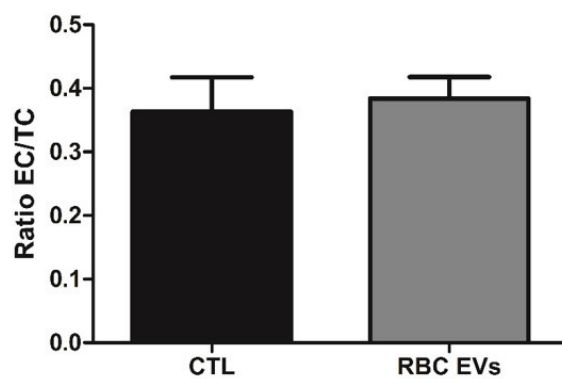


Figure supplémentaire 5. Effets des VEs dérivées de globules rouges sur le ratio cholestérol estérifié/cholestérol total. Quantification du ratio cholestérol estérifié/cholestérol total chez les HMVECs traitées avec des VEs dérivées de globules rouges durant 24 heures.

**Apolipoprotein A-1 Modulates Atherosclerosis Through
Lymphatic Vessel-Dependant Mechanisms in Mice**

Apolipoprotein A-I Modulates Atherosclerosis Through Lymphatic Vessel-Dependent Mechanisms in Mice

Andreea Milasan, MSc; Gabriel Jean, BSc; François Dallaire, MSc; Jean-Claude Tardif, MD; Yahye Merhi, PhD; Mary Sorci-Thomas, PhD; Catherine Martel, PhD

Background—Subcutaneously injected lipid-free apoA-I (apolipoprotein A-I) reduces accumulation of lipid and immune cells within the aortic root of hypercholesterolemic mice without increasing high-density lipoprotein–cholesterol concentrations. Lymphatic vessels are now recognized as prerequisite players in the modulation of cholesterol removal from the artery wall in experimental conditions of plaque regression, and particular attention has been brought to the role of the collecting lymphatic vessels in early atherosclerosis-related lymphatic dysfunction. In the present study, we address whether and how preservation of collecting lymphatic function contributes to the protective effect of apoA-I.

Methods and Results—Atherosclerotic *Ldlr*^{−/−} mice treated with low-dose lipid-free apoA-I showed enhanced lymphatic transport and abrogated collecting lymphatic vessel permeability in atherosclerotic *Ldlr*^{−/−} mice when compared with albumin-control mice. Treatment of human lymphatic endothelial cells with apoA-I increased the adhesion of human platelets on lymphatic endothelial cells, in a bridge-like manner, a mechanism that could strengthen endothelial cell–cell junctions and limit atherosclerosis-associated collecting lymphatic vessel dysfunction. Experiments performed with blood platelets isolated from apoA-I-treated *Ldlr*^{−/−} mice revealed that apoA-I decreased ex vivo platelet aggregation. This suggests that in vivo apoA-I treatment limits platelet thrombotic potential in blood while maintaining the platelet activity needed to sustain adequate lymphatic function.

Conclusions—Altogether, we bring forward a new pleiotropic role for apoA-I in lymphatic function and unveil new potential therapeutic targets for the prevention and treatment of atherosclerosis. (*J Am Heart Assoc.* 2017;6:e006892. DOI: 10.1161/JAHA.117.006892.)

Key Words: apolipoprotein A-I • atherosclerosis • collecting lymphatic vessels • platelets

The lymphatic system is an open, unidirectional system playing multiple roles in immunity, chylomicron transport, and clearance of wastes from the periphery.¹ It is characterized by a network of vessels that carry a clear fluid called lymph. Sequentially, ultrafiltrates from peripheral

tissues are absorbed by initial lymphatics (also called lymphatic capillaries), a highly permeable and specialized compartment constituted by discontinuous “button-like” junctions between endothelial cells.² These initial lymphatics are characterized by the absence of smooth muscle cells and the presence of lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor (LYVE-1) at the surface of lymphatic endothelial cells (LECs).³ Following its absorption, lymph moves on to converge into larger vessels called collecting lymphatic vessels that are partially covered with smooth muscle cells, and characterized by the expression of podoplanin.⁴ Collecting vessels are composed of contractile lymphangions that propel lymph in a unidirectional manner, with the help of intraluminal bi-leaflet valves, as well as smooth muscle cells. Eventually, lymph passes through the lymphovenous junction and reaches the blood circulation via the subclavian vein.⁵ Junctional organization of LECs in initial lymphatics and collecting vessels is crucial to vessel integrity. The transcriptional factor FOXC2 (Forkhead box protein C2) has been identified to play a key role in cell–cell junctions and lymphatic valve integrity. Depletion of FOXC2 has led to major lymphatic dysfunction and lethality.⁶ However, many

From the Department of Medicine, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada (A.M., G.J., J.-C.T., Y.M., C.M.); Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec, Canada (A.M., F.D., G.J., J.-C.T., Y.M., C.M.); Department of Medicine, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI (M.S.-T.).

Accompanying Figures S1 through S5 are available at <http://jaha.ahajournals.org/content/6/9/e006892/DC1/embed/inline-supplementary-material-1.pdf>

Correspondence to: Catherine Martel, PhD, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Montreal Heart Institute Research Center, Université de Montréal, 5000, Belanger St, Room S5100, Montreal, Quebec, Canada H1T 1C8. E-mail: catherine.martel@icm-mhi.org

Received June 9, 2017; accepted August 4, 2017.

© 2017 The Authors. Published on behalf of the American Heart Association, Inc., by Wiley. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

Clinical Perspective

What Is New?

- We bring forward a new pleiotropic role for apolipoprotein A-I in preserving and restoring lymphatic function by direct and indirect mechanisms that include platelet activity.

What Are the Clinical Implications?

- Our work unveils new potential therapeutic targets for the prevention and treatment of atherosclerosis.

other different transcription factors regulate lymphatic development. Interestingly, it has been shown that during embryogenesis, lymphatic system separation from blood vessels requires platelet activity.⁷ Indeed, platelets regulate the blood/lymphatic vessel separation by inhibiting the proliferation, migration, and tube formation of LECs, upon the interaction of C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2) with podoplanin.⁸ Platelet activity has also been shown to be required throughout life in order to maintain the lymphovenous junction integrity.⁵ In addition to the hemostatic role of platelets in maintaining lymphatic⁵ and blood vessel integrity,⁹ platelets have been shown to act through their secreted active releasates and platelet microparticles, also called extracellular vesicles (EVs), to promote inflammation^{10–12} and conversely, to secure inflamed vessels.^{13,14} Platelet-derived EVs are abundant in blood circulation,¹⁵ and we have reported, for the first time, that platelet-derived EVs are present in mouse lymph.¹⁶

The lymphatic network plays an important role in inflammatory and autoimmune diseases, cancer, lymphedema, graft rejection, and wound healing.^{17–19} The concept that lymphatic vessels could influence atherogenesis and lipoprotein transport has first been brought forward several decades ago.^{20–22} However, we had to wait until recently to directly associate the lymphatic system with atherosclerosis,^{23–27} a disease driven by the accumulation of cholesterol in the artery wall, primarily by low-density lipoprotein, leading to increased plaque buildup.²⁸ It has been described that without a functional lymphatic network, cholesterol excreted from plaque macrophages cannot be properly conducted out of the artery wall, and thus cannot be evacuated.²⁶ The mechanisms responsible for the interplay between lymphatic function and the onset or progression of atherosclerosis remain under intensive investigation. In that perspective, our group has recently demonstrated that the lymphatic impairment observed during atherosclerosis first affects the collecting lymphatic vessels rather than the initial lymphatics, a defect that was detectable even before plaque formation.²⁴

Whereas the adventitial lymphatic vessels are now accepted as important modulators of cholesterol transport between the atherosclerotic lesion and the bloodstream, the apoA-I (apolipoprotein A-I) has been identified as a key regulator of cellular cholesterol efflux via the ABCA1 receptor present at the cell surface.^{29,30} ApoA-I is the main protein constituent of plasma high-density lipoprotein (HDL) and participates in its highly heterogeneous properties.^{31,32} Whereas subcutaneous injections of low-dose lipid-free apoA-I treatment do not significantly increase plasma HDL-cholesterol concentrations, lipid-free apoA-I reduces excess cellular cholesterol and reverses the autoimmune-like phenotype that develops in high cholesterol diet-fed *Ldlr*^{-/-} apoA-I^{-/-} double knockout mice.³³ Recently, the mechanistic basis explaining this protective effect of small and consistent amounts of apoA-I in reducing lipid and immune cell accumulation within the aortic root has emerged. HDL and apoA-I have been shown to modify atherogenic and antigen presentation properties by interfering with the cell membrane lipid raft.^{34–36} In the same vein, it has been demonstrated that apoA-I acts in hypercholesterolemic mice by systemically reducing excess cellular cholesterol accumulation in membrane lipid rafts.³⁷ The latter are tightly regulated microdomains contained in cell membranes and they form a platform responsible for organizing the signaling of receptors and proteins of various cell types. In a recent publication, in vitro treatment with apoA-I, on a tumor necrosis factor- α background, has been found to cause lymphangiogenesis. ApoA-I treatment has been demonstrated to increase podoplanin mRNA level, which could potentially help the CLEC-2/podoplanin interaction with platelets.³⁸

In the present study, we hypothesize that the protective effect of apoA-I is mediated at least in part by preserving collecting lymphatic vessel function by mechanisms that include modulating platelet adhesion on LECs. Our findings could bring forth a new pleiotropic role for apoA-I in lymphatic function and unveil new potential therapeutic targets for the prevention and treatment of atherosclerosis.

Methods

Experimental Setup

Ldlr^{-/-} mice on a C57BL/6 background were purchased from Jackson Laboratories. Animals were housed in a pathogen-free environment under 12-hour light–dark cycles with free access to water. The experimental design of the in vivo section of our study is illustrated in Figure 1A. Female *Ldlr*^{-/-} mice at 6 weeks of age were fed a high-fat diet (HFD—adjusted calories diet, 0.2% total cholesterol and 42% from fat, Harlan 88137) for 8 weeks, after which they were

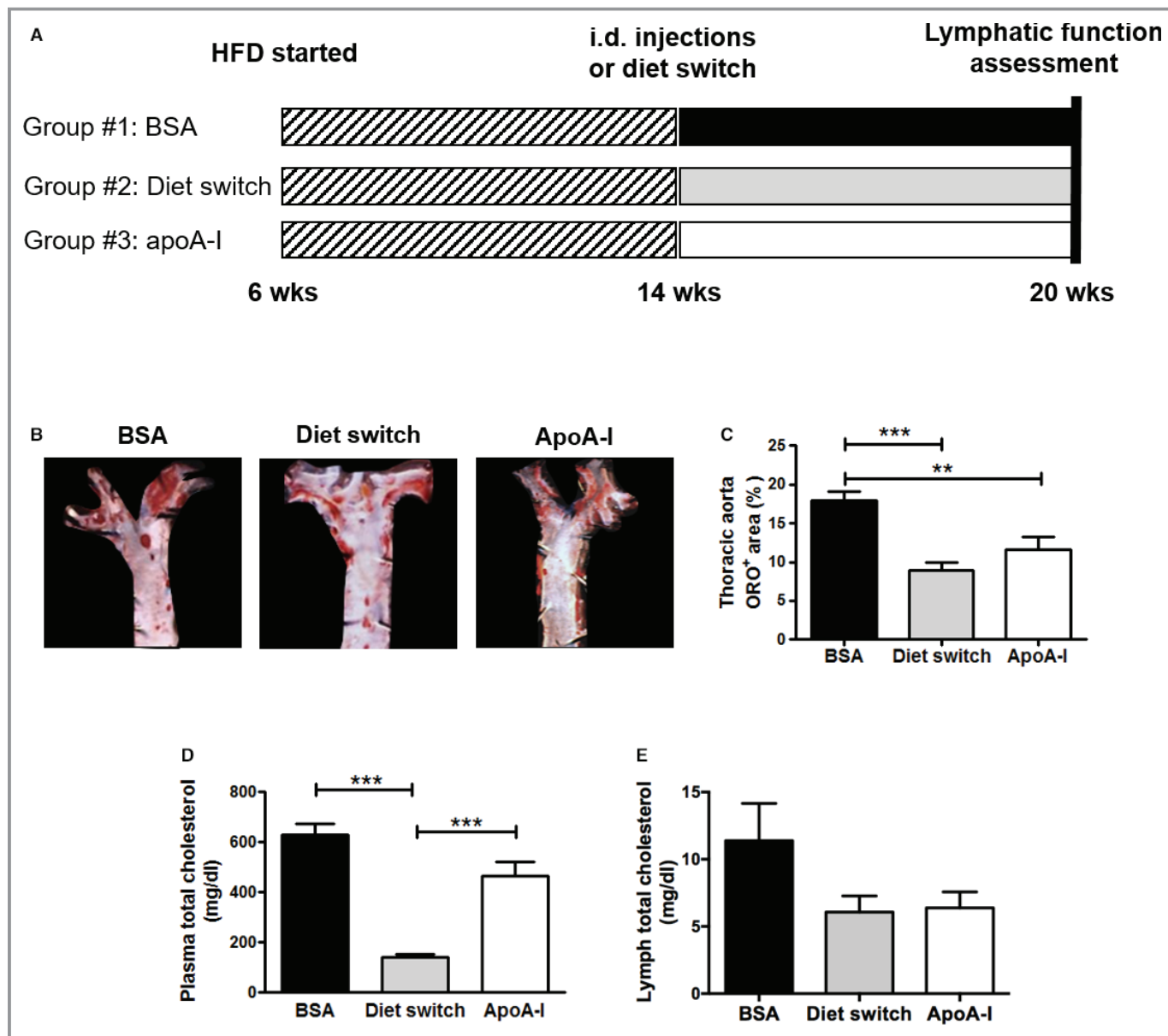


Figure 1. Study design and assessment of circulating total cholesterol and lipid deposition in *Ldlr*^{-/-} mice. A, Pictogram of the experimental design used. At 6 weeks of age, female *Ldlr*^{-/-} mice began a high-fat diet (HFD, hatched bar). After 8 weeks, mice were divided into 3 groups. Two groups (groups #1 and #3) remained on the HFD during the treatment phase of the study and were divided as follows: group #1—intradermal (i.d.) injections of 200 μ g of BSA, 3 times/wk (black bar); group #3—intradermal injections of 200 μ g of lipid-free apolipoprotein A-I (apoA-I), 3 times/wk (white bar). Group #2 was switched on a chow diet instead of receiving injections (light gray bar). After 20 wks of age, the mice were evaluated and lymphatic function assessed. B and C, Neutral lipid- (Oil Red O; ORO) area was quantified in the 3 groups of mice (en face) using ImageJ software. Experiments were performed with 7 to 11 mice per experimental group. Total cholesterol was assessed in (D) plasma and (E) lymph of BSA-, diet switch-, and apoA-I-treated *Ldlr*^{-/-} mice. Experiments were performed with 4 mice per experimental group. ** $P \leq 0.01$ and *** $P \leq 0.001$, as determined by 1-way ANOVA with Tukey's post-hoc test.

separated into 3 age-matched groups for a period of 6 more weeks. To assess the direct effect of apoA-I on lymphatic function, 1 group was injected intradermally with lipid-free apoA-I (200 μ g/25 g of body weight) 3 times a week for 6 weeks while still under a HFD. The control group received concentration-matched BSA alone. A third group was switched to standard chow diet, in order to lower plasma

cholesterol and promote lesion regression.³⁹ At the end of the sixth week, lymphatic function assays were performed and blood and lymph were collected under anesthetic conditions. Following this, mice were euthanized by cardiac puncture following ketamine anesthesia (100 mg/mL ketamine administered at 0.10 mL/10 g of body weight), or by carbon dioxide (CO₂), and were perfused with 15 mL PBS. Finally,

organs were collected. All experiments were performed in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines and approved by the Montreal Heart Institute Animal Care Committee.

ApoA-I Preparation

ApoA-I was purified from human plasma by sequential ultracentrifugation as previously described.³³ The apoA-I was lyophilized to dryness, dissolved in 6 mol/L guanidine hydrochloride, and then refolded by dialyzing exhaustively against 10 mmol/L ammonium bicarbonate, pH 7.4. Mass spectrometry and 12% SDS-PAGE were used to ensure that there were no contaminating proteins and that apoA-I methionines were not oxidized to the sulfoxide form, a common contaminant in apoA-I preparations. Protein concentration was determined using the Lowry assay.²⁹

ApoA-I Kinetics

To ensure that the lipid-free apoA-I injected was absorbed by the initial lymphatics present in the back skin dermis and that apoA-I kinetics in lymph reflect that of blood, we used wild type mice on a C57BL/6 background purchased from the Jackson Laboratories (Figure S1). Wild type mice were anesthetized with isoflurane (4% for induction, 2–3% for maintenance). For lymph collection, the animal was anesthetized and positioned on its right side. A cannula was inserted into the thoracic lymph duct above the cisterna chyli between the transverse lumbar artery and the diaphragm as previously described.¹⁶ Lymph was collected continuously for 45 minutes with a tube attached to a syringe coated with EDTA 0.1 mol/L. Blood was collected by cardiac puncture with a syringe coated with EDTA 0.1 mol/L followed by euthanasia of the animal. Collected lymph was centrifuged at 1200g for 10 minutes and blood was centrifuged at 2400g for 10 minutes. To avoid thawing-related damage on lipoprotein conformation, sucrose (5%) was added before samples were stored at -80°C for further batch analysis. Human ApoA-I was measured by ELISA tests.

Lymphatic Functional Assessment

Lymphatic function was assessed by 3 complementary methods. First, the propensity of dendritic cells to migrate through the lymphatic vessels from the periphery to draining lymph nodes (LNs) was measured as described previously.⁴⁰ The animals were euthanized 18 hours after the application of a solution that contains fluorescein isothiocyanate (FITC), dibutyl phthalate, and acetone solution, in order to instigate an immune response and thus dendritic cell trafficking. Of

importance, FITC was applied to a different location than the apoA-I injection site, as our interest was to assess the global lymphatic function. The corresponding skin-draining LNs were recovered and enzymatically digested in collagenase D for 25 minutes at 37°C . Cells were then passed through a 70- μm cell strainer, washed, counted, and stained for analysis by flow cytometry (BD Biosciences LSR II). Conjugated antibodies CD11b PerCp-Cy5.5 (BioLegend, CA101227-BL), CD11c PeCy7 (Tonbo Biosciences, 60-0114), MHCII-VioletFluor 450 (Tonbo Biosciences, 75-5321), and CD45-APC (Tonbo Biosciences, 20-0451) were used. The number of dendritic cells that uptake FITC and traveled to the corresponding skin-draining LN was then counted based on the total LN cellularity (% of FITC⁺ cells \times # of cells/LN).

Second, lymphatic vessel permeability was assessed using Evans Blue dye for tracing the path of lymph through popliteal lymphatic vessels.²⁴ Mice were anesthetized with isoflurane and following Evans Blue intradermal injection in the footpad, popliteal collecting lymphatic vessels were visualized using a Stereo Discovery V8 (Zeiss). Both the effusion of Evans Blue around the vessel, as well as the area the leakage covers were analyzed using ImageJ software.

Third, lymphatic function was assessed by quantifying the dermal clearance of dextran by the initial lymphatics, as described previously.⁴¹ Briefly, a total of 1 μL fluorescent (Cy5) dextran (70 kDa) at a concentration of 2 mg/mL in sterile PBS was injected intradermally in the ear pinnae of anesthetized mice. Because of its large size, the tracer is specifically uptaken by blind-ended lymphatic capillaries, avoiding absorption by blood capillaries. Fluorescence decay was observed through the skin using a fluorescence stereomicroscope and images of the skin were acquired every minute for 30 minutes. The rate of clearance was determined by calculating the area under the curve of fluorescence intensity at each time point, and normalized to the initial value. The normalized rate of fluorescence decay was then calculated from the slope of area under the curve versus time, which is considered proportional to the actual rate of dextran-Cy5 clearance.

Mouse Platelet Isolation

Mouse blood was withdrawn in 1-mL syringe containing 50 μL of diluted heparin (dilute stock heparin 1:10 to obtain 1000 U/mL). Blood from 2 to 3 mice was pooled to obtain sufficient platelets. Blood was then diluted in Tyrode's buffer (1/2) containing 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of prostaglandin E1 (Sigma) and centrifuged at 164g for 8 minutes. An additional centrifugation was made with diluted red blood cells in Tyrode's buffer containing 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of prostaglandin E1 to obtain more platelets. Prostaglandin E1 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was added to the pooled platelet-rich plasma and centrifuged at 1000g for

5 minutes. The pellet was resuspended in modified Tyrode's buffer at a concentration of 250×10^6 platelets/mL.

Mouse Platelet Aggregation

Isolated platelets were submitted to a constant shear rate (1000 rpm) at 37°C in a 4-channel optical aggregometer (Chronolog Corp.). A volume of 250 μ L of the washed platelet preparation was used per channel. Platelet aggregation was then induced with high concentration of thrombin (0.5–1 U/mL) in the first channel or podoplanin (5 μ g/mL) in the second channel, and the percent aggregation was recorded when platelets reached a plateau.

Immunoblotting of Mouse Platelets

Following aggregations, platelets were lysed by adding 62.5 μ L of 4X SDS in 250 μ L of washed platelets, and heated at 95°C for 5 minutes. Samples were stored at –20°C until further analysis. Proteins from the 3 mouse groups' platelets were separated by 10% SDS-PAGE followed by its transfer to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked with 5% nonfat dry milk for 1 hour at room temperature. Antibodies against CLEC-2 (R&D Systems, AF1718) and pAkt (Cell Signalling, 9275) were incubated with the membranes overnight at 4°C, and a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Abcam, AB6741) was used for detection using the Western Lightning Ultra chemiluminescence kit (PerkinElmer).

Organ Harvesting

LNs, ears, dermal back skin sections, aortas, hearts, and popliteal collecting lymphatic vessels were harvested and either freshly processed for flow cytometry analysis and/or Western blots, or fixed in 4% paraformaldehyde and 10% formalin for future analysis.

Immunohistochemistry and Immunofluorescence of the Skin Dermis

The back skin of the animals was shaved and harvested, fixed in 10% formalin, and embedded in paraffin. Eight-micrometer (μ m)-thick back-skin sections were stained with hematoxylin and eosin. Pictures were taken with an Olympus B45 microscope and visualized using ImagePro Plus 7.0 software. Another batch of 8- μ m-thick back-skin sections was incubated with anti-CD206 (Abcam, ab64693), -CD68 (Biolegend, 137001), and -LYVE-1 (Abcam, ab14917) antibodies. Secondary antibodies anti-Alexa-fluor 555 (Abcam, ab150074), -Cy3, and -Cy5 (Jackson ImmunoResearch, 712-165-150 and 711-606-152, respectively), as well as 4',6-diamidino-2-

phenylindole (DAPI) were then added and images were acquired with an LSM 710 Confocal Microscope (Zeiss) equipped with a $\times 63/1.4$ oil dic objective.

Immunofluorescence of the Collecting Lymphatic Vessel

Popliteal collecting lymphatic vessels were identified following Evans Blue dye intradermal injection as described above, and harvested. For analysis of vessel integrity, whole-mount immunofluorescence analysis following incubation with anti-smooth muscle actin already coupled to FITC (Sigma) and -FOXC2 (R&D Systems, AF6989) antibodies was performed on isolated popliteal lymphatics of mice. Secondary antibody donkey anti-sheep 555 (Jackson ImmunoResearch, 713-165-147) and DAPI were then added. Images were acquired with an LSM 710 Confocal Microscope (Zeiss) equipped with a $\times 63/1.4$ oil dic objective. All image handling was performed using ImageJ software.

Atherosclerotic Lesion and Initial Lymphatic Density Quantification

The heart and aorta were removed and fixed in 4% paraformaldehyde for 2 hours. The heart was transferred into PBS containing 30% sucrose (wt/vol) overnight at 4°C before being immersed in optimal cutting temperature compound and stored at –80°C. Eight-micrometer-thick cryosections of the aortic sinus were prepared. Cross-sections of the aortic sinus were stained with anti-LYVE-1 (Abcam, ab14917) and anti-CD68 (Biolegend, 137001) antibodies, and then incubated with the appropriate secondary antibodies. As macrophages can also be positive for LYVE-1, adventitial initial lymphatics were identified as LYVE-1⁺CD68[–] cells forming vessel-like shapes. Whole-mount immunohistochemical analysis of the ear dermis to visualize lymphatic vessels was performed as described previously.⁴² Ear dermis was stained for lymphatic capillaries (anti-LYVE-1, Abcam) at 4°C, and then sections were incubated with Alexa Fluor 647-conjugated donkey anti-rabbit antibody and Cy3 donkey anti-rat (Jackson ImmunoResearch, 711-606-152 and 712-165-150, respectively). All imaging was performed on a Fluoview FV10i (Olympus). Vessel counts were performed by 1 observer. The relative quantification of the number of initial lymphatics (LYVE-1⁺ vessels), their diameter, and the total surface area they occupy was determined by computer-assisted morphometric analysis. Aortas were cleaned by removing the surrounding fat and were then split along their outer curvature. Neutral lipid assessment in atherosclerotic lesions in the aortic sinus and en face aorta was performed by Oil-red-O (ORO) staining (Sigma, O-0625).

Human Platelet Isolation

All experiments performed with human specimens were approved by our institutional review committee and every subject gave informed consent. Human blood from healthy donors was collected with a syringe containing Anticoagulant Citrate Dextrose Solution and centrifuged at 200g for 15 minutes. Prostaglandin E1 (1 μ g/mL) was added to the platelet-rich plasma and centrifuged at 1000g for 10 minutes. Platelets were washed with Hanks balanced salt solution citrate buffer and the suspension was centrifuged at 800g for 10 minutes. Lastly, platelets were resuspended in Hanks balanced salt solution for a total concentration of 250×10^6 platelets/mL.

Cell Culture

Primary human dermal lymphatic microvascular endothelial cells-adult (HMVEC-dLyAd) were cultured according to the manufacturer's protocol (Lonza) in EBM-2 medium containing the EGM-2 MV SingleQuots. Cells were seeded in 1 μ -Slide VI^{0.4} tissue culture treated flow chamber (Ibidi) or in a glass-bottom culture dishes chamber (Mattek) for experiments that did not require a steady perfusion flow rate. In both of these cases, HMVEC-dLyAd at 80% confluence were treated with apoA-I (0.6 mg/mL) for 24 hours.

Platelet Perfusion Under Physiological Lymph Flow

Following treatment, for underflow, isolated human washed platelets were perfused over the HMVEC-dLyAd at a wall shear rate of 50/s at 37°C for 8 minutes. PBS was then added to remove the nonadhered platelets. For static treatments, the HMVEC-dLy-Ad were treated with washed platelets for 1 hour. Cells were then fixed with paraformaldehyde 2% and immunofluorescence analysis was performed following incubation with anti-CD61 (Clone: VI-PL2, Biolegend).

Immunoblotting of Human Lymphatic Endothelial Cells

Proteins were extracted using radioimmunoprecipitation assay buffer and the protein concentration was established using the Bradford Protein Assay Kit (Bio Basic). Protein samples were diluted in 4X Laemmli buffer, then heated at 95°C for 5 minutes. Proteins were separated by electrophoresis on a 12% SDS-PAGE, then transferred on nitrocellulose membranes. The membranes were blocked with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline (TBST, 0.1% Tween 20) for 1 hour at room temperature, then incubated with an anti-podoplanin (OriGene, DP3512S), an anti-vascular endothelial growth

factor receptor (VEGFR)-3 (Abcam, AB27278), or an anti-beta-actin (Abcam, AB8227) overnight at 4°C. The membranes were washed with TBST and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Abcam, AB6721 and AB6721) for 1 hour at room temperature. Western Lightning Ultra chemiluminescence kit (PerkinElmer) was used for detection. Each sample was normalized with its respective beta-actin expression.

Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase Activity

Plasma and lymph from the 3 mouse groups was used to assess total platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) activity. We used the Cayman's platelet-activating factor (PAF) Acetylhydrolase Assay Kit (Cayman Chemical, 760901) and followed manufacturer instructions.

Statistical Analyses

Data are presented as mean and SEM. Statistical differences were assessed using a 2-tailed parametric Student *t* test, ANOVA or nonparametric tests, with $P < 0.05$ reported as statistically significant, using Prism software version 6.0 c (GraphPad) or SPSS version 23.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Study Approval

All animal studies were performed in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines and approved by the Montreal Heart Institute Animal Care Committee. All experiments performed with human specimens were approved by our institutional review committee and every subject gave written informed consent before inclusion in the study.

Results

ApoA-I Treatment Reduces Aortic Lipid Without Significantly Affecting Total Cholesterol Level in *Ldlr*^{-/-} Mice

As our goal is to assess the effect of apoA-I on the lymphatic vasculature per se, we performed intradermal injections to allow a more direct drug uptake by the dermal initial lymphatic vessels (experimental design illustrated in Figure 1A). After subtracting the background value, we first measured the time course appearance of human apoA-I in plasma and lymph following intradermal injection of lipid-free apoA-I in HFD-fed *Ldlr*^{-/-} mice, and confirmed that the injected apoA-I reach lymph efficiently. Approximately 1.5%

and 3% of the injected human apoA-I appears and peaks by 3 and 8 hours postinjection, in lymph and blood, respectively (Figure S1).

We next tested the effect of this route of injection on the extent of atherosclerosis in our 3 groups of mice. En face aorta ORO⁺ staining is decreased following apoA-I treatment; Figure 1B shows representative images of the atherosclerotic lesions present in the thoracic aorta, as assessed after staining with ORO. The results of ORO quantification are expressed as percent of total surface (Figure 1C). *Ldlr*^{-/-} mice that have been switched from a HFD to a chow diet have significantly less plasma cholesterol than control- (BSA-) or apoA-I-treated mice on continuous HFD (Figure 1D). ApoA-I does not significantly decrease plasma (Figure 1D) or lymph (Figure 1E) cholesterol compared with control. Contrarily to mice that had been switched to a chow diet, apoA-I treatment, when injected intradermally, did not, however, significantly reduce lesion size or ORO area, nor CD68⁺ cells in the aortic sinus (Figure S2A through S2C, respectively) of *Ldlr*^{-/-} mice fed for 8 weeks on a HFD. Figure S2D and S2E show representative images of the aortic root stained with ORO and CD68 antibody, respectively.

ApoA-I Restores Systemic Cellular Lymphatic Transport in *Ldlr*^{-/-} Mice

To test whether apoA-I might exert its beneficial effects through its interaction with the lymphatic system, we first measured the transport of dendritic cells from the peripheral tissue (skin) to the corresponding draining LN through the lymphatic system in our different groups.⁴⁰ We show that apoA-I treatment rescues lymphatic function in

atherosclerotic HFD-fed *Ldlr*^{-/-} mice, with respect to the number of dendritic cells that have migrated from the skin to the corresponding draining LN (Figure 2A). In diet switch mice, this effect was not seen, despite a decrease in plasma cholesterol as previously illustrated (Figure 1D). In addition to improving dendritic cell transport from peripheral tissues, this low-dose apoA-I treatment was associated with accumulation of fewer immune cells in the skin dermis of *Ldlr*^{-/-} mice. CD206⁺ (Figure 2B) and CD68⁺ (Figure 2C) macrophage levels were decreased in apoA-I-treated mice. Whereas resident CD206⁺ macrophages are significantly less abundant in the diet switch group, CD68⁺ macrophages density was not significantly affected by this decrease in plasma cholesterol.

ApoA-I Does Not Alter Obesity-Related Parameters

Obesity causes chronic systemic and local inflammation,⁴³ and impairs lymphatic function.⁴⁴ We therefore sought to investigate whether apoA-I could have acted on lymphatic transport by first reducing obesity-related parameters. Our results revealed that subcutaneous adipose tissue (Figure 3A and 3B), visceral fat (Figure 3C), or total body weight variation (Figure 3D) in *Ldlr*^{-/-} mice are not a priori affected following apoA-I treatment in our experimental design.

ApoA-I Enhances the Prevalence of Initial Lymphatic Vessel Number Without Affecting Their Function

We have recently demonstrated that lymphatic dysfunction, at least in an early stage of atherosclerotic disease, is mainly

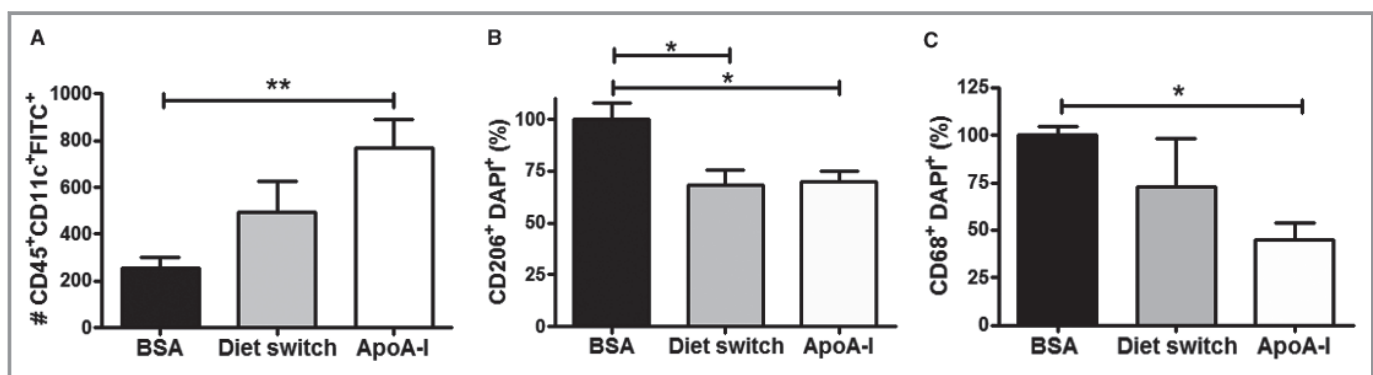


Figure 2. Effect of apoA-I on systemic cellular lymphatic transport in *Ldlr*^{-/-} mice. Using a contact sensitization assay, the assessment of dendritic cell migration through the lymphatic was assessed by flow cytometry. Skin-draining lymph nodes were harvested after 18 hours and the number of dendritic cells that migrated from the skin to the lymph node was determined. We quantified the (A) number of CD45⁺CD11c⁺FITC⁺ cells in BSA-, diet switch-, and apoA-I-treated *Ldlr*^{-/-} mice. Experiments were performed using 5 to 8 mice per experimental group (mean±SEM). Analysis was performed using a BD LSRII flow cytometer. The percentage of (B) CD206⁺DAPI⁺ and (C) CD68⁺DAPI⁺ macrophages were quantified in 10- μ m-thick skin sections from the 3 groups of mice. Experiments were performed with 7 to 11 mice per experimental group and were quantified using ImageJ software. **P*<0.05 and ***P*<0.01, as determined by 1-way ANOVA with Tukey's post-hoc test. apoA-I indicates apolipoprotein A-I; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole.

caused by collecting lymphatic vessel impairment.²⁴ In our current experimental design, as the atherosclerotic plaque is already advanced, we do not exclude the fact that the defect in lymphatic transport could now reside in both the initial and the collecting lymphatic vessels. We therefore explored lymphatic vessel density in the skin dermis (back skin and ear dermis, Figure 4A and 4B, respectively) and in the adventitia of the aortic sinus (Figure 4C). Reversing the diet to a chow diet does not increase lymphangiogenesis (Figure 4D through 4F). Although no changes are observed in the back skin, apoA-I

treatment is reflected by a small albeit significant increase of initial lymphatic vessels in the aortic sinus and in the ear dermis of *Ldlr*^{-/-} mice. However, an increase in branching points or initial lymphatic hyperplasia could not be observed concomitantly (Figure 4G and 4H, respectively). To test whether this slight increase in LYVE-1⁺ vessels was sufficient to improve the uptake of interstitial molecules, we quantified the dermal clearance of a large molecule (dextran Cy5) by the initial lymphatics over a time course of 30 minutes and observed no changes in the dye uptake (Figure 4I).

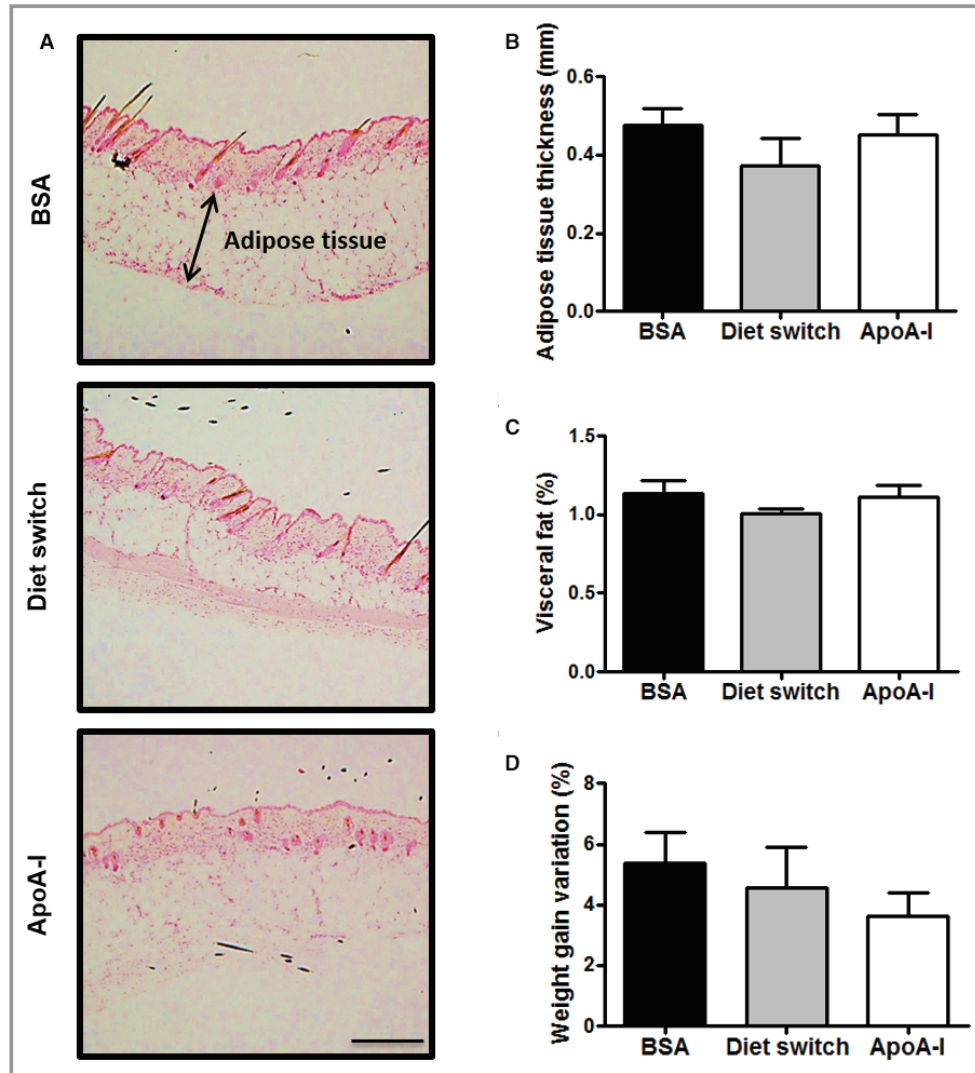


Figure 3. Obesity-related parameters in *Ldlr*^{-/-} mice. A, Hematoxylin and eosin staining was performed on 8- μ m-thick paraffin skin sections in BSA-, diet switch-, and apoA-I-treated *Ldlr*^{-/-} mice. B, Quantification of adipose tissue thickness in back skin is illustrated. Experiments were performed with 5 to 7 replicates per experimental group (mean \pm SEM). Pictures were taken with an Olympus B45 microscope and analyzed using ImagePro Plus 7.0 software. All image handling was performed using ImageJ software. C, Visceral fat was excised and weighed. Visceral fat percentage was calculated based on the visceral fat and the mouse total body weight. D, Weight gain variation percentage was calculated using the variation between the final and initial weight of the mouse. Experiments were performed with 10 to 12 replicates per experimental group (mean \pm SEM). Scale bar=500 μ m. apoA-I indicates apolipoprotein A-I.

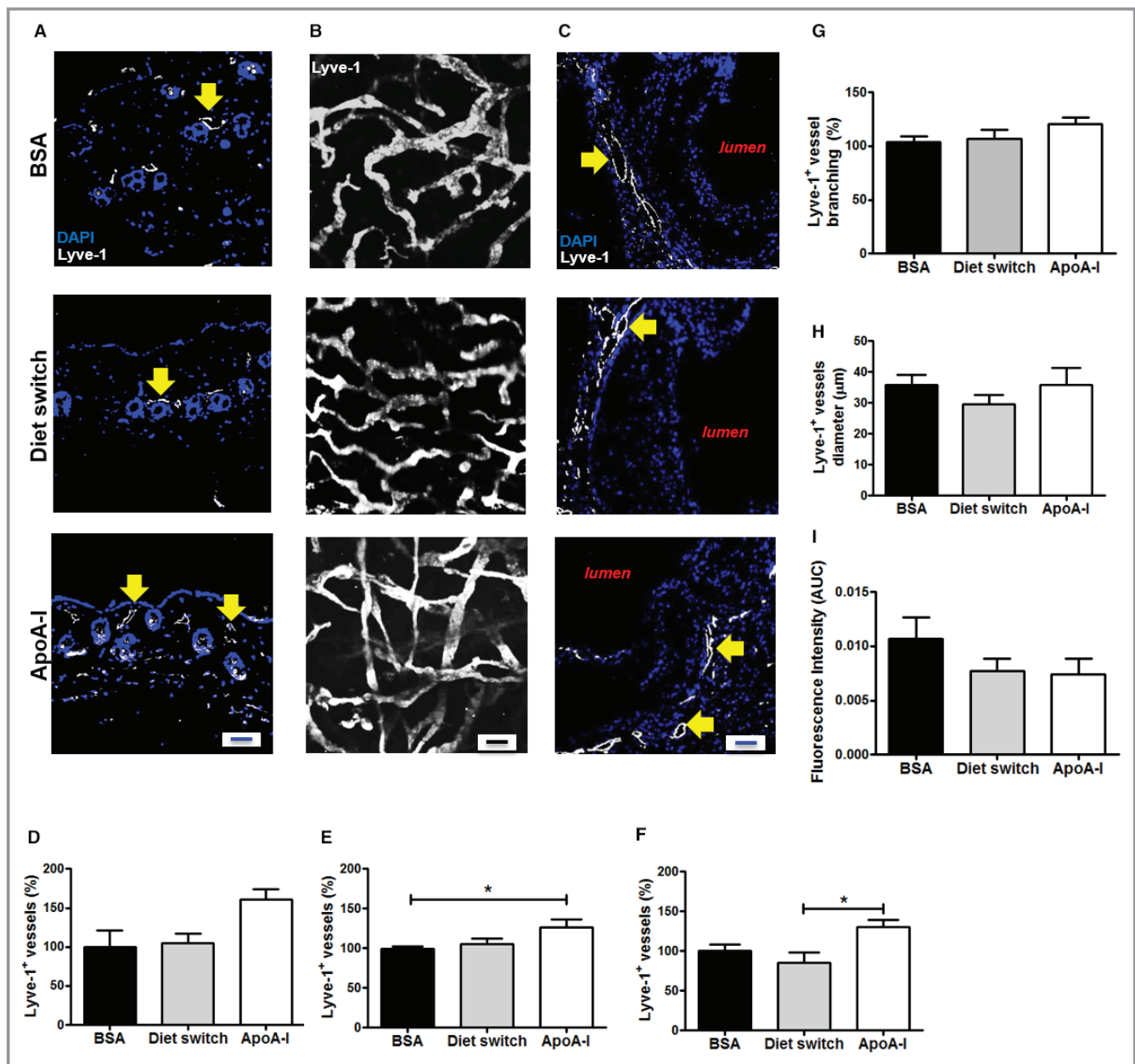


Figure 4. Assessment of initial lymphatic vessels morphology and function in *Ldlr*^{-/-} mice. Initial lymphatic vessels (Lyve-1⁺) were imaged by immunofluorescence and their number was quantified in (A and D) the back skin, (B and E) ear dermis, and (C and F) aortic sinus of BSA-, diet switch-, and apoA-I-treated *Ldlr*^{-/-} mice. In back skins and aortic sinuses, only distinguishably round Lyve-1⁺ vessels were included, as indicated by the yellow arrows. Data are expressed as the percentage of BSA (control group) in each set of tissues. Experiments were performed with 7 to 11 replicates per experimental group (mean±SEM). Quantification of the (G) branching and (H) diameter of Lyve-1⁺ vessels in the ear dermis. I, Lymphatic molecular transport was assessed by Cy5-labeled Dextran (70 kDa) injection in the ear dermis of BSA-, diet switch-, and apoA-I-treated *Ldlr*^{-/-} mice. Experiments were performed with 5 to 11 replicates per experimental group (mean±SEM). Pictures were taken using Fluoview FV 10i (Olympus). All image handling was performed using ImageJ software. **P*≤0.05 as determined by 1-way ANOVA with Tukey's post-hoc test. Scale bars=100 μm (B) and 50 μm (A and C). apoA-I indicates apolipoprotein A-I; AUC, area under the curve; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole.

ApoA-I Reduces the Atherosclerosis-Associated Increased Collecting Lymphatic Vessel Permeability

Whereas we observe an enhanced number of initial lymphatic vessels in the apoA-I-treated group, our results suggest that the

interstitial fluid uptake does not seem to be improved overall. Thus, we hypothesize that it is only once reaching the collecting lymphatic vessel that lymph flow is compromised and that apoA-I would mediate its beneficial effect solely at that level during atherosclerosis progression. Therefore, we next wanted

to investigate whether apoA-I adequately restores collecting lymphatic vessel function. We first determined the effect of apoA-I on collecting lymphatic vessel permeability by injecting Evans Blue in the footpad skin of the mouse. Images of the lower limb were taken to visualize the popliteal lymphatic vessels. Evans Blue leakage surrounding the vessel was quantified (Figure 5A). Our results show that leakage is nearly nonexistent in mice treated with apoA-I, indicative of proper lymphatic vessel integrity (Figure 5B and 5C). In the diet switch group, the area of leakage was also decreased, whereas the perpendicular leakage distance was as impaired as in the BSA group.

Several factors could account for the loss of lymphatic vessel permeability during atherosclerosis. Specific deletion of the Forkhead transcription factor FOXC2 on LECs is associated with a loose and disorganized extracellular matrix, which is indicative of increased endothelial permeability.⁶ To test whether apoA-I could regulate lymphatic permeability through FOXC2 expression, popliteal lymphatic vessels were harvested, and FOXC2 expression was assessed by immunofluorescence. Our images reveal that FOXC2 expression is similar in *Ldlr*^{-/-} mice that underwent apoA-I treatment and control mice (Figure S3). However, feeding mice with chow diet appears to increase FOXC2 expression,

suggesting that normalizing circulating cholesterol could enhance cell–cell junction stability and endothelial integrity. Our results indicate that apoA-I most likely uses another mechanism to improve lymphatic vessel permeability.

ApoA-I Enhances Human Platelet Adhesion to Lymphatic Endothelial Cells in Culture

Among the potential players involved in regulating vessel function and integrity, platelets are a target of interest in lymphatic physiology. Platelets are essential in proper lymphatic function: the interaction between CLEC-2 on platelets and podoplanin on LECs is crucial for the formation of the lymphovenous junction and for the lymphatic vessel integrity per se, during development and throughout life.⁵ As platelets are gatekeepers for lymphatic endothelial cells, we thus sought to investigate the potential role of platelets in repairing the loss of lymphatic vessel permeability during atherosclerosis. First, we isolated platelets from human blood and assessed platelet adherence to primary HMVEC-dLyAd pretreated for 24 hours with either apoA-I or BSA (control). Our results show that, regardless of the treatment, platelets adhere to the lymphatic endothelium and exert a bridging

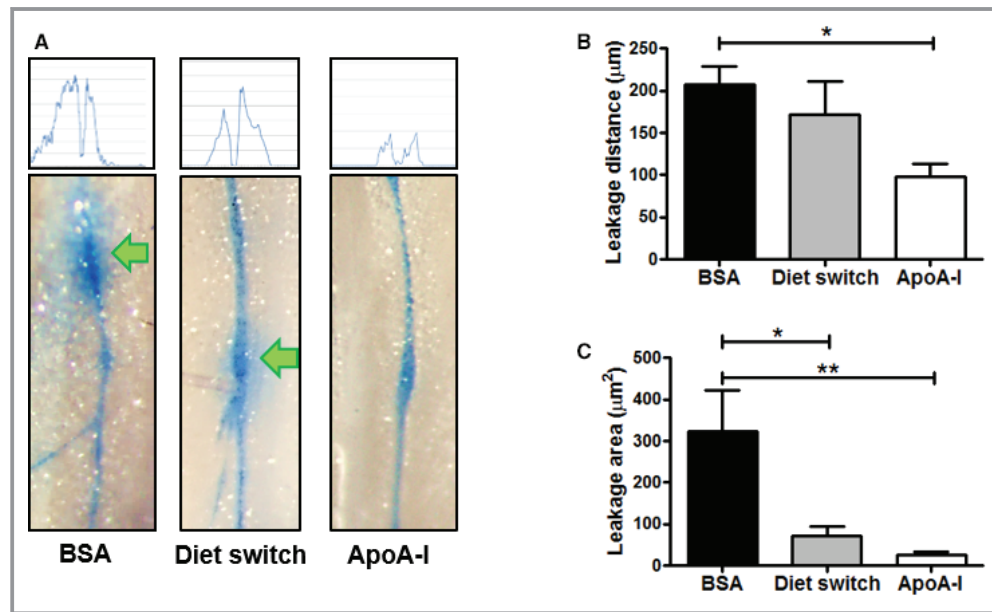


Figure 5. Assessment of collecting lymphatic vessel permeability in *Ldlr*^{-/-} mice. A, Lymphatic vascular integrity was assessed following Evans Blue (EB) dye intradermal injection in the footpad of BSA-, diet switch-, and apoA-I-treated *Ldlr*^{-/-} mice. After 30 minutes, lymphatic vessels were visualized using a Stereo Discovery V8. Pictures were taken by Canon Rebel XSI. BSA and diet switch mice display EB dye leakage around the vessels (green arrows). Histograms on top of each vessel illustrate the propagation of EB dye leakage. Both the (B) leakage distance and (C) its area were assessed and calculated using ImageJ software. Experiments were performed with 4 replicates per experimental group (mean±SEM). ***P*<0.01 and **P*≤0.05, as determined by 1-way ANOVA with Tukey's post-hoc test. apoA-I indicates apolipoprotein A-I.

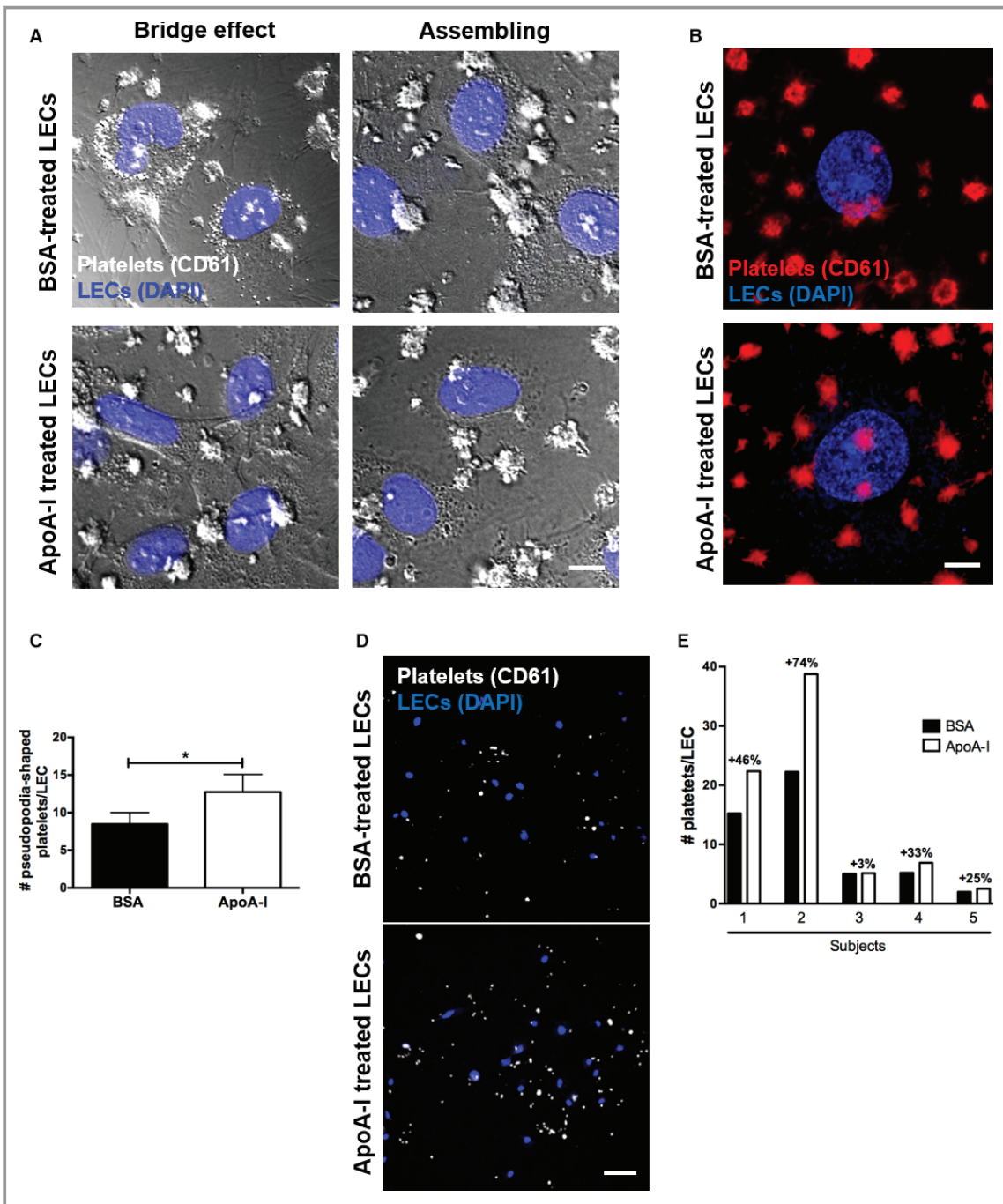


Figure 6. Effect of lipid-free apoA-I treatment on platelet adhesion to lymphatic endothelial cells. A through C, Human platelets were isolated and incubated with a confluent monolayer of primary HMVEC-dLyAd for 1 hour at 37°C. LECs and platelets were identified by immunofluorescence using DAPI and anti-CD61 antibodies, respectively. A, Representative images indicating that, under static conditions, apoA-I-treated LECs display a “bridge effect” mediated by platelets pseudopodia, thus assembling LECs together. B, Representative images and (C) quantification of the number of adhered platelets interacting with HMVEC in BSA- (upper panel) and apoA-I- (lower panel) treated LECs. Results are the averages of 5 independent experiments. * $P < 0.05$, as determined by 1-tailed t test. D and E, Human platelets were isolated and perfused over primary HMVEC-dLyAd seeded at maximum confluence in tissue culture treated flow chambers, at a wall shear rate of 50/s at 37°C for 8 minutes. D, LECs and platelets were identified using DAPI and anti-CD61 antibodies, respectively. E, The % augmentation in the number of adhered platelets following treatment is indicated above the bars. $P = 0.043$, using a Wilcoxon signed rank test. Scale bars=10 μm (A and B) and 100 μm (E). apoA-I indicates apolipoprotein A-I; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; HMVEC-dLyAd, human dermal lymphatic microvascular endothelial cells-adult; LECs, lymphatic endothelial cells.

effect through which as little as 1 platelet assembles together several LECs (Figure 6A, left panel). Furthermore, an assembling effect was observed, in which several platelets will aggregate together in an attempt to bring together several LECs (Figure 6A, right panel). Using the same experimental setting, quantification of pseudopodia-shaped platelet adhesion to the lymphatic endothelium allowed us to observe a significant increase in the number of strongly adhered platelets⁴⁵ per LECs when the latter were pretreated with apoA-I (Figure 6B and 6C).

As podoplanin is more potent to bind to platelets under flow,⁴⁶ we exposed apoA-I or BSA-pretreated LECs to a constant venous shear for 8 minutes using 6-channel μ -slides, as depicted in Figure S4. Platelets isolated from 5 different healthy volunteers were perfused over HMVEC-dLyAd at a wall shear rate of 50/s at 37°C for 8 minutes. Figure 6D illustrates that, under a physiological flow, the prevalence of CD61⁺ platelet adherence per LEC (DAPI⁺ cells) was increased when HMVEC-dLyAd were first treated with apoA-I. Platelet adhesion was improved in each individual donor, with an increase ranging from 3% to 74% in all our healthy volunteers, and an average increase in adherence of $36.2 \pm 11.8\%$ (mean \pm SEM) was noted (Figure 6E). This large span between values is to be expected as human physiology is highly variable, but nonetheless, in all cases, we see an increase in platelet adhesion to the lymphatic endothelium

following apoA-I treatment ($P=0.043$ as determined by Wilcoxon signed rank test).

To test whether an increase in podoplanin expression on LECs could account for the beneficial effect of apoA-I, we performed immunoblotting of human LECs pretreated with apoA-I. Our results revealed no changes in podoplanin expression (Figure 7A). We therefore turned to another potential actor in lymphatic function regulation, namely, the vascular growth factor receptor 3 (VEGFR-3). The detection of VEGFR-3 on HMVEC-dLyAd by Western blots shows that VEGFR-3 expression is increased when LECs are exposed to apoA-I (Figure 7B).

ApoA-I Reduces Ex Vivo Platelet Aggregation

Activated platelets have long been known for their ability to promote thrombus formation and coagulation.⁴⁷ Increased platelet activation in blood is associated with the lethal outcomes of atherosclerosis.⁴⁸ Our results suggest that pretreating LEC with apoA-I before platelet infusion enhances platelet arrest at a physiological-like lymph flow on LECs in vitro, a phenomenon that would most likely be beneficial in preserving the lymphatic system integrity.⁵ Therefore, we next evaluated whether apoA-I treatment in *Ldlr*^{-/-} mice would solely enhance the platelet activity needed to maintain proper lymphatic function, while limiting

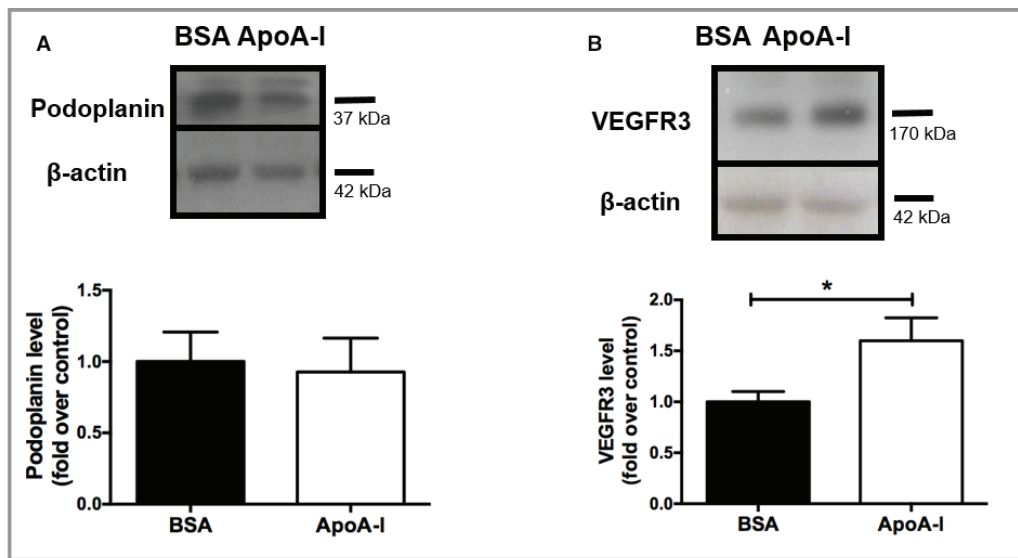


Figure 7. Effect of lipid-free apoA-I treatment on podoplanin and VEGFR3 expression. Primary HMVEC-dLyAd were seeded at maximum confluence and incubated for 20 hours with BSA or apoA-I. Cells were then analyzed by Western blotting with the use of (A) podoplanin and (B) VEGFR3. Podoplanin protein was observed at 37 kDa and VEGFR3 was observed at 170 kDa. Experiments were performed with 6 replicates per experimental group. * $P < 0.05$, as determined by 1-tailed t test. apoA-I indicates apolipoprotein A-I; HMVEC-dLyAd, human dermal lymphatic microvascular endothelial cells-adult; VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor.

the platelet activity that leads to blood thrombosis in circulation. We measured the effect of in vivo apoA-I treatment on platelet aggregation induced by platelet agonists ex vivo.

Close to 2 decades ago, Li et al introduced the concept that apoA-I Milano inhibits arterial thrombus formation through inhibition of thrombin activity,⁴⁹ and recent data have shown an inhibitory effect of isolated human apoA-I on human platelet activation and murine arterial/venous thrombosis.⁵⁰ Recently, it has been shown that, in vivo, apoA-I deficiency abrogates flow restriction-induced thrombosis in a mouse model of deep vein thrombosis, and intravenous human apoA-I infusion in wild-type mice decreases thrombi prevalence from 55% in vehicle-infused mice to 0%.⁵¹ Figure 8A shows representative aggregation curves, obtained with a Chrono-log Optical aggregometer. Platelet aggregation was performed using either high concentrations of the classic agonist thrombin (0.5–1 U/mL, blue curves) or the CLEC-2 specific agonist podoplanin (5 µg/mL, black curves) on platelets isolated from BSA-, diet switch-, or apoA-I-treated *Ldlr*^{-/-} mice. The histogram depicted in Figure 8B and 8C represents the mean data of percent platelet aggregation with thrombin and podoplanin, monitored under a constant shear (1000 rpm) at 37°C. ApoA-I-treated *Ldlr*^{-/-} mice displayed lower aggregation amplitude than that isolated from the BSA-treated or diet switch group once it reached a plateau after addition of thrombin (Figure 8B). At this arterial shear rate, there was a statistically insignificant trend of decreased aggregation of platelets isolated from apoA-I-treated mice with podoplanin (Figure 8C). At least in plasma, Figure 8C also revealed that podoplanin-induced platelet aggregation is decreased in apoA-I-treated mice compared with BSA-control mice, as calculated by a 2-tailed *t* test.

To test whether apoA-I infusion could suppress flow restriction-induced aggregation caused by enhanced baseline levels of CLEC-2 on platelets, we determined by immunoblotting the level of CLEC-2 expression on resting isolated platelets. Neither the level of CLEC-2 (Figure 8D) nor the phosphorylation of its downstream effector Akt (Figure 8E) were statistically affected by apoA-I or diet reversal. PAF is involved in platelet aggregation and is produced by a variety of cells, including platelets. Its production is controlled by the activity of PAF acetylhydrolases. Thus, because HDL and HDL-associated PAF acetylhydrolase (PAF-AH) has been shown to restore normal dendritic cell migration and priming,⁵² we sought to determine whether an increase in PAF-AH activity could have accounted for the beneficial effect on platelet activity, and consequently, on lymphatic vessel integrity. Figure S5 rather shows that PAF-AH activity, either in plasma or in lymph, is unchanged among the 3 different groups of *Ldlr*^{-/-} mice, suggesting that apoA-I does not mediate its beneficial effect on lymphatic function via a PAF-AH-related mechanism.

Discussion

Atherosclerosis is one of the principal causes of mortality worldwide, instigating most cardiovascular diseases (coronary artery disease). In recent years, a lot of emphasis has been placed on increasing levels of blood HDL in clinical studies. However, from a global perspective, increasing HDL-cholesterol levels did not demonstrate any clinical benefits, nor improve macrophage reverse cholesterol transport or decrease coronary artery disease,^{53–55} leading scientists to redefine our understanding of the cholesterol excretion pathway. ApoA-I, the main protein constituent of plasma HDL, quickly became a target of interest. It has been shown to be a key player in macrophage reverse cholesterol transport regulation through its capacity to package large amounts of cholesterol following its interaction with ABCA1 on cell membranes.^{29,56} Interestingly, subcutaneously injected lipid-free apoA-I has been reported to reduce accumulation of lipid and immune cells within the aortic root of hypercholesterolemic mice without increasing HDL-cholesterol concentrations.^{33,57} Whereas apoA-I has been extensively studied in the past decade, the mechanisms by which it mediates its atheroprotective effect are still unclear. In the present study, we addressed whether and how preservation of collecting lymphatic function contributes to the protective effect of apoA-I.

For several decades, the lymphatic system had been suspected as being a potential player in lipoprotein transport during atherosclerosis.^{21,22,58} Several years ago, Martel et al quantitatively demonstrated, for the first time, that lymphatic vessels are important components involved in macrophage reverse cholesterol transport.²⁶ Therefore, the lymphatic system is now recognized as the missing link between the atherosclerotic plaque and the blood circulation. Improving lymphatic function to either prevent or abrogate atherosclerosis would be a potentially attractive therapeutic target. We therefore herein sought to connect the beneficial effects of apoA-I in atherosclerosis to lymphatic function, and we proposed that apoA-I might reduce the lymphatic dysfunction observed during atherosclerosis.²⁶ Our findings reveal that a continuous low-dose intradermal injection of diet-fed *Ldlr*^{-/-} mice with lipid-free apoA-I reverses atherosclerosis-associated collecting lymphatic vessel dysfunction, without significantly affecting plasma or lymph total cholesterol concentrations. The direct effect of apoA-I on LECs combined with its role in platelet activity highlight the versatility of this apolipoprotein in the modulation of lymphatic function. Altogether, our work suggests that preservation of collecting lymphatic function contributes to the protective effect of apoA-I.

The method of injection chosen in our experimental design comes from the fact that lymphatic vessels are present and abundant in the skin dermis.⁵⁹ Therefore, to directly assess

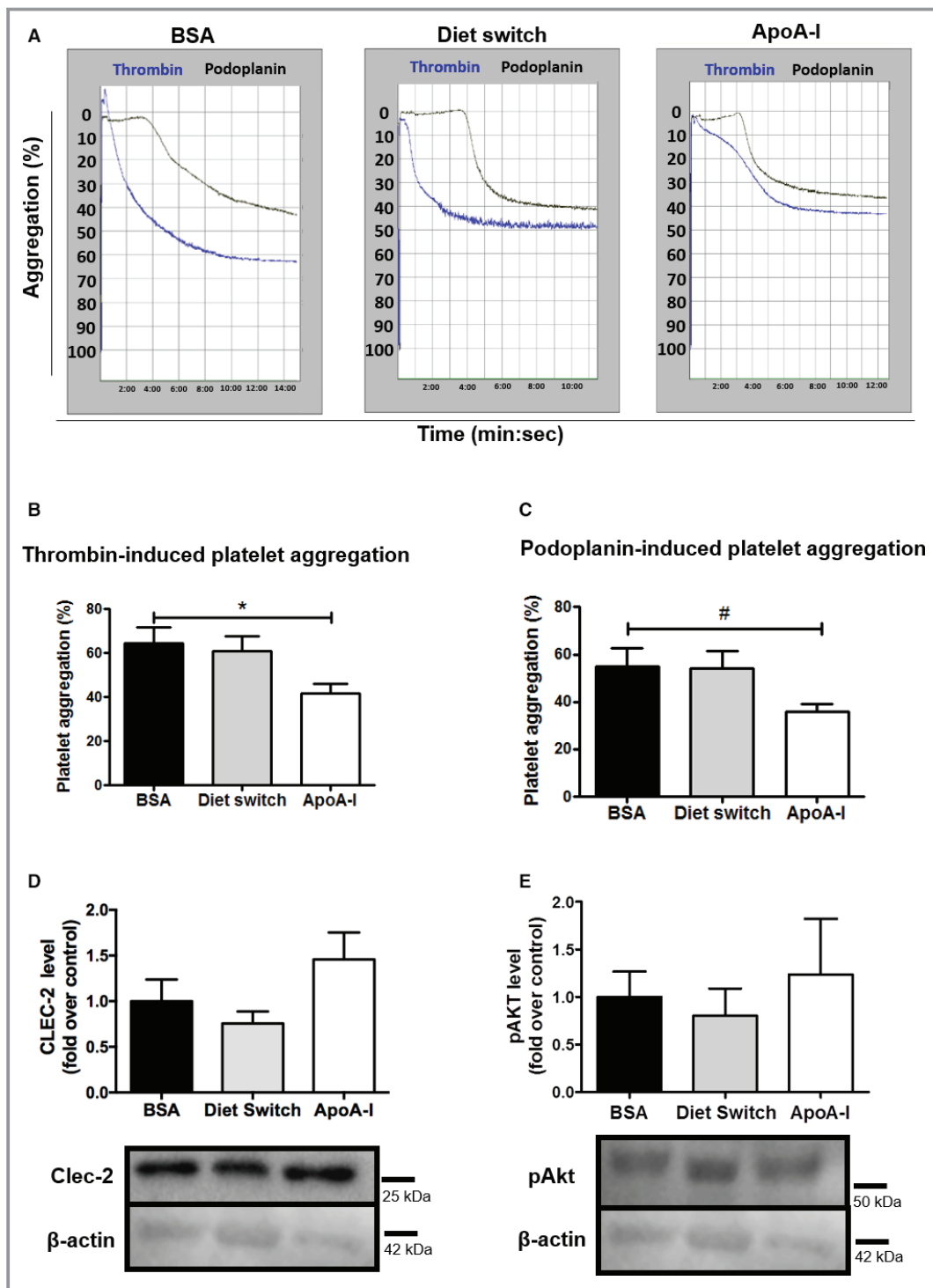


Figure 8. Effect of lipid-free apoA-I treatment on platelet activity. A, Representative aggregation curves, obtained with a Chrono-log Optical aggregometer. Platelet aggregation was performed using either thrombin (blue curve) or podoplanin (black curve) on platelets isolated from BSA-, diet switch-, and apoA-I-treated *Ldlr*^{-/-} mice. Histogram represents the mean data of percent platelet aggregation with (B) thrombin (0.5–1 U/mL) and (C) podoplanin (5 μ g/mL) monitored under a constant shear (1000 rpm) at 37°C. * P <0.05 and # P <0.06, as determined by Kruskal–Wallis analysis with Dunn’s multiple comparison post-hoc test. Extracts from resting platelets were analyzed by Western blotting with the use of (D) CLEC-2 and (E) Akt phosphorylation (pAkt). CLEC-2 protein was observed at 28 kDa and pAkt protein was observed at 60 kDa. Experiments were performed with 4 replicates per experimental group, each consisting of 2 mice per replicate. apoA-I indicates apolipoprotein A-I; CLEC2, C-type lectin-like receptor 2.

the effect of the drug on the lymphatic vasculature per se, we performed intradermal injections, rather than subcutaneous injections as performed in previous work.³⁷ Following the injection, apoA-I is first retrieved in lymph before appearing in the blood circulation, thus acting upon the lymphatic vasculature as soon as it gets within the mouse. We observe longitudinal plaque regression in the thoracic aorta of *Ldlr*^{-/-} mice following lipid-free apoA-I treatment, independently of cholesterol accumulation in lymph or plasma. As reported by Wilhelm et al, this lack of effect in plasma cholesterol could be explained by the potent effect of apoA-I on immune cell cholesterol balance instead of affecting whole body cholesterol balance.³³ ApoA-I has the ability to relieve excess cholesterol in lipid rafts/microdomains and thus to affect numerous types of signal transduction pathways that rely on these microdomains.³⁰ The same rationale could be applied to lymph: the positive effects of apoA-I on lymphatic and platelet function suggest that despite high plasma cholesterol, cells present in lymph have the ability to efflux their excess cholesterol via lipid-free apoA-I to the liver. Therefore, it is very likely that LEC and platelet signaling pathways depend on the amount of cholesterol in their microdomains, consequently modulating platelet aggregation and adhesion to the lymphatic endothelium. As we hypothesize that apoA-I plays a positive role in preserving lymphatic transport, the expected repercussion would be observable, primarily, at the level of the collecting lymphatic vessel, the entity that is first defective during atherosclerosis-associated lymphatic dysfunction.²⁴ By improving lymphatic vessel integrity, we believe that apoA-I would improve lymph transport per se, thus promoting the movement of lymph content toward the blood circulation. Sequentially, cholesterol would be taken up by the initial lymphatics, and efficiently pumped out of the collecting lymphatic vessels to subsequently allow the exit of cholesterol from the lymphatic vessel, to eventually reach the liver to complete the reverse cholesterol transport loop, rather than being stagnant in lymph.

Subcutaneous injections of apoA-I³³ had more potent effects than intradermal injections to reduce the inflammatory cell content in the aortic sinus. This is most likely because of a more direct access to the blood vasculature. However, we show that interstitial spaces near the skin-draining lymphatics had less macrophage accumulation in the apoA-I-injected mice compared with the diet switch- or the BSA-injected control group. Following contact sensitization on the back-skin dermis,⁴⁰ we also show that dendritic cells are more potent to migrate to the corresponding draining lymph nodes when lipid-free apoA-I is injected, compared with the 2 control groups. Our results suggest that apoA-I, but not diet switch, can regulate immune cell content and improve lymphatic function before influencing obesity-related parameters such as subcutaneous fat accumulation.

Recent studies in animals provide evidence that affecting lymphatic drainage by promoting the growth of lymphatic vessels can modulate inflammation.^{60–63} Lymphatic vessel hyperplasia has been associated with hypercholesterolemia,⁴² but we show here that apoA-I does not reduce vessel diameters. In addition, we report that the transport of larger molecules is not seemingly different between the groups, reflecting that the capacity of the peripheral ultrafiltrate to be uptaken is not modified, despite the increased number of lymphatic vessels observed solely in the ear dermis. Altogether, these observations point out that more numerous initial lymphatic vessels do not necessarily reflect better functioning lymphatic vessels in our atherosclerotic mouse model. We have recently reported that lymphatic dysfunction associated with the early stage of atherosclerosis appears to be first and foremost linked to a defect in the collecting lymphatic vessel per se.²⁴ Aging⁶⁴ and chronic HFD⁶⁵ have also both been associated with a defect in the collecting lymphatic vessels as well, stressing the importance of targeting this portion of the vessel in chronic inflammatory diseases. As the defect is first found in the collecting vessels, lymphangiogenesis by itself might not be sufficient to reduce plaque formation. Therefore, we next investigated collecting lymphatic vessel permeability in our models. We first showed that, following apoA-I treatment, *Ldlr*^{-/-} mice have restored collecting lymphatic vessel integrity as shown by a decrease in Evans Blue leakage around the vessel, both with respect to the area and the perpendicular distance of leakage within the surrounding tissue. This is potentially reflected in previous studies where HDL was shown to increase endothelial barrier integrity, implicating sphingosine 1-phosphate as a mediator.⁶⁶ In our case, we suspected that apoA-I acted in a similar way on the lymphatic vessels. Surprisingly, although FOXC2 absence/reduction is well known to be implicated in lymphatic valve failure,⁶⁷ thereby potentially causing lymphedema and more importantly a dysfunction in the lymphatic collecting vessels, our results did not report a direct effect of apoA-I on FOXC2. The switch to a chow diet from HFD, however, significantly restored FOXC2 levels by immunofluorescence imaging, an avenue that deserves further attention. So far, variations in FOXC2 may have a minor role in body weight control and seem to be involved in the regulation of basal glucose turnover and plasma triglyceride levels, particularly in women.⁶⁸ For now, we believe that modulating FOXC2 might not be sufficient to rescue atherosclerosis-related lymphatic dysfunction and that apoA-I uses another mechanism to improve lymphatic vessel permeability.

Whereas an excess of platelet activation in blood circulation is often deleterious and is associated with clinically devastating outcomes in atherosclerosis, platelets are also known to support the semipermeable function of the blood vessel endothelium.⁶⁹ In lymphatic physiology, they play a

critical role in the development and maintenance of the lymphatic system. In addition to maintaining the integrity of high endothelial venules during lymphocyte trafficking to lymph nodes,⁷⁰ it has recently been reported that platelet activation through its receptor CLEC-2 is essential for maintaining lymphatic vessel integrity.⁵ In blood vessels, under homeostatic conditions, macrophages have been shown to interact with blood endothelial cells through their filopodia and exert a “bridge effect” between adjacent endothelial cells, thus strengthening the endothelial barrier in blood vessels.⁷¹ Perivascular cells appear to be for blood endothelial cells what platelets would be for lymphatic endothelial cells (ie, guardians of good vessel integrity). Here, we observe that platelets can indeed also have a similar protective effect on lymphatic endothelial cells, and that apoA-I enhances the adherence of pseudopodia-shaped platelets. Platelets were even shown to cluster together in order to be able to reach and pull several LECs together, reminiscent of endothelium junction formation. Despite the known literature concerning platelets as being preferred structural elements of blood and that they do not form a normal constituent of lymph from the thoracic duct,⁷² it does not eliminate the possibility that platelets might quickly adhere onto the collecting lymphatic vessel to exert their effects. The increased concentration of several released factors⁶⁹ and platelet-derived endothelial venules in lymph that we observed in a previous publication¹⁶ might in turn reflect platelet activation following their adhesion to the lymphatic endothelium. Recently, platelet-rich plasma with the platelet releasants was shown to affect lymphangiogenesis and limit lymphedema development, thereby showcasing a potential role in the regeneration of lymphatic vessels, as demonstrated by an increase in lymphatic cell proliferation. This leads us to suspect that not only do platelets exert an essential role in preventing blood from entering the lymphatic system at the lymphovenous junction, but also platelet fragments would similarly have a tendency to bind along the lymphatic vessels and ensure proper cell-to-cell junctions, thereby maintaining proper collecting lymphatic vessel integrity and potentially improving lymphatic vessel regeneration. Mechanisms of how platelets, or their counterparts (ie, platelet-derived endothelial venules) may exert similar effects on collecting lymphatic vessels per se remain to be elucidated.

Importantly, platelet assembly appeared to occur longitudinally on the endothelium itself, suggesting that lymph flow would not be impaired by excessive platelet aggregation. Navarro-Núñez et al reported that LEC-induced aggregate formation is inhibited by α IIb β 3 inhibitors, but many individual platelets could still be seen attached to LECs.⁴⁶ They concluded that abrogation of platelet–platelet interactions by α IIb β 3 inhibitors increased overall surface coverage. In our

model, we believe that the decrease in CLEC-2 pathway-independent ex vivo aggregation amplitude level observed in platelets isolated from apoA-I-treated mice could reflect the instigative mechanisms that would occur in vivo. ApoA-I would thus first limit the platelet aggregation frequently observed in atherosclerotic mice, and abrogate the formation of large aggregates that would, without treatment, shield the podoplanin surface downstream of flow. Afterward, platelets or platelet microparticles could adhere more efficiently to the lymphatic endothelium, thus promoting lymphatic endothelial cells integrity. The latter could be mediated directly by the physical properties of platelets and platelet microparticles binding to LECs, through the release of VEGF-C upon platelet activation,⁷³ or via the transduction of intracellular signals mediated by noncoding microRNAs.⁷⁴ Among the signaling pathways that would be relevant figures VEGFR-3, one of the main receptors of VEGF-C.⁷⁵

The increase in VEGFR-3 levels that we observe in apoA-I treated cells reinforces the hypothesis that apoA-I might also act directly on LEC to disrupt lipid rafts and therefore modulate specific cell-signaling pathways. As binding of VEGF-C to VEGFR-3 has been reported to alter the intrinsic and phasic pumping of collecting lymphatics in rat mesentery,⁷⁶ our results reveal that apoA-I could promote lymphatic integrity through the upregulation of VEGFR-3 activity. Of interest, a recent article reported that VEGFR-3 prevented excessive vascular permeability by limiting VEGFR-2 expression and VEGF/VEGFR-2 pathway activity in quiescent and angiogenic blood vascular endothelial cells.⁷⁷ Whether and how VEGFR-3 could modulate its own expression to subsequently regulate lymphatic contraction capacity remains to be tested.

Conclusion

The lymphatic system has emerged as a prerequisite for proper cholesterol excretion from plaque, and we conclude that low-dose lipid-free apoA-I treatment in atherosclerotic mice preserves and restores collecting lymphatic vessels function by direct and indirect mechanisms. This work suggests that lipid-free apoA-I mediates beneficial effects through the direct upregulation of the VEGFR-3 pathway. In addition, apoA-I might exert a protective effect on the lymphatic endothelium, as by limiting platelet aggregation, it would clear the way for platelet adhesion on LECs. Although there is evidence of a morphological role for platelets in maintaining LECs integrity, this indirect mechanism could also subsequently involve the activation of the signaling pathway to contribute to proper lymphatic function. Altogether, these studies bring forward a new pleiotropic role for apoA-I in lymphatic function and unveil new potential therapeutic targets for the prevention and treatment of atherosclerosis.

Acknowledgments

We would like to thank Marc-Antoine Godin, Geneviève Collin, Ahmed Hachem, and Younes Zaïd for their technical help, and the Laboratoire d'histologie et immunohistochimie (<http://www.laboratoirehistologie.org>) of Drs Martin G. Sirois and Jean-François Tanguay (Montreal Heart Institute) for performing the paraffin immunohistochemistry staining experiments in mouse back-skin.

Sources of Funding

This work was partially supported by the Montreal Heart Institute Foundation, the Banting Research Foundation, the Fonds de Recherche du Québec – Santé (FRQS), the Foundation Jacques-de-Champlain and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (Martel) and by grants from the National Institutes of Health (R01HL112270 and R01HL127649) (Sorci-Thomas).

Disclosures

None.

References

- Shayan R, Achen MG, Stacker SA. Lymphatic vessels in cancer metastasis: bridging the gaps. *Carcinogenesis*. 2006;27:1729–1738.
- Baluk P, Fuxe J, Hashizume H, Romano T, Lashnits E, Butz S, Vestweber D, Corada M, Molendini C, Dejana E, McDonald DM. Functionally specialized junctions between endothelial cells of lymphatic vessels. *J Exp Med*. 2007;204:2349–2362.
- Cueni LN, Detmar M. The lymphatic system in health and disease. *Lymphat Res Biol*. 2008;6:109–122.
- Crowe MJ, von der Weid PY, Brock JA, Van Helden DF. Co-ordination of contractile activity in guinea-pig mesenteric lymphatics. *J Physiol*. 1997;500(Pt 1):235–244.
- Hess PR, Rawnsley DR, Jakus Z, Yang Y, Sweet DT, Fu J, Herzog B, Lu M, Nieswandt B, Oliver G, Makinen T, Xia L, Kahn ML. Platelets mediate lymphovenous hemostasis to maintain blood-lymphatic separation throughout life. *J Clin Invest*. 2014;124:273–284.
- Sabine A, Bovay E, Demir CS, Kimura W, Jaquet M, Agalarov Y, Zangger N, Scallan JP, Graber W, Gulpinar E, Kwak BR, Makinen T, Martinez-Corral I, Ortega S, Delorenzi M, Kiefer F, Davis MJ, Djonov V, Miura N, Petrova TV. FOXO2 and fluid shear stress stabilize postnatal lymphatic vasculature. *J Clin Invest*. 2015;125:3861–3877.
- Uhrin P, Zaujec J, Breuss JM, Olcaydu D, Chrenek P, Stockinger H, Fuertbauer E, Moser M, Haiko P, Fassler R, Alitalo K, Binder BR, Kerjaschki D. Novel function for blood platelets and podoplanin in developmental separation of blood and lymphatic circulation. *Blood*. 2010;115:3997–4005.
- Osada M, Inoue O, Ding G, Shirai T, Ichise H, Hirayama K, Takano K, Yatomi Y, Hirashima M, Fujii H, Suzuki-Inoue K, Ozaki Y. Platelet activation receptor CLEC-2 regulates blood/lymphatic vessel separation by inhibiting proliferation, migration, and tube formation of lymphatic endothelial cells. *J Biol Chem*. 2012;287:22241–22252.
- Gimbrone MA Jr, Aster RH, Cotran RS, Corkery J, Jandl JH, Folkman J. Preservation of vascular integrity in organs perfused in vitro with a platelet-rich medium. *Nature*. 1969;222:33–36.
- Petri B, Broermann A, Li H, Khandoga AG, Zarbock A, Krombach F, Goerge T, Schneider SW, Jones C, Nieswandt B, Wild MK, Vestweber D. von Willebrand factor promotes leukocyte extravasation. *Blood*. 2010;116:4712–4719.
- Huo Y, Schober A, Forlow SB, Smith DF, Hyman MC, Jung S, Littman DR, Weber C, Ley K. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med*. 2003;9:61–67.
- Massberg S, Brand K, Gruner S, Page S, Muller E, Muller I, Bergmeier W, Richter T, Lorenz M, Konrad I, Nieswandt B, Gawaz M. A critical role of platelet

adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med*. 2002;196:887–896.

- Hara T, Shimizu K, Ogawa F, Yanaba K, Iwata Y, Muroi E, Takenaka M, Komura K, Hasegawa M, Fujimoto M, Sato S. Platelets control leukocyte recruitment in a murine model of cutaneous arthritis reaction. *Am J Pathol*. 2010;176:259–269.
- McGarrity ST, Hyers TM, Webster RO. Inhibition of neutrophil functions by platelets and platelet-derived products: description of multiple inhibitory properties. *J Leukoc Biol*. 1988;44:93–100.
- Arraud N, Linares R, Tan S, Gounou C, Pasquet JM, Mornet S, Brisson AR. Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *J Thromb Haemost*. 2014;12:614–627.
- Milasan A, Tessandier N, Tan S, Brisson A, Boilard E, Martel C. Extracellular vesicles are present in mouse lymph and their level differs in atherosclerosis. *J Extracell Vesicles*. 2016;5:31427.
- Alitalo K. The lymphatic vasculature in disease. *Nat Med*. 2011;17:1371–1380.
- Kerjaschki D. The lymphatic vasculature revisited. *J Clin Invest*. 2014;124:874–877.
- Hos D, Cursiefen C. Lymphatic vessels in the development of tissue and organ rejection. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 2014;214:119–141.
- Lemole GM. The role of lymphostasis in atherogenesis. *Ann Thorac Surg*. 1981;31:290–293.
- Jones D, Min W. An overview of lymphatic vessels and their emerging role in cardiovascular disease. *J Cardiovasc Dis Res*. 2011;2:141–152.
- Sloop CH, Dory L, Roheim PS. Interstitial fluid lipoproteins. *J Lipid Res*. 1987;28:225–237.
- Milasan A, Ledoux J, Martel C. Lymphatic network in atherosclerosis: the underestimated path. *Future Sci OA*. 2015;1:FSO61.
- Milasan A, Dallaire F, Mayer G, Martel C. Effects of LDL receptor modulation on lymphatic function. *Sci Rep*. 2016;6:27862.
- Martel C, Randolph GJ. Atherosclerosis and transit of HDL through the lymphatic vasculature. *Curr Atheroscler Rep*. 2013;15:1–6.
- Martel C, Li W, Fulp B, Platt AM, Gautier EL, Westerterp M, Bittman R, Tall AR, Chen SH, Thomas MJ, Kreisel D, Swartz MA, Sorci-Thomas MG, Randolph GJ. Lymphatic vasculature mediates macrophage reverse cholesterol transport in mice. *J Clin Invest*. 2013;123:1571–1579.
- Vuorio T, Nurmi H, Moulton K, Kurkipuro J, Robciuc MR, Ohman M, Heinonen SE, Samaranyake H, Heikura T, Alitalo K, Yla-Herttuala S. Lymphatic vessel insufficiency in hypercholesterolemic mice alters lipoprotein levels and promotes atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34:1162–1170.
- Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat Rev Immunol*. 2013;13:709–721.
- Sorci-Thomas MG, Owen JS, Fulp B, Bhat S, Zhu X, Parks JS, Shah D, Jerome WG, Gerelus M, Zabalawi M, Thomas MJ. Nascent high density lipoproteins formed by ABCA1 resemble lipid rafts and are structurally organized by three apoA-I monomers. *J Lipid Res*. 2012;53:1890–1909.
- Sorci-Thomas MG, Thomas MJ. Microdomains, inflammation, and atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118:679–691.
- Kontush A, Lindahl M, Lhomme M, Calabresi L, Chapman MJ, Davidson WS. Structure of HDL: particle subclasses and molecular components. *Handb Exp Pharmacol*. 2015;224:3–51.
- Hutchins PM, Heinecke JW. Cholesterol efflux capacity, macrophage reverse cholesterol transport and cardioprotective HDL. *Curr Opin Lipidol*. 2015;26:388–393.
- Wilhelm AJ, Zabalawi M, Owen JS, Shah D, Grayson JM, Major AS, Bhat S, Gibbs DP Jr, Thomas MJ, Sorci-Thomas MG. Apolipoprotein A-I modulates regulatory T cells in autoimmune LDLr^{-/-}, ApoA-I^{-/-} mice. *J Biol Chem*. 2010;285:36158–36169.
- Wang SH, Yuan SG, Peng DQ, Zhao SP. High-density lipoprotein affects antigen presentation by interfering with lipid raft: a promising anti-atherogenic strategy. *Clin Exp Immunol*. 2010;160:137–142.
- Wang SH, Yuan SG, Peng DQ, Zhao SP. HDL and ApoA-I inhibit antigen presentation-mediated T cell activation by disrupting lipid rafts in antigen presenting cells. *Atherosclerosis*. 2012;225:105–114.
- Cheng AM, Handa P, Tateya S, Schwartz J, Tang C, Mitra P, Oram JF, Chait A, Kim F. Apolipoprotein A-I attenuates palmitate-mediated NF- κ B activation by reducing Toll-like receptor-4 recruitment into lipid rafts. *PLoS One*. 2012;7:e33917.
- Kaul S, Xu H, Zabalawi M, Maruko E, Fulp BE, Bluemn T, Brzoza-Lewis KL, Gerelus M, Weerasekera R, Kallinger R, James R, Zhang YS, Thomas MJ, Sorci-Thomas MG. Lipid-free apolipoprotein A-I reduces progression of atherosclerosis by mobilizing microdomain cholesterol and attenuating the number of CD131

- expressing cells: monitoring cholesterol homeostasis using the cellular ester to total cholesterol ratio. *J Am Heart Assoc*. 2016;5:e004401. DOI: 10.1161/JAHA.116.004401.
38. Bisoondial R, Tabet F, Tak PP, Petrides F, Cuesta Torres LF, Hou L, Cook A, Barter PJ, Weninger W, Rye KA. Apolipoprotein A-I limits the negative effect of tumor necrosis factor on lymphangiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35:2443–2450.
 39. Willecke F, Yuan C, Oka K, Chan L, Hu Y, Barnhart S, Bornfeldt KE, Goldberg IJ, Fisher EA. Effects of high fat feeding and diabetes on regression of atherosclerosis induced by low-density lipoprotein receptor gene therapy in LDL receptor-deficient mice. *PLoS One*. 2015;10:e0128996.
 40. Randolph GJ, Angeli V, Swartz MA. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:617–628.
 41. Platt AM, Rutkowski JM, Martel C, Kuan EL, Ivanov S, Swartz MA, Randolph GJ. Normal dendritic cell mobilization to lymph nodes under conditions of severe lymphatic hypoplasia. *J Immunol*. 2013;190:4608–4620.
 42. Lim HY, Rutkowski JM, Helft J, Reddy ST, Swartz MA, Randolph GJ, Angeli V. Hypercholesterolemic mice exhibit lymphatic vessel dysfunction and degeneration. *Am J Pathol*. 2009;175:1328–1337.
 43. Rocha VZ, Libby P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. 2009;6:399–409.
 44. Garcia Nores GD, Cuzzzone DA, Albano NJ, Hespe GE, Kataru RP, Torrisi JS, Gardenier JC, Savetsky IL, Aschen SZ, Nitti MD, Mehrara BJ. Obesity but not high-fat diet impairs lymphatic function. *Int J Obes*. 2016;40:1582–1590.
 45. Poulter NS, Pollitt AY, Davies A, Malinova D, Nash GB, Hannon MJ, Pikramenou Z, Rappoport JZ, Hartwig JH, Owen DM, Thrasher AJ, Watson SP, Thomas SG. Platelet actin nodules are podosome-like structures dependent on Wiskott-Aldrich syndrome protein and ARP2/3 complex. *Nat Commun*. 2015;6:7254.
 46. Navarro-Nunez L, Pollitt AY, Lowe K, Latif A, Nash GB, Watson SP. Platelet adhesion to podoplanin under flow is mediated by the receptor CLEC-2 and stabilised by Src/Syk-dependent platelet signalling. *Thromb Haemost*. 2015;113:1109–1120.
 47. Brewer DB. Max Schultz (1865), G. Bizzozero (1882) and the discovery of the platelet. *Br J Haematol*. 2006;133:251–258.
 48. Srikanth S, Ambrose JA. Pathophysiology of coronary thrombus formation and adverse consequences of thrombus during PCI. *Curr Cardiol Rev*. 2012;8:168–176.
 49. Li D, Weng S, Yang B, Zander DS, Saldeen T, Nichols WW, Khan S, Mehta JL. Inhibition of arterial thrombus formation by ApoA1 Milano. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:378–383.
 50. Branchford BR, Ruegg K, Villalobos-Menuet E, Jacobson LJ, Di Paola JA, Manco-Johnson M. FVIII/VWF ratio is not a reliable predictor of VWD in children. *Pediatr Blood Cancer*. 2014;61:936–939.
 51. Brill A, Yesilaltay A, De Meyer SF, Kisucka J, Fuchs TA, Kocher O, Krieger M, Wagner DD. Extrahepatic high-density lipoprotein receptor SR-BI and apoA-I protect against deep vein thrombosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32:1841–1847.
 52. Angeli V, Llodra J, Rong JX, Satoh K, Ishii S, Shimizu T, Fisher EA, Randolph GJ. Dyslipidemia associated with atherosclerotic disease systemically alters dendritic cell mobilization. *Immunity*. 2004;21:561–574.
 53. Investigators A-H, Boden WE, Probstfield JL, Anderson T, Chaitman BR, Desvignes-Nickens P, Koprowicz K, McBride R, Teo K, Weintraub W. Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy. *N Engl J Med*. 2011;365:2255–2267.
 54. Schwartz GG, Olsson AG, Ballantyne CM, Barter PJ, Holme IM, Kallend D, Leiter LA, Leitersdorf E, McMurray JJ, Shah PK, Tardif JC, Chaitman BR, Duttlinger-Maddux R, Mathieson J; dal OC, Investigators. Rationale and design of the dal-OUTCOMES trial: efficacy and safety of dalcetrapib in patients with recent acute coronary syndrome. *Am Heart J*. 2009;158:896–901.e893.
 55. Tardif JC, Ballantyne CM, Barter P, Dasseux JL, Fayad ZA, Guertin MC, Kastelein JJ, Keyserling C, Klepp H, Koenig W, L'Allier P L, Lesperance J, Luscher TF, Paolini JF, Tawakol A, Waters DD; for the Can Hdl Infusions Significantly QARI. Effects of the high-density lipoprotein mimetic agent CER-001 on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized trial. *Eur Heart J*. 2014;25:3277–3286.
 56. Sorci-Thomas MG, Thomas MJ. The effects of altered apolipoprotein A-I structure on plasma HDL concentration. *Trends Cardiovasc Med*. 2002;12:121–128.
 57. Wilhelm AJ, Zabalawi M, Grayson JM, Weant AE, Major AS, Owen J, Bharadwaj M, Walzem R, Chan L, Oka K, Thomas MJ, Sorci-Thomas MG. Apolipoprotein A-I and its role in lymphocyte cholesterol homeostasis and autoimmunity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:843–849.
 58. Ee LC, Zheng S, Yao L, Tso P. Lymphatic absorption of fatty acids and cholesterol in the neonatal rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000;279:G325–G331.
 59. Skobe M, Detmar M. Structure, function, and molecular control of the skin lymphatic system. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 2000;5:14–19.
 60. Huggenberger R, Ullmann S, Proulx ST, Pytowski B, Alitalo K, Detmar M. Stimulation of lymphangiogenesis via VEGFR-3 inhibits chronic skin inflammation. *J Exp Med*. 2010;207:2255–2269.
 61. Kajiji K, Sawane M, Huggenberger R, Detmar M. Activation of the VEGFR-3 pathway by VEGF-C attenuates UVB-induced edema formation and skin inflammation by promoting lymphangiogenesis. *J Invest Dermatol*. 2009;129:1292–1298.
 62. Zhou Q, Guo R, Wood R, Boyce BF, Liang Q, Wang YJ, Schwarz EM, Xing L. Vascular endothelial growth factor c attenuates joint damage in chronic inflammatory arthritis by accelerating local lymphatic drainage in mice. *Arthritis Rheum*. 2011;63:2318–2328.
 63. D'Alessio S, Correale C, Tacconi C, Gandelli A, Pietrogrande G, Vetrano S, Genua M, Arena V, Spinelli A, Peyrin-Biroulet L, Fiocchi C, Danese S. VEGF-C-dependent stimulation of lymphatic function ameliorates experimental inflammatory bowel disease. *J Clin Invest*. 2014;124:3863–3878.
 64. Zolla V, Nizamutdinova IT, Scharf B, Clement CC, Maejima D, Akl T, Nagai T, Luciani P, Leroux JC, Halin C, Stukes S, Tiwari S, Casadevall A, Jacobs WR Jr, Entenberg D, Zawieja DC, Condeelis J, Fooksman DR, Gashev AA, Santambrogio L. Aging-related anatomical and biochemical changes in lymphatic collectors impair lymph transport, fluid homeostasis, and pathogen clearance. *Aging Cell*. 2015;14:582–594.
 65. Blum KS, Karaman S, Proulx ST, Ochsenbein AM, Luciani P, Leroux JC, Wolfrum C, Detmar M. Chronic high-fat diet impairs collecting lymphatic vessel function in mice. *PLoS One*. 2014;9:e94713.
 66. Argraves KM, Gazzolo PJ, Groh EM, Wilkerson BA, Matsuura BS, Twal WO, Hammad SM, Argraves WS. High density lipoprotein-associated sphingosine 1-phosphate promotes endothelial barrier function. *J Biol Chem*. 2008;283:25074–25081.
 67. Mellor RH, Brice G, Stanton AW, French J, Smith A, Jeffery S, Levick JR, Burnand KG, Mortimer PS; Lymphoedema Research C. Mutations in FOXC2 are strongly associated with primary valve failure in veins of the lower limb. *Circulation*. 2007;115:1912–1920.
 68. Kovacs P, Lehn-Stefan A, Stumvoll M, Bogardus C, Baier LJ. Genetic variation in the human winged helix/forkhead transcription factor gene FOXC2 in Pima Indians. *Diabetes*. 2003;52:1292–1295.
 69. Ho-Tin-Noe B, Demers M, Wagner DD. How platelets safeguard vascular integrity. *J Thromb Haemost*. 2011;9(suppl 1):56–65.
 70. Lee RH, Bergmeier W. Platelet immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) and hemITAM signaling and vascular integrity in inflammation and development. *J Thromb Haemost*. 2016;14:645–654.
 71. He H, Mack JJ, Guc E, Warren CM, Squadrito ML, Kilarski WW, Baer C, Freshman RD, McDonald AI, Ziyad S, Swartz MA, De Palma M, Iruela-Arispe ML. Perivascular macrophages limit permeability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36:2203–2212.
 72. Jordan HE. The histology of lymph, with special reference to platelets. *Anat Rec*. 1918;15:37–45.
 73. Wartiovaara U, Salven P, Mikkola H, Lassila R, Kaukonen J, Joukov V, Orpana A, Ristimaki A, Heikinheimo M, Joensuu H, Alitalo K, Palotie A. Peripheral blood platelets express VEGF-C and VEGF which are released during platelet activation. *Thromb Haemost*. 1998;80:171–175.
 74. Sunderland N, Skroblin P, Barwari T, Huntley RP, Lu R, Joshi A, Lovering RC, Mayr M. MicroRNA biomarkers and platelet reactivity: the clot thickens. *Circ Res*. 2017;120:418–435.
 75. Kukk E, Lymboussaki A, Taira S, Kaipainen A, Jeltsch M, Joukov V, Alitalo K. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development*. 1996;122:3829–3837.
 76. Breslin JW, Gaudreault N, Watson KD, Reynoso R, Yuan SY, Wu MH. Vascular endothelial growth factor-C stimulates the lymphatic pump by a VEGF receptor-3-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293:H709–H718.
 77. Heinolainen K, Karaman S, D'Amico G, Tammela T, Sormunen R, Eklund L, Alitalo K, Zarkada G. VEGFR3 modulates vascular permeability by controlling VEGF/VEGFR2 signaling. *Circ Res*. 2017;120:1414–1425.

Supplemental Material

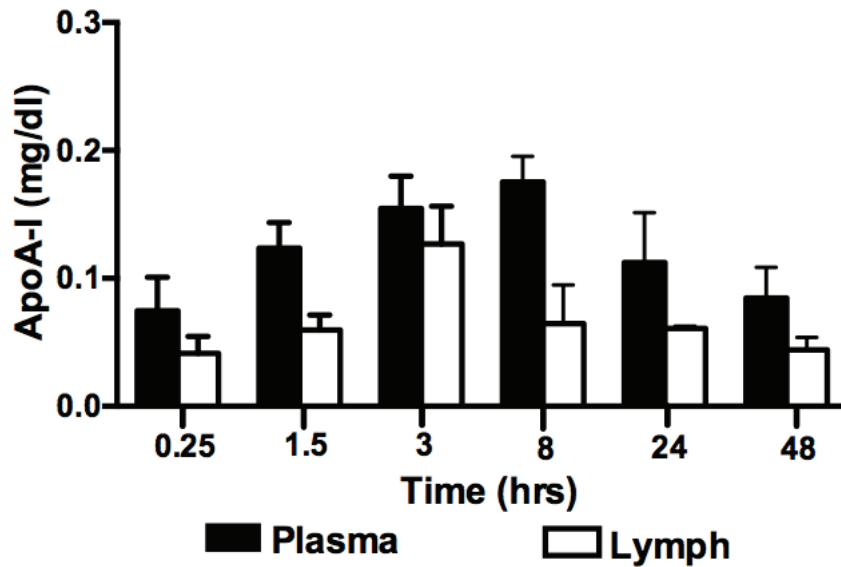


Figure S1. ApoA-I kinetics in wild type mice. Human lipid-free apoA-I was injected intradermally in the back skin of wild-type mice. Lymph and plasma were collected at different time points following injection. Human apoA-I levels were differentially detected in both lymph and plasma at each time point by ELISA and the background was subtracted. Experiments were performed with 4 mice per experimental group.

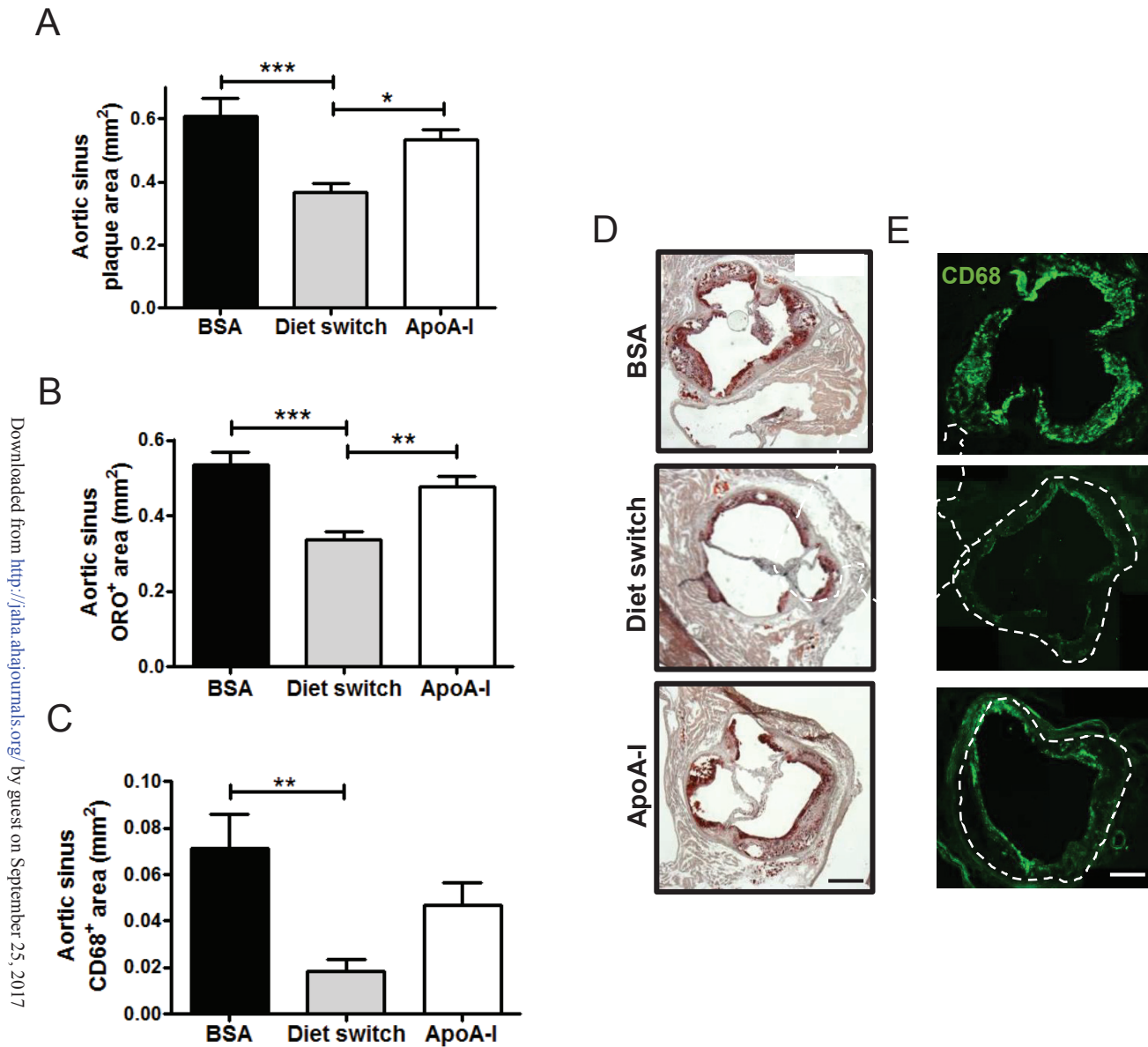


Figure S2. Assessment of atherosclerosis in *Ldlr*^{-/-} mice. **A, D,** Total lesion, **B, D,** neutral lipid- (Oil Red O) and **C, E,** macrophage (CD68⁺)-positive areas were quantified in the three groups of mice in 8 μ m-thick aortic sinus sections using ImageJ software. Experiments were performed with 7-11 mice per experimental group. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$, as determined by one-way ANOVA with Tukey's post-hoc test. Scale bars = 500 μ m.

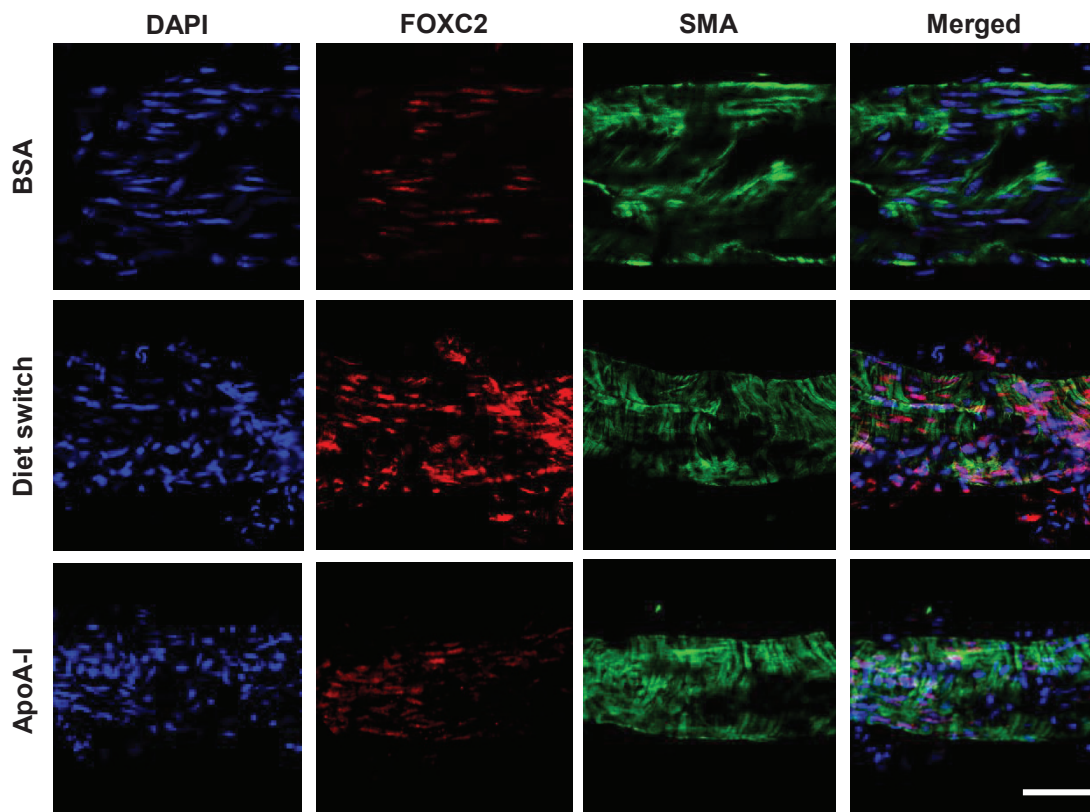


Figure S3. Effect of apoA-I treatment on FOXC2 expression on lymphatic endothelial cells. Representative images of FOXC2 and smooth muscle cells (smooth muscle actin, SMA) expression in collecting lymphatic vessels of BSA, diet switch and apoA-I treated *Ldlr*^{-/-} mice. Popliteal collecting lymphatic vessels were harvested and processed for immunofluorescence detection. Longitudinally imaged single plan vessels were acquired with an LSM 710 Confocal Microscope (Zeiss) equipped with a 63X/1.4 oil dic objective. Experiments were performed with 4 replicates per experimental group. Scale bar = 50 μ m.

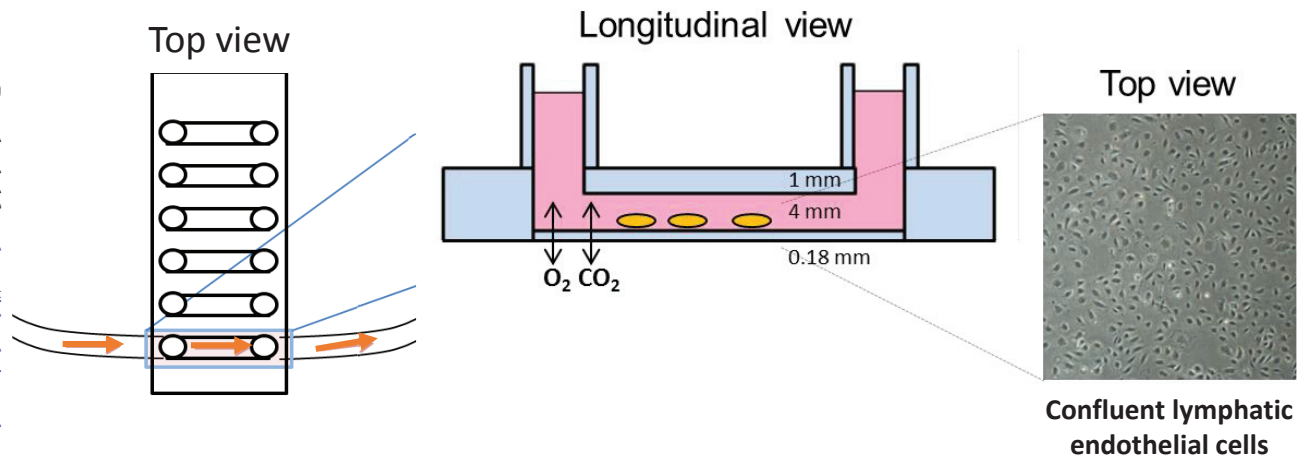


Figure S4. Analysis of platelet adherence on lymphatic endothelial cells under a physiological lymph flow. Human platelets were isolated and perfused over primary HMVEC-dLyAd seeded at 80% confluence in IbiTreated flow chambers at a wall shear rate of 50 s⁻¹ at 37 °C for 8 minutes. Orange arrows indicate the direction of flow.

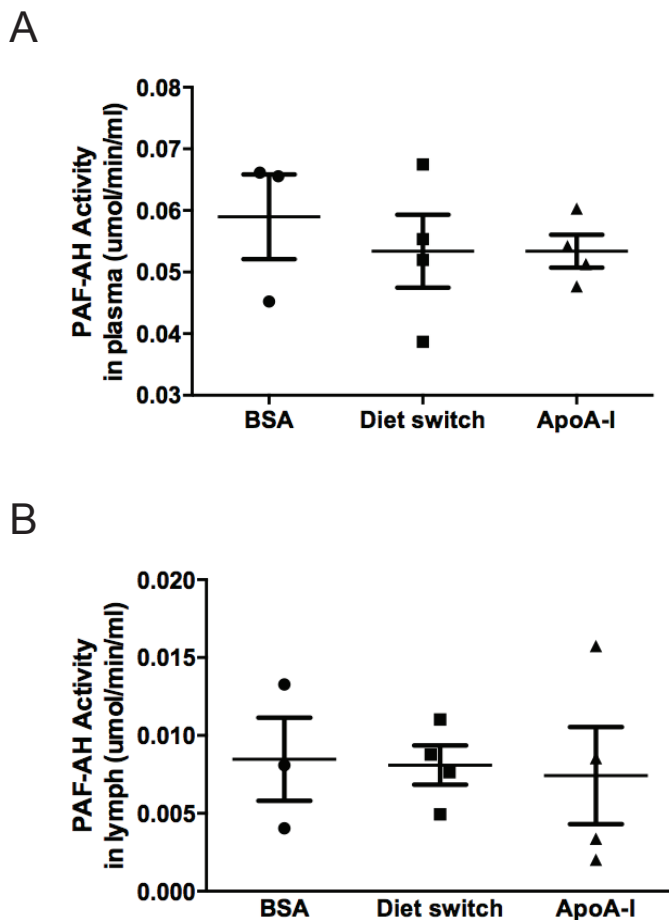


Figure S5. PAF-AH activity in plasma and lymph. Total PAF-AH activity was assessed in **A**, plasma and **B**, lymph of BSA, diet switch and apoA-I treated *Ldlr*^{-/-} mice. Experiments were performed with 3-4 mice per experimental group.



Apolipoprotein A–I Modulates Atherosclerosis Through Lymphatic Vessel–Dependent Mechanisms in Mice

Andreea Milasan, Gabriel Jean, François Dallaire, Jean-Claude Tardif, Yahye Merhi, Mary Sorci-Thomas and Catherine Martel

J Am Heart Assoc. 2017;6:e006892; originally published September 22, 2017;

doi: 10.1161/JAHA.117.006892

The *Journal of the American Heart Association* is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75231
Online ISSN: 2047-9980

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://jaha.ahajournals.org/content/6/9/e006892>