

Université de Montréal

Les vésicules apoptotiques de type exosome transfèrent de l'ARNm bioactif aux cellules endothéliales par macropinocytose dépendante de la phosphatidylsérine

Par

Alexandre Brodeur

Programmes de Biologie Moléculaire, Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de maître ès science (M. Sc.)

en Biologie Moléculaire, Maladies Complexes chez l'Humain

Novembre 2022

© Alexandre Brodeur, 2022

Université de Montréal

Département de Biologie Moléculaire, Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé

Les vésicules apoptotiques apparentées aux exosomes transfèrent un ensemble spécifique d'ARNm aux cellules endothéliales par macropinocytose dépendante de la phosphatidylsérine

Présenté par

Alexandre Brodeur

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

Dr. El Bachir Affar

Président-rapporteur

Dre. Marie-Josée Hébert

Directrice de recherche

Dre. Mélanie Dieudé

Codirectrice

Dr. Jean-François Côté

Membre du jury

Résumé

L'ischémie-reperfusion inhérente à toute transplantation d'organe solide induit l'apoptose des cellules endothéliales. Les cellules endothéliales apoptotiques sécrètent des vésicules extracellulaires apoptotiques de type exosome (ApoExo). L'internalisation des ApoExo par les cellules endothéliales (CE) adjacentes conduit à des changements fonctionnels importants dont le dysfonctionnement endothélial. Cependant, les mécanismes d'internalisation des ApoExo par les CE sont méconnus. Des marqueurs fluorescents spécifiques aux protéines et à l'ARN ont été utilisés afin de marquer spécifiquement les ApoExo et étudier leur internalisation par microscopie confocale et cytométrie de flux. Les ApoExo ont été internalisés par les CE en fonction du temps et de la concentration. L'inhibition des voies classiques d'endocytose à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques et d'interférence par ARN n'a pas réduit les niveaux d'internalisation des ApoExo. Le blocage de la phosphatidylsérine des ApoExo avec l'annexine-V a réduit leur internalisation. L'analyse ultrastructurale par microscopie électronique des CE a révélé la présence de structures lamellipodes importantes pour la macropinocytose dont l'inhibition a diminué le transfert d'ARN et de protéines dans les CE. L'analyse par RT-qPCR a révélé que l'ARNm PCSK5, le plus enrichi dans les ApoExo, est augmenté dans les CE traitées aux ApoExo. Cette augmentation est abolie avec ApoExo exempts d'ARNm PCSK5. Ces résultats démontrent que les ApoExo sont activement internalisés par macropinocytose dépendante de la phosphatidylsérine, favorisant leur internalisation en augmentant l'activité macropinocytique des CE. Les ApoExo transfèrent ainsi des ARN fonctionnels capables de moduler le protéome des CE. Ces résultats ouvrent de nouvelles portes pour la prévention de l'internalisation des ApoExo, et donc de la dysfonction endothéliale.

Mots-clés : Apoptose, Exosome, Vésicules extracellulaires, ApoExo, Cellules endothéliales, Macropinocytose, Rétroactivation, Transfert de cargo, ARNm, PCSK5

Abstract

Ischemia-reperfusion injury inherent to solid organ transplantation induces endothelial apoptosis, releasing apoptotic exosome-like vesicles (ApoExo) which in turn induce endothelial dysfunction. We showed that ApoExo modulates gene expression, functions, and morphology of endothelial cells (EC) towards endothelial dysfunction. However, the mechanism by which EC internalize ApoExo remains unclear. Fluorescent probes specifically targeting proteins and RNA were used to track ApoExo uptake in EC by flow cytometry and confocal microscopy. Pharmacological inhibitors and gene silencing were used to probe uptake mechanisms. RNA and protein expression were quantified using Taqman RT-qPCR and immunoblot, respectively. Uptake of ApoExo by EC was observed in a time- and concentration-dependent manner. Inhibition of clathrin- and caveolae-dependent endocytosis did not decrease ApoExo internalization by EC. Blocking phosphatidylserine on ApoExo surface with annexin-V decreased ApoExo uptake. Ultrastructural analysis of serum-starved EC via electron microscopy revealed lamellipodia-like structures, hallmark of macropinocytosis, whose number increased following ApoExo exposure. Inhibition of macropinocytosis abrogated both RNA and protein transfers from ApoExo to EC. The most enriched mRNA in ApoExo, coding for PCSK5, showed enhanced levels in ApoExo-treated EC along with increased PCSK5 protein levels. This was abrogated by both macropinocytosis inhibition and depletion of PCSK5 mRNA in ApoExo. These results demonstrate that EC actively internalize ApoExo through phosphatidylserine-dependent macropinocytosis, and moreover, that ApoExo further increase macropinocytosis. These findings also show that functional RNAs can be delivered to EC through ApoExo. These results open new avenues for preventing ApoExo internalization and counteracting the development of endothelial dysfunction.

Keywords: Apoptosis, Extracellular Vesicles, Exosomes, ApoExo, Endothelial Cells, Macropinocytosis, Positive Feedback Loop, Cargo Transfer, ARNm, PCSK5

Table des matières

Résumé.....	3
Abstract.....	5
Table des matières.....	7
Liste des tableaux.....	13
Liste des figures.....	14
Liste des sigles et abréviations.....	16
Remerciements.....	21
Chapitre 1 – Introduction.....	23
1.1 L’apoptose.....	23
1.1.1 Généralité.....	23
1.1.1.1 Les marqueurs de l’apoptose.....	24
1.1.2 Les caspases.....	25
1.1.2.1 Structure des caspases.....	26
1.1.2.2 Activation des caspases.....	28
1.1.3 Voie intrinsèque et extrinsèque.....	29
1.1.3.1 Modes d’activation et effecteurs.....	30
1.1.4 Mort cellulaire programmées dans le système vasculaire.....	33
1.1.4.1 Composition vasculaire.....	33
1.1.4.2 Homéostasie vasculaire.....	35
1.1.4.3 Apoptose endothéliale.....	36
1.1.4.3.1 Cause de l’activation de l’apoptose endothéliale.....	36
1.1.5 Formation de vésicules chez les cellules apoptotiques.....	37

1.1.5.1 Corps apoptotiques.....	37
1.1.5.2 Vésicules apoptotiques apparentées aux exosomes	38
2. Les vésicules extracellulaires.....	40
1.2.1 Généralités	40
1.2.2 Les microvésicules.....	40
1.2.3 Les exosomes	42
1.2.3.1 Dégradation ou recyclage	44
1.2.4 Chargement du cargo.....	45
1.2.4.1 Cargo associé à la membrane vésiculaire	45
1.2.4.2 Cargo intraluminal.....	46
1.2.5 Communication intercellulaire.....	47
1.2.5.1 Liaison avec ligand.....	47
1.2.5.2 Internalisation	48
1.3. L'endocytose	48
1.3.1 Généralités	48
1.3.2 Les modes d'endocytose classiques.....	50
1.3.2.1 L'endocytose médiée par la clathrine.....	50
1.3.2.2 L'endocytose médiée par les caveolae	52
1.3.3 Les modes d'endocytose non-classiques	54
1.3.3.1 La fusion vésiculaire	54
1.3.3.2 La phagocytose.....	55
1.3.3.3 L'endocytose médiée par les radeaux lipidiques	55
1.3.3.4 La macropinocytose	56
1.3.3.4.1 La macropinocytose chez différents types cellulaires	58

1.3.3.4.2 La macropinocytose chez différents types cellulaires	59
1.3.4 L'échappement endosomal.....	60
Question et objectifs.....	62
Question	62
Hypothèse	62
Objectif	62
Chapitre 2 – Méthodologie	63
Culture cellulaire et réactifs	63
Isolation de vésicules extracellulaires.....	63
Évaluation de l'apoptose.....	63
Mesure de l'activité du protéasome.....	64
Cytométrie en flux des vésicules.....	64
Cytométrie en flux.....	65
Microscopie confocale	65
Microscopie électronique	65
Transfection d'ARN interférant.....	66
Lyse cellulaire, isolation des protéines et immunobuvardage	66
Séquençage d'ARN	67
RT-qPCR.....	67
Analyse statistique	68
Chapître 3 – Résultats	69
3.1 Les ApoExo sont différents des corps apoptotiques et des exosomes normaux.	69
3.2 Les ApoExo sont activement internalisés par les cellules endothéliales.....	71
3.3 Les ApoExo sont internalisés par endocytose non-classique.....	74

3.4 Les cellules endothéliales internalisent les ApoExo par macropinocytose.	78
3.5 Les ApoExo transfèrent leur contenu en ARN aux cellules endothéliales par macropinocytose.....	80
3.6 Le cargo en ARNm des ApoExo modifie le transcriptome des cellules endothéliales de façon unique.....	82
Chapître 4 – Discussion	87
4.1 Les vésicules apoptotiques apparentées aux exosomes diffèrent des corps apoptotiques et des autres exosomes par leur biogenèse et contexte cellulaire particulier	87
4.1.1 Le cargo d’acides nucléiques des ApoExo diffère des exosomes classiques par le contexte apoptotique.....	88
4.1.2 Exploration du lien entre la biogenèse et incorporation des marqueurs protéiques connus	90
4.1.3 Le cargo spécifique d’ARNm des ApoExo semble échapper à la dégradation lysosomale avant de moduler le phénotype cellulaire	91
4.1.3.1 Exploration des mécanismes d’échappement endosomal	91
4.2 Les ApoExo exploitent une voie d’endocytose considérée complémentaire et favorisent leur propre internalisation	94
4.2.1 Exploration des limites expérimentales des inhibiteurs spécifiques d’endocytose	94
4.2.1.1 La fusion vésiculaire n’est probablement pas impliquée dans le transfert du cargo des ApoExo aux cellules endothéliales	95
4.2.2 Exploration du rôle de la phosphatidylsérine dans l’internalisation des ApoExo	96
4.2.2.1 Exploration de l’action des ApoExo sur l’activité macropinocytique de différents types cellulaires.....	97
4.2.2.2 Exploration des mécanismes d’action des ApoExo sur l’activité macropinocytique chez les cellules endothéliales	98
4.2.3 Les ApoExo ont un potentiel de modulation de pathogenèse chez l’humain	100

4.2.4 Effets potentiels des ApoExo sur différents systèmes cellulaires.....	101
4.3 Exploration des impacts de la surexpression de la protéine PCSK5 induite par les ApoExo	103
4.3.1 Potentiel modulateur des ApoExo par l'action de la protéine PCSK5	104
Chapitre 5 – Conclusion et perspectives.....	107
Références bibliographiques.....	109
Annexes	125
Annexe 1.....	125
Annexe 3.....	127
Annexe 4.....	128
Annexe 5.....	130

Liste des tableaux

Tableau 1. – Liste des 25 premiers transcrits codants enrichis dans les ApoExo, les corps apoptotiques et cellules endothéliales en conditions normales et carencées en sérum130

Liste des figures

Figure 1. – Schématisation des étapes générales du processus apoptotique chez une cellule eukaryote.....	25
Figure 2. – Structure et domaines des caspases par groupe.....	27
Figure 3. – Activation des caspases initiatrices et effectrices.....	29
Figure 4. – Voies intrinsèque et extrinsèques de l'apoptose.....	32
Figure 5. – Anatomie générale d'un vaisseau sanguin.....	35
Figure 6. – Formation de différents types de vésicules extracellulaires à partir de cellules apoptotiques.....	39
Figure 7. – Survol des modes de formation des microvésicules et exosomes.....	41
Figure 8. – Machineries de formation des exosomes et transport de cargo.....	43
Figure 9. – Étapes générales de maturation d'un macropinosome.....	49
Figure 10. – Formation d'un puit enrobé de clathrine.....	52
Figure 11. – Schématisation des éléments essentiels à la formation d'une cavéola.....	53
Figure 12. – Polymérisation de l'actine menant à la formation d'un macropinosome.....	57
Figure 13. – Les vésicules apoptotiques apparentées aux exosomes sont différentes des exosomes classiques et des corps apoptotiques.....	70
Figure 14. – Les ApoExo sont activement internalisés par un mécanisme dépendant de l'énergie.....	73
Figure 15. – Les vésicules apoptotiques apparentées aux exosomes sont internalisées par endocytose non-classique.....	75
Figure 16. – L'internalisation des vésicules apoptotiques apparentées aux exosomes est régulée par un mécanisme dépendant de la phosphatidylsérine.....	77
Figure 17. – Les vésicules apoptotiques apparentées aux exosomes sont internalisées par les cellules endothéliales par macropinocytose.....	79

Figure 18. – Les ApoExo transfèrent de l'ARN aux cellules endothéliales par macropinocytose.	81
Figure 19. – Les ApoExo expriment un profil d'ARNm spécifique.	83
Figure 20. – Les ApoExo transfèrent de l'ARNm fonctionnel et augmente les niveaux d'expression de la protéine PCSK5 chez les cellules endothéliales.	85
Figure 21. – Schématisation des ApoExo transférant des ARNm fonctionnels aux cellules endothéliales par macropinocytose dépendante de la phosphatidylsérine.	88
Figure 22. – Schématisation des méthodes d'échappement endosomal.	93
Figure 23. – Schématisation des mécanismes de formation de macropinosome.	100
Figure 24. – Route de transport du système endomembranaire à l'appareil de Golgi.	103

Liste des sigles et abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AP : Protéine adaptatrice

Apaf-1 : Facteur 1 d'activation des peptidases apoptotiques

ApoExo : Vésicules apoptotiques apparentées aux exosomes

AnxV : Annexine 5

Arf : Facteur de ribosylation de l'ADP

Arp 2/3 : Protéine reliée à l'actine 2/3

ARN: Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

miARN : microARN

siARN : petit ARN interférant

ARRDC1 : Protéine contenant le domaine arrestine 1

ATP : Adénosine triphosphate

CA : Corps apoptotiques

CARD : Domaine de recrutement des caspases

CAV1 : Cavéoline-1

CD : Groupe de différenciation

CE : Cellule endothéliale

CME : Endocytose médiée par la clathrine

CNMC : Comité de nomenclature sur la mort cellulaire

Cyto D : Cytochalasine D

DED : Domaine effecteur de mort

DISC : Complexe de signalisation inducteur de la mort

DNM I/II: Dynamine I/II

EIPA : 5-(N-ethyl-N-isopropyl)amiloride

eNOS : Oxyde nitrique synthase endothéliale

ESCRT : Complexe de triage endosomal requis pour le transport

ExoN : Exosomes produits par les HUVEC en conditions normales

spFACS : Cytométrie de flux activée par fluorescence à petite particules

FGFR : Récepteur de facteur de croissance des fibroblastes

FITC : Isothiocyanate de fluorescéine

GO : Ontologie des gènes (Gene Ontology)

GTP : Guanosine triphosphate

GPCR : Récepteur couplé à une protéine G

hnRNP : Ribonucléoprotéine nucléaire hétérogène

HSC : Concaténât de choc thermique

HSP : Protéine de choc thermique

HSPG : Protéoglycan sulfate d'héparane

HUVEC : Cellules endothéliales de veine de cordon ombilical

ICAD : Inhibiteur de DNases activées par les caspases

ICAM : Molécule d'adhésion intercellulaire

IgG : Immunoglobuline G

ILV : Vésicule intraluminale

M β CD : Méthyl- β -cyclodextrine

MVB : Corps multivésiculaire

PBS : Saline tamponnée avec du phosphate

PIDD : Domaine de mort induit par p53

PIP : Phosphatidylinositol monophosphate

PCSK5: Protéine convertase subtilin/kexin-like 5

PKC- δ : Protéine kinase C δ

PtdSer : Phosphatidylsérine

RISC : Complexe d'extinction génique induit par l'ARN

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

RT-qPCR : Réaction en chaîne par polymérase quantitative à transcription inverse

SNARE : Récepteur de protéines d'attachement solubles NSF

SUMO : Petit modificateur ressemblant à l'ubiquitine

TGF- β 1 : Facteur de croissance transformant β 1

TIM : Immunoglobuline-mucine des cellules T

TRAIL : Ligand relié au facteur de nécrose de tumeur induisant l'apoptose

VEGF : Facteur de croissance endothélial vasculaire

VEGFR : Récepteur du facteur de croissance endothélial vasculaire

WASp : Protéine du syndrome Wiskott-Aldritch

Tsé, c'est comme d'la cuisine. Et moi, j'cuisine au feeling.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes directrices de recherche Dre Marie-Josée Hébert et Mélanie Dieudé. Merci de votre rigueur, qui a toujours su pousser ma pensée plus loin. Merci de votre candeur, qui se veut légère et pleine de volonté. Merci aussi de votre intégrité scientifique, d'avoir toujours été critiques face à des résultats plus que prometteurs. Merci surtout de votre support moral et académique, grâce auxquels j'ai pu monter ce grand projet, non seulement du point de vue académique, mais aussi du point de vue personnel. Vous avez su établir un environnement de travail plus que stimulant, et surtout accueillant.

Ensuite, merci aux équipes des Dre Hébert et Dieudé. À Francis, fervent admirateur de persévérance et de curiosité scientifique, merci de nous remuer les méninges et de partager ton engouement pour l'avancement des divers projets. À Julie, organisatrice hors pair, et ses questions probantes lors des présentations étudiantes. À Stéphanie et Annie, qui malgré leurs nouveaux projets, demeurent d'importantes figures dans l'évolution des études et le bon déroulement des expériences.

Aussi, merci aux autres étudiants des deux équipes. Marie-Hélène et Sandrine, merci de partager les hauts et bas de la vie étudiante. Votre joie de vivre et empathie sont des plus réconfortantes. Merci aussi à Hyunyun et ses petits cours de Coréen d'avoir épaulé mon apprentissage et ouverts mes horizons. Merci à Imane de sa curiosité et jugement critique envers les différents projets, qu'ils soient plus ou moins reliés à ses propres expériences.

Finalement, merci aux plateformes de cytométrie et d'imagerie cellulaire du CRCHUM, ainsi qu'à la plateforme de microscopie électronique de l'Université pour votre aide avec la résolution des problèmes techniques en cours d'acquisition.

À tous et toutes, un grand Merci!

Chapitre 1 – Introduction

1.1 L'apoptose

1.1.1 Généralité

L'apoptose est depuis longtemps reconnue comme un type de mort cellulaire programmée. Elle se caractérise par des changements morphologiques et métaboliques hautement contrôlés. Ce processus est dépendant de l'énergie et survient de façon signalétique, tant à l'intérieur qu'à l'extérieur de la cellule (Taylor, 2008). Plus récemment, le Comité de Nomenclature sur la Mort Cellulaire (CNMC) a établi des lignes directrices pour non seulement l'identification de l'apoptose, mais aussi des autres types de mort cellulaire (Galluzzi, 2018). Il est important de noter que différents types cellulaires ne répondent pas tous de la même manière à un stimulus donné. Par exemple, une insulte vasculaire causée par ischémie-reperfusion – un dommage inhérent à la transplantation d'organe – cause la mort par apoptose des cellules endothéliales (Yang, 2018 ; Lan 2021), alors que les cellules épithéliales tubulaires meurent par nécrose (Hesketh, 2014; Yang 2018).

Les premières études sur l'apoptose chez l'organisme modèle *Caenorhabditis elegans* (Horvitz, 1999) ont révélé que le phénomène est à vrai dire essentiel pour le développement et l'homéostasie des organismes multicellulaires. D'autre part, les cellules immunitaires sont aussi contrôlées par l'apoptose (Opferman, 2008). Effectivement, après leur genèse, les lymphocytes, de nature destinés à l'apoptose, doivent passer plusieurs points de contrôle (ex. : Hypermutations somatiques) avant de poursuivre leur maturation (Zhang 2005). Ces études ont caractérisé les étapes de l'apoptose dans plusieurs types cellulaires, en plus de son rôle dans l'homéostasie des différents systèmes composant l'organisme

Enfin, même si la caractérisation des changements morphologiques causées par l'apoptose est bien établie depuis des décennies, les mécanismes sous-jacents ainsi que les effecteurs sont encore étudiés de nos jours (Yatim, 2017 ; Kriel & Loos, 2019 ; Seyrek, 2019 ; Roberts, 2021).

1.1.1.1 Les marqueurs de l'apoptose

Effectivement, toutes les cellules apoptotiques, peu importe leurs origines et fonctions, démontrent des signes propres à l'apoptose (Häcker, 2000). Au déclenchement de l'apoptose, une réduction du volume cellulaire et nucléaire – collectivement appelés pycnose - est observable (Kerr, 1972). Cette réduction de volume cause la formation de « bourgeons » à la membrane plasmique qui se détachent en corps apoptotiques, entraînant avec eux des organelles cellulaires intactes (Elmore, 2007). Parallèlement, le noyau se fragmente dans un processus appelé caryorrhexie. Ces fragments peuvent aussi être inclus dans les corps apoptotiques. Un des aspects importants de la fragmentation et inclusion des composantes cellulaires dans les corps apoptotiques est que les membranes restent intactes - et donc imperméables - ne laissant sortir virtuellement aucune composante dans le milieu extracellulaire. De ce fait, traditionnellement l'apoptose était reconnue comme un processus qui se déroule sans provoquer une inflammation, et par conséquent, ce type de mort cellulaire se qualifie comme étant immunotolérant (Kurosaka, 2003).

Malgré ce « silence », il y a tout de même lieu à un recrutement de cellules immunitaires. Cependant, le processus ne cause pas d'inflammation classique à priori. Plutôt, les corps apoptotiques issus de l'apoptose recrutent des macrophages grâce à leur signature lipidique altérée (Platt, 1998), soit par l'exposition de la phosphatidylsérine (PtdSer) au feuillet externe de la double membrane intacte (Bossy-Wetzels et Green, 2000). Ce faisant, les macrophages relâchent des cytokines anti- inflammatoires, comme le facteur de croissance transformant $\beta 1$ (Transforming Growth Factor $\beta 1$ ou TGF- $\beta 1$) (Fadok, 1997). Normalement, la PtdSer est confinée à la couche interne de membrane plasmique. Son externalisation est possible grâce à la dérégulation des protéines transmembranaires flippases et scramblases lors de l'apoptose (Hankins, 2015).

Somme toute, ces différentes caractéristiques des cellules apoptotiques sont possibles grâce à une famille de protéines centrale au processus, les caspases.

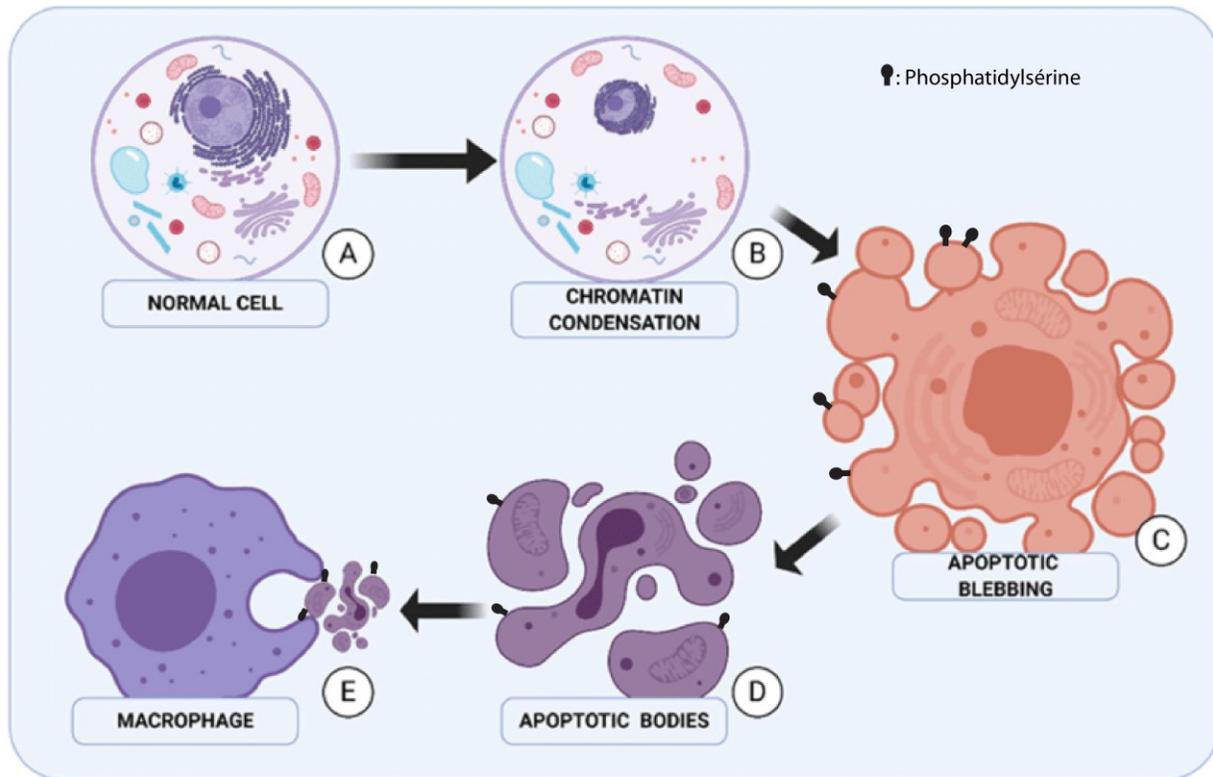


Figure 1. – **Schématisation des étapes générales du processus apoptotique chez une cellule eukaryote.** A) Une cellule normale reçoit une combinaison de signaux menant à l’activation de l’apoptose. B) La chromatine commence à se condenser accompagnée d’une réduction du volume cellulaire. C) La membrane plasmique commence à se fragmenter en corps apoptotiques. Du même coup, la signature de la membrane plasmique est modifiée par l’externalisation de la phosphatidylsérine. D) Les vésicules apoptotiques de différentes tailles et contenu sont libérées dans le liquide interstitiel. E) Les phagocytes professionnels débarrassent le milieu interstitiel des vésicules apoptotiques. Les phagocytes relâchent des cytokines anti-inflammatoires. Schéma adapté de Chmurska et al. CC BY-4.0.

1.1.2 Les caspases

Effectivement, les caspases (Cysteiny Aspartate-Specific ProteinASE) sont des endopeptidases à la base de la médiation intracellulaire de l’apoptose. Comme leur nom le suggère, grâce à leur résidu cystéine situé dans la pochette catalytique, ces enzymes coupent les protéines à la suite d’un résidu aspartate (Earnshaw, 1999). Chez l’humain, on dénote 12 caspases, quoique certaines d’entre elles ne sont exprimées que chez certains types cellulaires (Denecker 2008 ; Markiewicz, 2021) ou même seulement chez certains individus (Julien & Wells, 2017). Plus récemment, des rôles indépendants de l’apoptose sont attribués aux caspases. En effet, leur implication dans le

cycle cellulaire et la réparation de l'ADN a été repertoriée (Brown-Suedel & Bouchier-Hayes, 2020). Cependant, puisque ces rôles ne font pas partie des travaux présentés ici, seuls les rôles classiques des caspases seront discutés. Donc, classiquement, les caspases sont divisées en trois groupes, et chacun possède des domaines fonctionnels ainsi que des séquences consensus de reconnaissance et de clivage qui leur sont propres.

Effectivement, les caspases du groupe I (-1, -4, et -5) possèdent un long domaine de recrutement et préfèrent les acides aminés hydrophobes en 4^e position suivant le résidu aspartate. Ceci est conforme au rôle de la caspase -1 dans son rôle bien connu comme activateur de l'interleukine-1 β (Denes, 2012). En contrepartie, les caspases appartenant au groupe II (-3, -6 et -7) possèdent un prodomaine court et requièrent un deuxième résidu aspartate en 4^e position. De façon intéressante, cette séquence d'acide aminé est retrouvée chez les protéines clivées pendant l'apoptose. Par conséquent, ces caspases sont traditionnellement classifiées comme effectrices dans le contexte de l'apoptose (Thornberry, 1997 ; Julien & Wells, 2017). Finalement, le groupe III (-2, -8, -9 et -10) contient un long domaine de recrutement avec un résidu leucine ou valine en 4^e position. Certainement, la classification de certaines caspases est plus ambiguë. De nos jours, ces mêmes groupes, ainsi que leurs membres, sont plutôt séparés par leurs fonctions ; elles seront donc connues comme caspases inflammatoires, apoptotiques initiateuses et apoptotiques effectrices respectivement (Shrestha & Clark, 2021). Il est à noter que les procaspases inflammatoires et initiateuses sont présentes sous forme de monomère, alors que les procaspases effectrices le sont sous forme de dimères.

1.1.2.1 Structure des caspases

Malgré leurs spécificités, les procaspases partagent certaines caractéristiques liées à leur structure. Elles possèdent chacune trois domaines distincts, soit un prodomaine en N-terminal, suivi d'une longue et d'une petite sous-unité (MacKenzie & Clark, 2012). Ces deux sous-unités sont reliées par une séquence peptidique dont la longueur varie légèrement d'une procaspase à l'autre.

Les prodomaines ne servent pas seulement à prévenir l'activité des caspases, mais agissent aussi comme chaperonne intramoléculaire et signal de localisation cellulaire (Dagbay & Hardy, 2017).

Aussi, c'est à l'intérieur de ce même prodomaine qu'on retrouve les séquences responsables de la dimérisation des caspases (McIlwain, 2013), en plus des séquences ciblées par les activateurs des caspases. La dimérisation des caspases est essentielle à leur activité, puisque chaque monomère contribue à la formation du site actif de l'enzyme complète. Le lien peptidique reliant la grande et la petite sous-unité est alors coupé pour stabiliser les dimères, mais cet événement est considéré non essentiel à l'activité enzymatique, puisque le site actif est tout de même créé.

Comme mentionné ci-haut, les prodomaines contiennent des domaines de recrutement des activateurs des caspases. Ces domaines de recrutement de facteur de mort (Death Effector Domain, ou DED) et de caspases (Caspase Recruitment Domain, ou CARD) servent à diriger la réponse aux différents signaux apoptotiques vers les caspases initiatrices afin de les activer (Lavrik, 2005; MacKenzie & Clark, 2012).

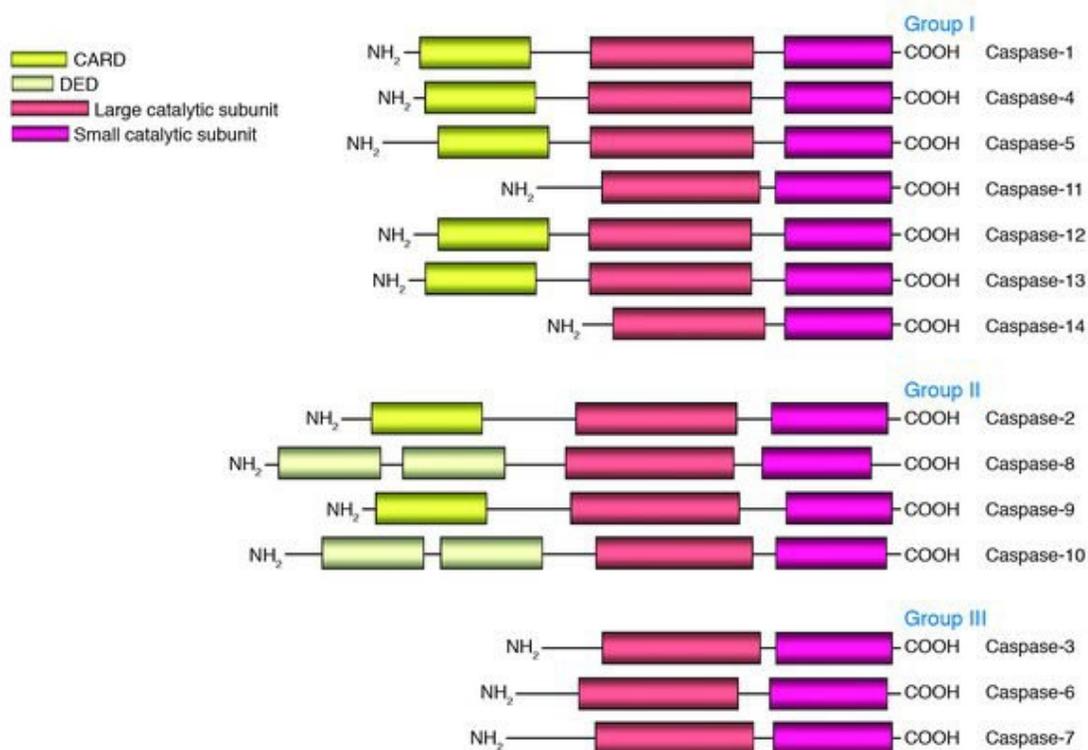


Figure 2. – **Structure et domaines des caspases par groupe.** Les caspases sont regroupées par leurs fonctions et substrats de préférence. Elles possèdent toutes une grande et une petite sous-unité séparée par un lien peptidique. Les groupes I et II contiennent des domaines de recrutement des caspases (CARD) ainsi que des domaines de facteur de mort (DED) retrouvés du côté N-terminal. Les caspases effectrices ne possèdent pas de domaines CARD ou DED, formant le groupe III. Image adaptée de Lavrik et al. CC BY-4.0.

1.1.2.2 Activation des caspases

À la suite de leur recrutement par ces signaux apoptotiques via leur domaines DED ou CARD, les procaspases initiatrices se dimérisent suite à l'augmentation de leur concentration locale. Une fois dimérisées, les prodomaines s'autoclivent, changeant les propriétés de la caspase de trois façons. En un premier temps, l'ablation du prodomaine permet le repliement de la grande et petite sous-unité l'une sur l'autre. En deuxième temps, comme il l'est déjà mentionné, le clivage du lien peptidique entre les sous-unités stabilise l'état actif des caspases. En un troisième temps, les caspases initiatrices sont maintenant libres de leur séquestration aux domaines de recrutement de procaspases et sont ainsi libérées dans le cytosol.

Quant à elles, les procaspases dites effectrices se dimérisent sans s'activer. Se sont les caspases initiatrices actives qui accomplissent se rôle, par reconnaissance des séquences polypeptidiques reliant les sous-unités des procaspases effectrices. Après leur clivage, un changement de conformation structurel permet l'ouverture du site actif des procaspases afin de lui donner accès à leurs substrats apoptotiques

Effectivement, les caspases sont reconnues comme effecteurs de l'apoptose par leur affinité pour les substrats apoptotiques selon les séquences consensus établies entre autres par protéomique (Julien et Wells, 2017). De plus, les caspases préféreront les substrats dans lesquels la séquence consensus est contenue dans une boucle, hélice- α ou feuillet- β . Ces structures sont retrouvées particulièrement dans les prodomaines des caspases effectrices ainsi que les effecteurs directs de l'apoptose, comme l'inhibiteur de la DNase activée par les caspases (Inhibitor of Caspase Activated DNase, ou ICAD). Cette préférence, couplée à la séquence consensus, établie les caspases comme centrales à la médiation de l'apoptose.

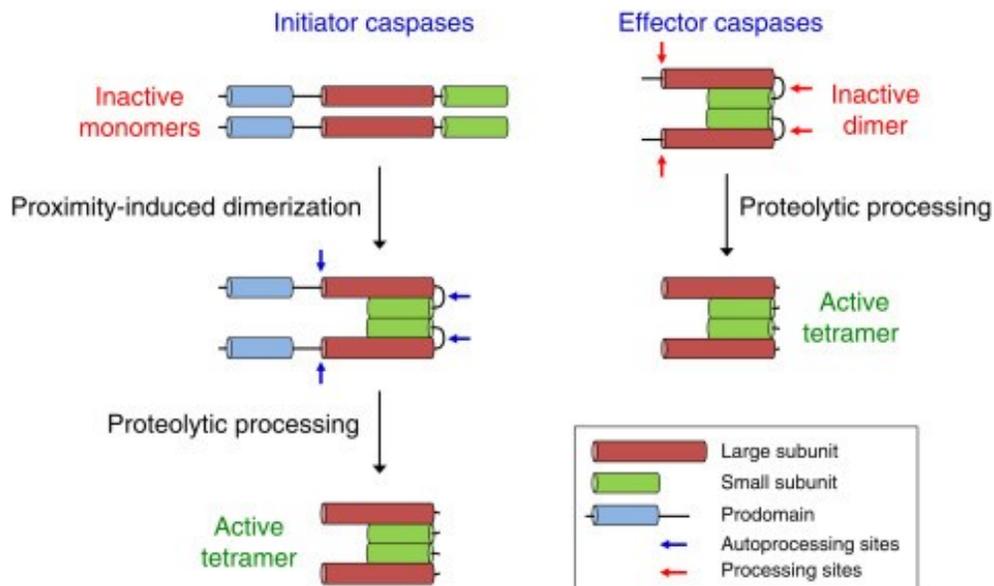


Figure 3. – **Activation des caspases initiatrices et effectrices.** Les caspases initiatrices se dimérisent par proximité. Les sites autocatalytiques clivent les liens peptidiques entre les petites et grandes sous-unités et les domaines de recrutement. Les caspases effectrices sont dimérisées, mais s’activent seulement après clivage par les caspases initiatrices. Image tirée de Puccini & Kumar. Licence obtenue via CCC-RightsLink.

1.1.3 Voie intrinsèque et extrinsèque

Il existe deux voies classiques d’activation de l’apoptose médiée par les caspases, la voie extrinsèque et intrinsèque. Comme leur nom l’indique, les signaux apoptotiques peuvent provenir de l’extérieur de la cellule, ou bien de l’intérieur.

De son côté, la voie extrinsèque est activée à la suite de la liaison de récepteurs de mort à la surface de la cellule, qui contiennent des domaines de mort (Death Domain, ou DD), ce qui recrute les caspases initiatrices Casp-8 et -10 via leur DED, formant ainsi un complexe de signalisation induisant la mort (Death-inducing Signalling Complex, ou DISC). À la suite du clivage et libération des récepteurs, ces caspases initiatrices activent leurs substrats respectifs, soit les caspases effectrices. De façon similaire, la caspase-2 est recrutée à la protéine inductible par la p53 contenant un domaine de mort (p53-Inducible protein with Death Domain, ou PIDD) via leur domaine CARD, formant un complexe appelé PIDDosome (Brown-Suedel & Bouchier-Hayes, 2020). Ainsi recrutée, la caspase-2 peut se dimériser et s’autocliver. Cependant, malgré sa classification comme caspase initiatrice, la casp-2 est considéré unique puisque sa séquence

préférentielle de coupe est apparentée aux caspases effectrices. En effet, un de ses substrats de choix, la protéine BID, rejoint la voie intrinsèque de l'apoptose par son action sur la mitochondrie.

Quant à elle, la voie intrinsèque fait plutôt appel à des événements de signalisation intracellulaire considérés comme pro-apoptotiques et anti-apoptotiques. Il est important de noter que même si ces événements sont contenus à l'intérieur de la cellule-même, ils peuvent tout de même être influencés par l'environnement extracellulaire (i.e. : absence de facteurs de croissance, protéine d'ancrage). Toutefois, ces événements signalétiques internes convergent vers la perturbation de la membrane externe de la mitochondrie par la formation de pores membranaires. Ces pores permettront à plusieurs facteurs pro-apoptotiques de s'échapper dans le cytosol. Un facteur clé dans la voie intrinsèque de l'apoptose est le cytochrome *c*, qui s'attache au facteur-1 d'activation de peptidases apoptotiques (Apoptotic Peptidase Activating Factor 1, ou Apaf-1). Ce faisant, ces complexes s'heptamérisent à l'aide d'ATP en structure hélicoïdale et exposent les domaines CARD de Apaf-1. Sur chacune de ces hélices, des caspases initiatrices Casp-9 sont ensuite recrutées, homodimérisées, puis s'autoclivent en forme active (Dorstyn, 2018).

1.1.3.1 Modes d'activation et effecteurs

Comme mentionné ci-haut, la voie intrinsèque de l'apoptose fait appel à des événements de signalisation intracellulaire. Il existe à la fois des facteurs considérés pro-apoptotiques et anti-apoptotiques. De façon générale, les signaux anti-apoptotiques inhibent les effecteurs pro-apoptotiques. Une classe de facteurs pro-apoptotiques, appelés sentinelles, peuvent basculer les signaux apoptotiques en faveur de l'apoptose. Une famille de protéines centrale, la famille BCL-2, contient des membres de part et d'autre des signaux apoptotiques. Ces protéines se ressemblent par leur forme globulaire ainsi que leurs domaines d'interactions BH1 – BH4. Le domaine BH3 est partagé à travers tous les membres de cette famille ; il est responsable des interactions protéine-protéine (Naim & Kaufmann, 2020). Ce sont ces interactions qui établissent le verdict final quant à l'intégration des signaux apoptotiques.

Brièvement, les membres anti-apoptotiques (BCL-2, BCL-X_L) se lient aux effecteurs (BAX, BAK, BOK) afin de les inhiber. Les sentinelles (BAD, BID, PUMA, etc.) viennent bloquer les membres

anti-apoptotiques quand ils sont localisés à la membrane de la mitochondrie. Ce sont le nombre et l'affinité de chacune de ces protéines qui détermine la formation du complexe protéique responsable de la formation de pores à la membrane externe de la mitochondrie (Kale, 2018), notamment par l'incorporation de la protéine BAX. Ce faisant, le cytochrome *c* est relargué et participe à la formation de l'apoptosome. Il est à noter que la formation des pores est un processus dynamique. Les pores laisseront passer d'abord des petites protéines, comme le cytochrome *c*. À la suite du recrutement d'autres protéines BAX, les pores seront assez larges pour permettre à d'autres facteurs pro-apoptotiques, comme la protéine SMAC/Diablo, de venir prêter main forte aux sentinelles pro-apoptotiques (Paul, 2018).

Du côté de la voie extrinsèque, les récepteurs de mort sont activés à la suite de la liaison de leur ligand respectif. Cette liaison permet l'homotrimérisation des récepteurs à la surface cellulaire, et du même coup leurs domaines DD intracellulaires. Cependant, la liaison du ligand à son récepteur n'induit pas toujours l'activation de caspases initiatrices. Par exemple, les familles de récepteurs du ligand relié au facteur de nécrose de tumeur induisant l'apoptose (Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand, ou TRAIL) et FasR possèdent plusieurs formes inactives, appelées leurres. Ces leurres, qu'ils soient solubles ou ancrés à la membrane plasmique, sont incapables de recruter les caspases initiatrices. Il existe toutefois d'autres rôles chez cette famille de récepteurs, notamment dans l'inflammation (Zoller, 2017). Cependant, puisque ces rôles sont indépendants de l'apoptose, ils ne seront pas abordés dans cet ouvrage.

De plus, certains des substrats apoptotiques agissent comme point de non-retour à l'apoptose. Effectivement, l'ubiquitine ligase MDM2 est clivée par la caspase-2 (Poreba, 2019). Ce faisant, MDM2 perd son domaine C-terminal responsable de l'ubiquitylation de la protéine p53, normalement destinée à la dégradation par le protéasome (Oliver, 2011). La stabilisation de p53 induit la formation du PIDDosome, créant une boucle de rétroactivation en faveur de l'apoptose.

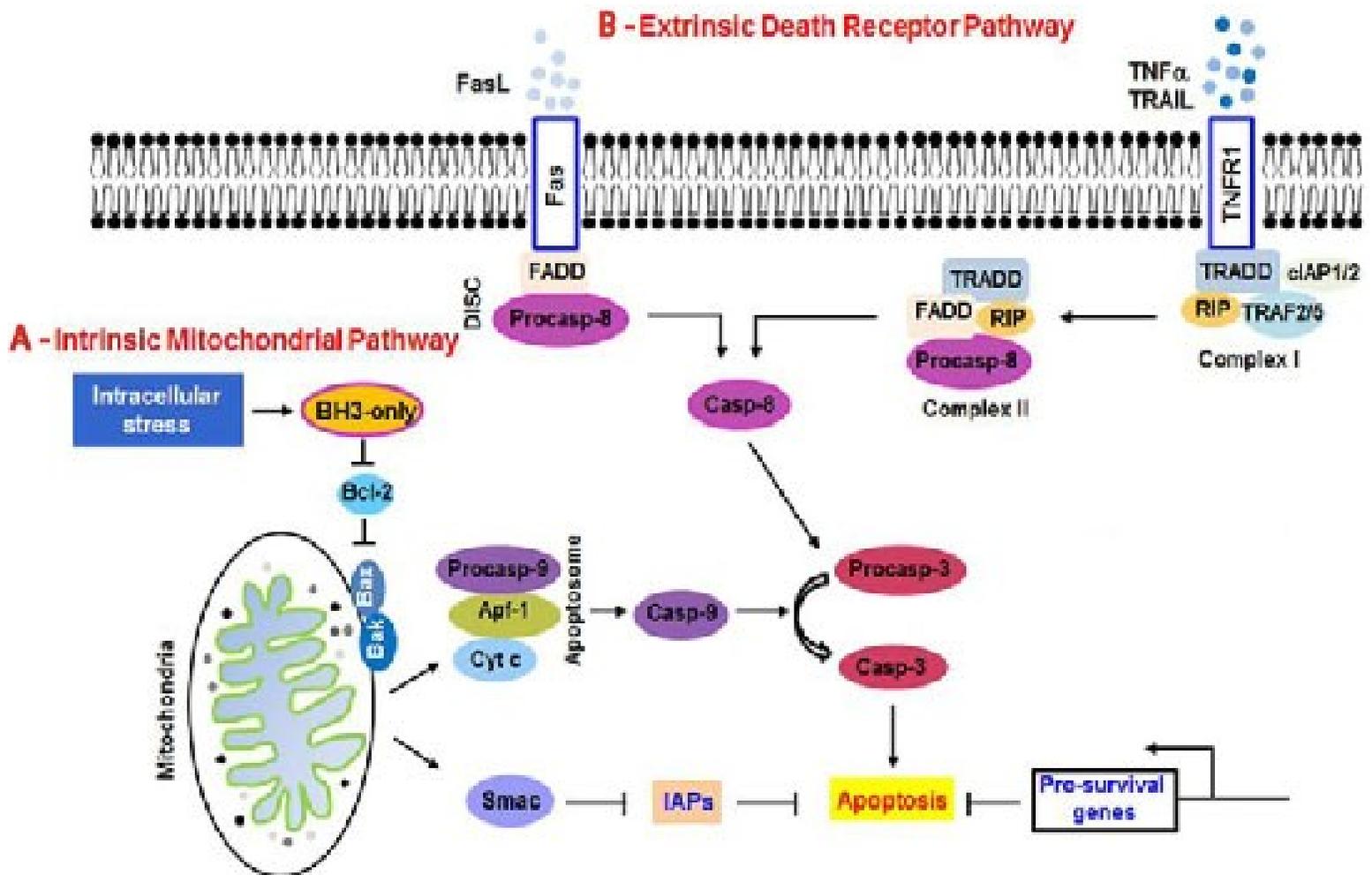


Figure 4. – **Voies intrinsèque et extrinsèques de l'apoptose.** A) Voie intrinsèque. Les signaux de stress cellulaire mènent à l'expression de protéines pro-apoptotiques contenant le domaine BH3 seulement. Ces protéines inhibent l'activité des sentinelles anti-apoptotiques, tel Bcl-2. Ce faisant, les effecteurs Bax et Bak favorisent la formation de pores à la membrane externe de la mitochondrie. Le cytochrome c est ainsi relâché et induit la formation de l'apoptosome à l'aide de la protéine Apf-1, qui active la caspase-9, qui a son tour active la caspase-3. Parallèlement, la protéine Smac/Diablo inhibe les inhibiteurs de l'apoptose (IAPs). B) Voie extrinsèque. Des récepteurs extracellulaires (Fas, TNFR) contenant les domaines de mort (FADD et TRADD) sont activés par liaison avec leur ligand (FasL, TNF α , Trail), menant à l'activation directe ou indirecte (formation de complexes activateurs) de la caspase-8. Une fois active, la caspase-8 convertie la procaspase-3 en caspase effectrice active. Finalement, la caspase-3 active le processus d'apoptose. Image adaptée de Li et al. CC BY-4.0

Ainsi, les effecteurs de l'apoptose sont activés à l'issue d'une des cascades de signalisation décrites plus haut. Ainsi, les substrats des caspases actives régulent les changements morphologiques observés lors de l'apoptose. Par exemple, la caspase-3 clive l'inhibiteur de la

DNase activée par la caspase (ICAD) qui se détache alors de la CAD. Cette séparation permet la trimérisation de CAD en sa forme active, qui fragmente ensuite l'ADN, sans toutefois affecter la morphologie du noyau (Sanchez-Osuna, 2014). Ce phénomène survient à la suite du clivage des protéines de la couche laminaire de l'enveloppe nucléaire, aussi effectué par la caspase-3, à l'aide de la protéine kinase C δ (PKC- δ). Effectivement, grâce aux fonctions non-classiques de la protéine Bax sur la perméabilisation du noyau, la PKC- δ vient phosphoryler la lamine B (Lindenboim, 2020). Cette phosphorylation, conjointement à l'activité de la Caspase-3, permet le démantèlement de l'enveloppe nucléaire et la formation subséquente de fragments nucléaires aux stades plus avancés du processus apoptotique. La Caspase-3 est aussi connue pour moduler l'activité de la gelsoline (Porter & Jänicke, 1999 ; Martin, 2010), déstabilisant le cytosquelette et induisant la formation des bourgeons mentionnés en début de chapitre. Finalement, des fragments de protéines nucléaires, aussi clivées par la Caspase-3, sont relocalisés au cytosol et activent les scramblases à la membrane plasmique, exposant la phosphatidylsérine au feuillet externe de la membrane (Marouka, 2021)

1.1.4 Mort cellulaire programmée dans le système vasculaire

Le système vasculaire assure la circulation et la distribution de multiples éléments dans tout l'organisme. Il est principalement divisé en deux systèmes distincts, le système cardiovasculaire, responsable de l'acheminement des nutriments et déchets métaboliques, et le système lymphatique, servant à la surveillance du liquide interstitiel (John Hopkins Medicine, 2022). La circulation des nutriments et des déchets est essentielle à l'homéostasie non seulement de l'organisme, mais aussi des cellules composant ces mêmes vaisseaux. De plus, le système cardiovasculaire participe à d'autres fonctions, comme la régulation de la pression sanguine et de la température corporelle ainsi que la production de l'urine.

1.1.4.1 Composition vasculaire

Afin d'accomplir leurs nombreuses tâches, les vaisseaux sanguins artériels possèdent une structure particulière. De façon générale, ils sont composés de trois couches de tissus, l'adventice, la média et l'intima. L'adventice est principalement composée de cellules fibroblastiques qui

sécrètent et maintiennent les tissus conjonctifs et élastiques des vaisseaux. Le tissu conjonctif permet aux vaisseaux de « s'attacher » aux structures environnantes et de rester en place. Quant à eux, les tissus élastiques sont capables d'accommoder le changement de diamètre du vaisseau auquel elles sont associées.

De son côté, la média est majoritairement composée de cellules musculaires lisses accompagnées de fibres élastiques. Les cellules musculaires sont capables de moduler le diamètre du vaisseau sanguin. Ce faisant, elles régulent la pression artérielle de façon locale, et ce en temps réel. Effectivement, ces cellules sont munies de mécanorécepteurs capables de distinguer de faibles variations de pression, ce qui déclenche l'arc réflexe des barorécepteurs et ajuste la pression sanguine en relaxant ou contractant les cellules musculaires lisses autour des vaisseaux. Quant à elle, l'intima est composée d'une membrane élastique, du tissu conjonctif et d'une couche de cellule endothéliales.

Quoique ces trois composantes accomplissent chacun leur rôle d'importance, l'endothélium est l'interface entre les éléments sanguins et les tissus sous-jacents à l'intima. De ce fait, les cellules endothéliales vasculaires sont en contact directe avec le sang. Elles sont responsables du transport des nutriments et de l'oxygène aux tissus adjacents ainsi que le chargement des déchets métaboliques dans le sang. Il est important de noter que la hiérarchie de vaisseaux sanguins affecte leur forme. Par exemple, les plus petits vaisseaux, appelés capillaires, sont constitués seulement d'une monocouche de cellules endothéliales, d'une membrane basale, et de cellules périphériques essentielles à l'homéostasie endothéliale, appelées péricytes (Hati & Agrawal & Raj, 2021).

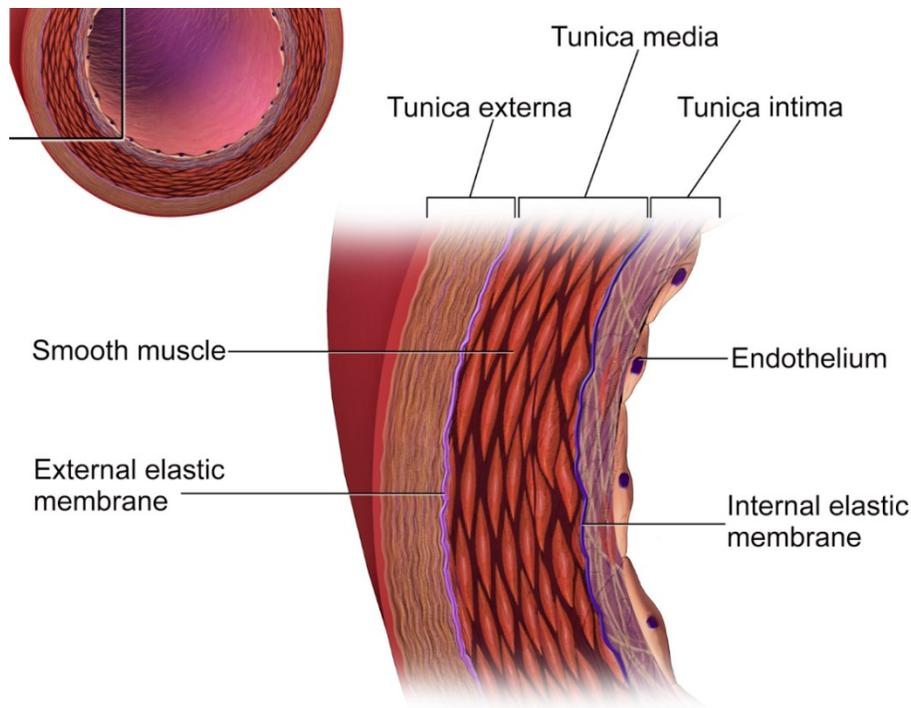


Figure 5. – **Anatomie générale d'un vaisseau sanguin.** Le vaisseau comprend trois couches distinctes, l'adventice (Tunica externa), la média (Tunica media) et l'intima (Tunica intima). L'adventice est composée de fibroblastes, qui assurent et maintiennent la forme du vaisseau. La média comprend majoritairement des cellules musculaires lisses qui sont responsables de l'ajustement du diamètre du vaisseau en réponse aux changements de pression. L'intima consiste essentiellement de la membrane basale de l'endothélium et des cellules endothéliales. Image obtenue de Blausen Medical, CC BY-4.0

1.1.4.2 Homéostasie vasculaire

L'homéostasie vasculaire est assurée par un ensemble de processus importants, non seulement pour la survie des vaisseaux sanguins, mais aussi pour la formation de nouveaux vaisseaux via l'angiogenèse. Plusieurs mécanismes moléculaires sont en place afin de maintenir cet état, et potentiellement y revenir s'il est perturbé.

Brièvement, une communication paracrine via des facteurs de croissance (ex. : VEGF, Angiopoïétine) crée un état stable de quiescence («phalanx state»). Une perturbation de cet état, par exemple la carence en sérum ou la présence d'espèces réactive de l'oxygène, déstabilise la membrane basale des cellules et contribue à la modulation de l'endothélium (Carmeliet & Jain, 2011). Il est à noter que ce phénomène est essentiel à l'angiogenèse. Cependant, si cet état est soutenu, il peut causer la mort des cellules endothéliales (Pober, 2008).

1.1.4.3 Apoptose endothéliale

Même si les cellules endothéliales peuvent mourir de diverses façons (Strilic, 2016), l'apoptose endothéliale semble prédominer comme méthode de MCP lors d'injures vasculaires. En effet, les cellules endothéliales entrent en apoptose à la suite du développement de pathologies, comme les accidents vasculaires cérébraux (Zille, 2019), la thrombose (Badimon, 2014), l'athérosclérose (Paone, 2019). Certaines procédures médicales comme la transplantation d'organe solide peuvent aussi induire l'apoptose endothéliale, telle l'ischémie-reperfusion (Yang, 2018)

De plus, l'apoptose endothéliale semble inhiber l'angiogenèse (Chavakis & Dimmeler, 2002), un facteur important pour la récupération à la suite d'une pathologie ou une intervention causant un dommage ischémique, tel un accident cardiovasculaire ou une transplantation d'organe solide, respectivement. Cela étant dit, il est important de considérer les mécanismes derrière le déclenchement de l'apoptose dans l'endothélium.

1.1.4.3.1 Cause de l'activation de l'apoptose endothéliale

En effet, la mort des cellules endothéliales peut survenir à la suite de plusieurs perturbations, comme pendant l'ischémie et à la suite de la reperfusion. Notamment, l'apoptose endothéliale peut être causée par la baisse du stress de flux sanguin (shear stress) (Hu, 2017). Effectivement, l'état de flux sanguin, et donc le stress induit à la surface de l'endothélium, affecte la morphologie de la mitochondrie et peut relâcher le cytochrome *c* et ainsi enclencher le processus d'apoptose par la voie intrinsèque.

Une autre cause de l'apoptose endothéliale est le stress oxydatif. Quoique ce dernier se produise naturellement, par exemple lors de la signalisation Redox (Laurindo, 2018), sa dérégulation entraîne de graves conséquences. Effectivement, une des caractéristiques du stress oxydatif est la production d'espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species, ou ROS) qui, après la reperfusion, peuvent rapidement oxyder plusieurs substrats et métabolites cellulaires. En temps normal, les ROS sont produits de façon contrôlée, par exemple via des intermédiaires tel les NADPH oxydases (Nox/Duox) (Sorikmany & Donko & Geiszt, 2016), mais l'ischémie-reperfusion engendre une grande quantité de ROS qui diffusent rapidement dans toute la cellule.

Cette diffusion incontrôlée entraîne l'oxydation et segmentation de l'ADN (Shield & Traa & Raamsdonk, 2021), de lipides et de différentes protéines dont la fonction est alors affectée (Ghosh *et al*, 2018). Le dérèglement du métabolisme cellulaire enclenche alors l'apoptose, notamment par l'attachement de p53 à l'ADN segmenté et la production de protéines contenant le domaine BH3, et donc ayant un potentiel pro-apoptotique (Williams & Schumacher, 2016).

Au niveau de l'organisme, le stress oxydatif engendre aussi la sécrétion de composés ayant des effets néfastes sur l'endothélium. Par exemple, la cyclophilin A est sécrétée par les cellules endothéliales dans ce contexte et induit l'inflammation et l'apoptose de l'endothélium microvasculaire pulmonaire via l'activation de la caspase-3 (Xue, 2017).

1.1.5 Formation de vésicules chez les cellules apoptotiques

Comme mentionné en début de chapitre, les cellules apoptotiques démontrent une multitude de changements morphologiques, incluant la fragmentation de l'ADN, la redistribution des lipides à la membrane plasmique et la formation de corps apoptotiques. Ces derniers sont toutefois formés de façon plutôt régulée.

1.1.5.1 Corps apoptotiques

En effet, la formation des corps apoptotiques est issue de l'activation de diverses kinases à la suite de leur clivage par les caspases (Paone, 2019). Entre autres, la kinase ROCK1 est impliquée dans le couplage des filaments d'actine-myosine à la membrane plasmique ainsi que dans la localisation des fragments d'ADN dans ces bourgeons (Coleman, 2001). Ces bourgeons peuvent prendre plusieurs formes, incluant un pic de microtubules ou un apoptopode en collier de perles (Atkin-Smith, 2015). Enfin, la fragmentation de ces structures relâche des vésicules de taille - généralement de l'ordre des microns - et contenus variables dans la matrice extracellulaire.

Ce faisant, ces corps apoptotiques sont libres d'interagir avec leur environnement. Classiquement, ils sont connus pour être captés majoritairement par les phagocytes résidents à des fins de dégradation, recyclant ainsi chromatine, protéines et lipides. Toutefois, des instances de transfert de contenu des corps apoptotiques ont été répertoriées (Zernecke, 2009 ; Battistelli & Falcieri, 2020), confirmant leur capacité à influencer le phénotype des cellules réceptrices. Ceci remet en question le dogme de l'apoptose comme étant un processus silencieux.

1.1.5.2 Vésicules apoptotiques apparentées aux exosomes

Parallèlement, un nouveau type de vésicules apoptotiques, cette fois de plus petite taille, a été découvert et caractérisé par l'équipe de Dre Hébert. Ces vésicules ressemblent aux exosomes (décrits ci-dessous), par leur taille, biogenèse, leur sécrétion et certains de leurs biomarqueurs (Sirois 2012; Dieudé, 2015 ; Beillevaire, 2022). Ces vésicules apoptotiques apparentées aux exosomes (ApoExo) sont toutefois largement différentes des exosomes classiques et des corps apoptotiques. Leur taille varie de 30 à 100 nm; elles sont donc plus petites que les corps apoptotiques. De plus, elles sont formées à l'intérieur de vacuoles intracellulaires, appelées corps multivésiculaires, à la suite de l'activation de la caspase-3. Cependant, les ApoExo contiennent un protéasome 20S actif, la protéine lysosomale Lamp-2, ainsi que le fragment LG3 du perlecan, qui sont non caractéristiques des exosomes classiques. De plus, les ApoExo ne contiennent pas certains marqueurs classiques des exosome et corps apoptotiques, tel que CD63 et l'histone H3, respectivement (Dieudé, 2015, Beillevaire 2020). Ces caractéristiques permettent de bien les distinguer de leurs contreparties dans la famille des vésicules extracellulaires.

En plus de leurs caractéristiques distinctes, les ApoExo ont la capacité d'influencer leur environnement. Contrairement aux corps apoptotiques, les ApoExo induisent de fortes réponses inflammatoires et auto-immunes (Dieudé, 2015; Dieudé 2020 ; Dieudé 2021). L'équipe de Dre Hébert a aussi démontré une partie de leurs effets sur les cellules endothéliales. Les ApoExo induisent la dysfonction et la dédifférenciation des cellules endothéliale en condition de stress (Migneault, 2020).

Son équipe a aussi démontré que le contenu en ARN des ApoExo est largement différent non seulement des corps apoptotiques, mais aussi des cellules apoptotiques à l'origine des ApoExo (Hardy, 2019). En fait, une proportion de ces ARNs sont décrits comme immunostimulatoires et ressemblant à des ARNs viraux. Cependant, les mécanismes de partage du contenu des ApoExo est encore à caractériser.

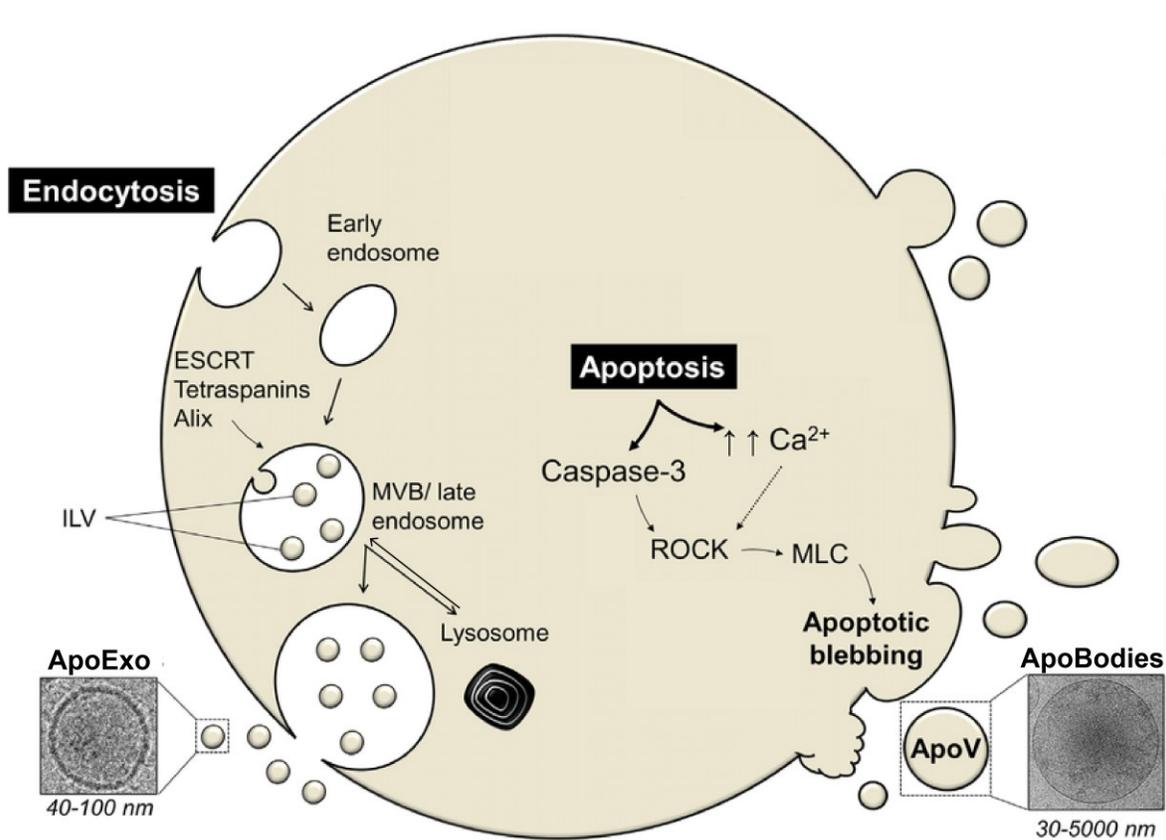


Figure 6. – **Formation de différents types de vésicules extracellulaires à partir de cellules**

apoptotiques. Les corps apoptotiques et les ApoExo sont produits à la suite de l'activation de la caspase-3. A)

Lors de l'apoptose, la kinase ROCK1 est activée à la fois par la caspase-3 et l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire. Elle participe ainsi à la formation des corps apoptotiques par le couplage de l'actine et la myosine à proximité de la membrane plasmique. B) Parallèlement, les ApoExo sont générés à partir d'endosomes sous forme de vésicules intraluminales (ILV) grâce aux protéines ESCRT, Alix ou de tétraspanines lors du processus apoptotique. Des lysosomes peuvent alors fusionner avec des MVB contenant les vésicules intraluminales. Par la suite, les MVB-lysosomes peuvent fusionner avec la membrane plasmique afin de relâcher leur contenu dans le milieu extracellulaire. Image adaptée de Muhsin-Sharafaldine & McLellar. CC BY-4.0

2. Les vésicules extracellulaires

1.2.1 Généralités

Les vésicules extracellulaires (Extracellular Vesicles ou EV) sont des fragments de cellules entourées d'une bicouche lipidique formés à partir de différents types cellulaires. Elles possèdent une double membrane lipidique qui contient et protège un cargo riche en protéines et en acides nucléiques. À travers cette double membrane se retrouvent différentes composantes servant à la fois de signature et de molécules de reconnaissance vésiculaire. Deux grandes catégories de vésicules extracellulaires ont été décrites à ce jour : les microvésicules et les exosomes. Cependant, il est à noter que ces catégories sont des termes génériques, et donc englobe différentes sous-populations de vésicules appartenant à cette catégorie.

1.2.2 Les microvésicules

Les microvésicules sont formées directement à partir de la membrane plasmique des cellules productrices (Théry, 2017; Teng & Fussenegger, 2021). Leur taille variant d'un à plusieurs microns, elles peuvent être produites à l'aide des différents complexes de triage endosomal requis pour le transport (Endosomal Sorting Complex Required for Transport ou ESCRT), qui comprennent les protéines TSG101 et Vsp4, ou de l'ARRestine Domain-Containing protein I (ARRDC1). Ces dernières seront connues comme des microvésicules médiées par ARRDC1 (Nahban, 2012). Autrement, les microvésicules seront formées par des petites GTPases, telles que le facteur 1 de ribosylation de l'ADP (ADP Ribosylation Factor ou Arf1) (Schlienger, 2014) et RhoA (Li, 2012), ou par la sphingomyélinase acide via la formation de céramide (Awojoodou, 2014).

On remarquera que les machineries de formation de vésicules sont similaires entre les deux types de vésicules. Cependant, il s'agit bien de types de vésicules distincts l'un de l'autre. En effet, les endosomes à partir desquels sont formés les exosomes (décrits ci-dessous) proviennent eux aussi de la membrane plasmique. Or, les complexes ESCRT sont ancrés dans la membrane, et donc transférés aux endosomes lors de l'endocytose.

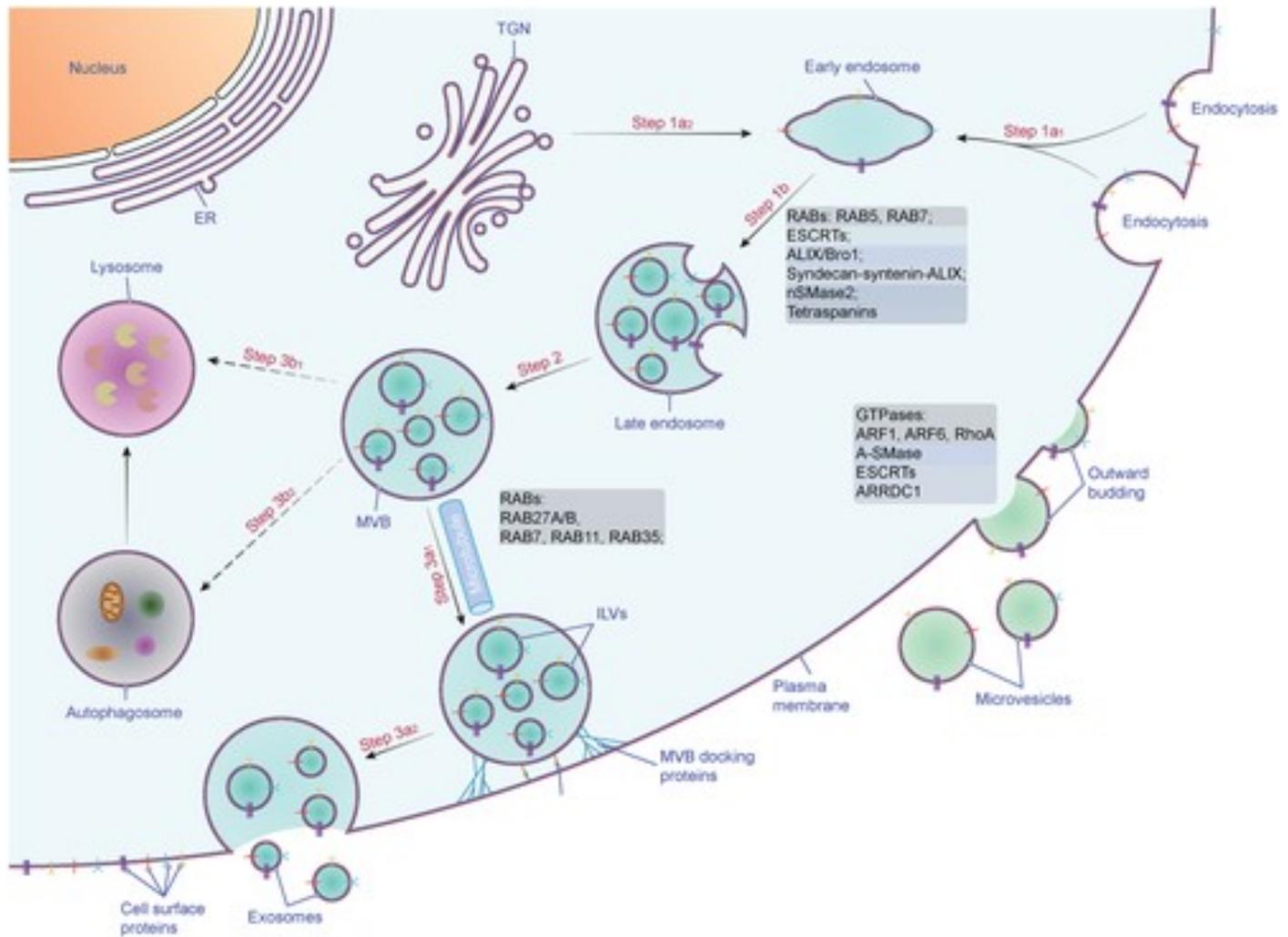


Figure 7. – **Survol des modes de formation des microvésicules et exosomes.** Les microvésicules sont formées directement à partir de la membrane plasmique de la cellule. Ceci est possible grâce à plusieurs effecteurs, dont plusieurs GTPases (RhoA, ARF) et modificateurs de signature lipidique (A-SMase). Les exosomes sont formés à partir d'endosomes dont le bourgeonnement interne par les protéines RABs, ESCRTs, Alix ou tétraspanines produit des vésicules intraluminales (ILV). Ces corps multivésiculaires sont dynamiques, et incorporent des composantes du système endomembranaire, comme le réseau transgolgien, grâce aux modifications de signatures lipidiques par la sphingomyélinase neutre (nSMase). Ceci entraîne aussi un remplacement des petites GTPase RABs (RAB11, RAB35) à la surface du MVB, ce qui le destine à l'export vers la membrane plasmique via les microtubules. Ainsi, des protéines échanfauds ancrent le MVB à la membrane afin de faciliter leur fusion. Ce processus relâche les exosomes contenus dans les MVB dans le milieu extracellulaire. Image adaptée à partir de Teng & Fussenegger. CC BY-4.0

1.2.3 Les exosomes

Comme mentionné ci-haut, les exosomes sont produits à partir des endosomes à l'intérieur de la cellule même. Ces endosomes sont produits par l'endocytose d'éléments extracellulaires, puis mûrissent par l'échange de protéines transmembranaires et la modification des signatures lipidiques (voir Figure 7). Ensuite, le contenu intraluminal est supplémenté et modifié par la fusion de différentes vésicules intracellulaires provenant du réseau transgolgien, d'autres endosomes ou des lysosomes (Kalluri & LeBleu, 2020; Teng & Fussenegger, 2021). La maturation de l'endosome, ainsi que l'accumulation de contenu, forcent la membrane endosomale à s'invaginer, formant des vésicules intraluminales (IntraLuminal Vesicle ou ILV) (van Niel, 2018). À ce stade les endosomes ayant des ILVs sont redéfinis comme des corps multivésiculaires (MultiVesicular Body ou MVB).

Quoique ce processus puisse se produire spontanément (Stuffers, 2009), il existe différentes façons de le déclencher par l'entremise de différents complexes protéiques ESCRT (Figure 8A). De plus, ces complexes sont reconnus pour réguler l'activité de certains récepteurs (Dores, 2012) ainsi que la réparation de la membrane plasmique après lésion par des toxines (Jimenez, 2014). Un autre mode de formation des vésicules, cette fois indépendant des complexes ESCRT, implique les protéines *ALG-2 protein X* (ALIX), syndecan et syntenin (Ghossoub, 2014) (Figure 8B). Cette méthode de formation des ILVs survient après l'activation de la guanosine triphosphatase (GTPase) ADP ribosylase facteur 6 (ARF6) et de son effecteur, la phospholipase D2. Ensuite, selon le contexte cellulaire, les MVBs peuvent fusionner avec différentes composantes cellulaires, menant à la sécrétion ou digestion de leur contenu. D'autres méthodes de formation des ILVs sont possibles et sont apparentées à la formation des microvésicules (Figure 8C&D).

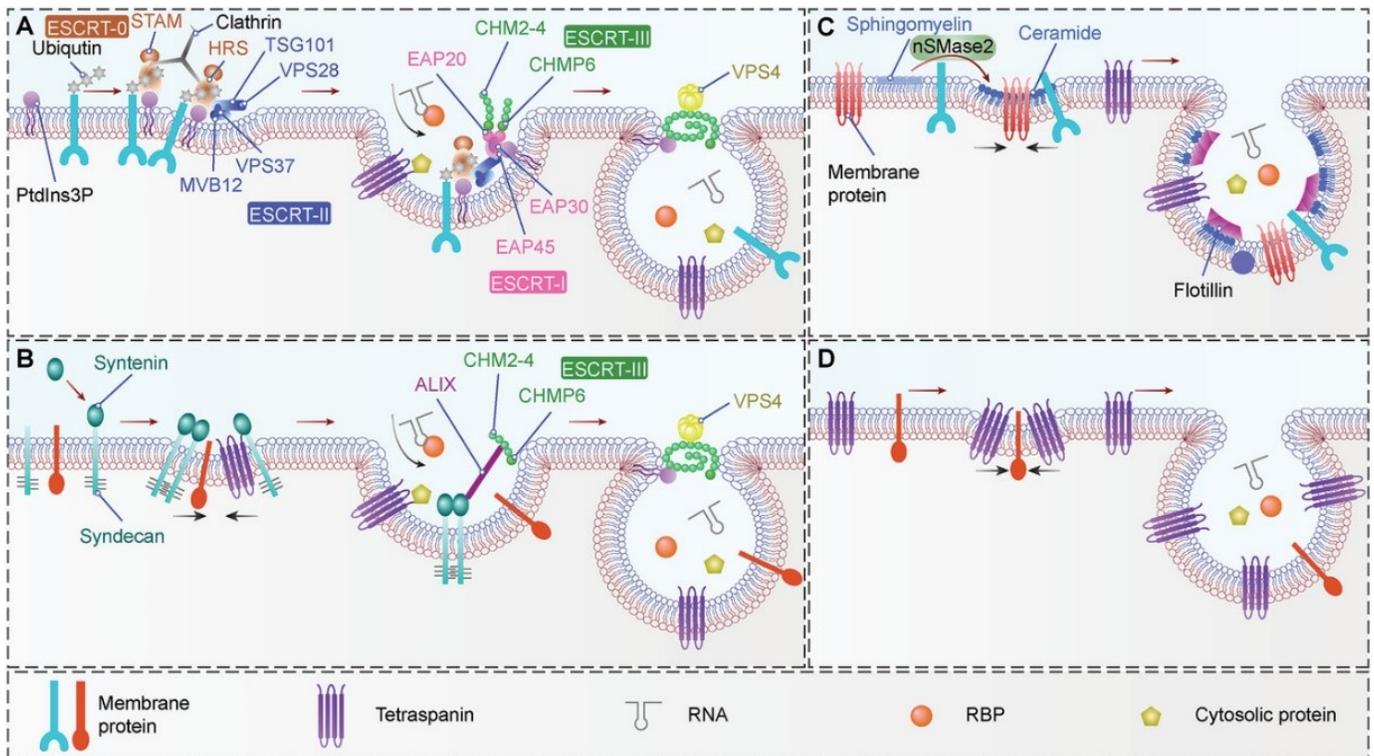


Figure 8. — **Machinerie de formation des exosomes et transport de cargo.** A) La présence de PI3P recrute des protéines transmembranaires ubiquitinylées, qui ensemble servent d'échafaud aux composantes du complexe ESCRT-0. Ensuite, le complexe ESCRT-II se joint au complexe, forçant la courbure de la membrane vésiculaire. Cette courbure accomode l'insertion de tétraspanines, qui peuvent du même coup amener des protéines cytosoliques à charger dans la vésicule en formation. Parallèlement, les complexes ESCRT-I et -III s'aggraffe aux ESCRTs déjà présents. Après maturation du bourgeon vésiculaire, le complexe ESCRT-III forme un col qui scinde le bourgeon de la membrane endosomale. Le complexe ESCRT-III est ensuite retiré de la membrane par la protéine VPS4. B) Le syndécan se lie à la synténine intracellulaire, ce qui courbe la membrane endosomale. De façon similaire au panneau précédent, les tétraspanines sont recrutées à la membrane courbée, amenant avec elles une partie du cargo intraluminal. La protéine ALIX se lie alors au complexe synténine-syndécan, et recrute le complexe ESCRT-III. Après avoir détaché le bourgeon endosomal de la membrane, le complexe ESCRT-III est récupéré dans la cytosol par la protéine VPS4. C) La sphingomyélinase neutre (nSMases2) produit de la céramide, ce qui module la signature lipidique locale. Ce changement recrute des protéines transmembranaires qui courbent la membrane endosomale et permet l'insertion de tétraspanines. En absence des complexes ESCRT, la flotilline vient stabiliser le bourgeon, ce qui permet l'incorporation du cargo intraluminal. D) Une courbature spontanée de la membrane accomode les tétraspanines, qui résulte en la formation d'un bourgeon stable. Le cargo intraluminal est alors incorporé avant la fermeture de la vésicule. Image tirée de Teng & Fussenegger. CC BY-4.0

1.2.3.1 Dégradation ou recyclage

Les endosomes peuvent fusionner avec des lysosomes, soit directement ou par l'entremise d'autosomes et d'autolysosomes, et voir leur contenu dégradé. Les mécanismes impliqués dans la décision du trafic endosomal ne sont pas encore bien définis. Il est cependant connu que les marqueurs communément destinés à l'export, en plus de leur machinerie de chargement, sont négativement associés à la voie de dégradation (Palmulli & van Niel, 2019). Par exemple, la protéine syndecan semble réguler la distribution de marqueurs d'exosomes relargués par les cellules (Baietti, 2012). Même si la dégradation lysosomale demeure la voie principale de « nettoyage » cellulaire, l'export de vésicules peut aussi remplir ce rôle. Effectivement, les premières études sur les exosomes démontrent leur implication dans l'élimination de composés, comme le cholestérol (Pan, 1985; Strauss, 2010) et les protéines toxiques dans un contexte de maladies neurodégénératives (Eitan, 2016). Ceci concorde avec l'idée de régulation entre la dégradation et le relargage du contenu. De plus, la modification post-traductionnelle de la protéine TSG101, appartenant au complexe ESCRT, par ISGylation (attachement d'une protéine « ubiquitine-like ») semble destiner le MVB à la dégradation plutôt qu'à son export (Villaroya-Beltri, 2016 & 2017). Ce faisant, il n'est pas surprenant de voir que le recrutement du reste du complexe ESCRT semble mener vers la dégradation plutôt que la sécrétion du MVB (van Niel, 2019). Aussi, l'ubiquitination des protéines de transport des MVBs peut faire pencher la balance vers la dégradation. En effet, la petite GTPase RAB7 est impliquée dans la sécrétion d'exosomes contenant le complexe synténin-ALIX. Cependant, lorsqu'ubiquitinée, elle favorise le transport rétrograde vers le centre organisationnel des microtubules (MicroTubule Organizing Center ou MTOC), où se concentre les lysosomes (Song, 2009).

Autrement, si le MVB fusionne avec la membrane plasmique, les ILVs seront relargués dans le milieu extracellulaire, où elles pourront interagir avec d'autres cellules (Palmulli, 2018). Parallèlement, les modes de formation des ILVs indépendants des complexes ESCRTs, particulièrement via la voie ALIX, sont associés à l'export des ILVs dans le milieu extracellulaire (van Niel, 2019). De plus, des protéines reliées à l'autophagie ont récemment été associées avec la production d'exosomes (Murrow, 2015), particulièrement le complexe ATG12-ATG3. Aussi, la tétraspanine CD63 semble jouer le rôle de coordonnateur entre les processus autophagique et la

sécrétion d'exosomes dans un modèle d'infection virale (Hurwitz, 2017). Enfin, il n'est pas improbable que tous ces mécanismes décisionnels puissent interagir avec le même MVB. Mis à part les marqueurs de sécrétion ou digestion mentionnés ci-haut, il semble aussi que leur présence à certain moments critiques de la maturation du MVB joue un rôle sur la destinée des ILVs (Palmulli & van Niel, 2019).

1.2.4 Chargement du cargo

Pendant leur formation, les vésicules extracellulaires se voient chargées de biomolécules, tant à la surface de leur membrane que dans l'espace intraluminal (Figure 8).

1.2.4.1 Cargo associé à la membrane vésiculaire

D'abord, les protéines et lipides modifiés se retrouvant au site de formation de la vésicule font intrinsèquement partie de celle-ci. De plus, les complexes ESCRT peuvent aussi jouer un rôle dans le chargement de protéines transmembranaires dans les vésicules extracellulaires, particulièrement lorsqu'elles sont ubiquitinées (Raiborg, 2009). Aussi, ce même cargo peut être amené à destination par d'autres protéines transmembranaires ubiquitaires, les tétraspanines. Avec l'aide de la protéine ALIX, la tétraspanine CD63 permet de charger le complexe synténin-syndecan dans les exosomes (Latysheva, 2006), ainsi que la protéine HSP70 (Baietti, 2012). Cependant, les tétraspanines CD9 et CD81 ne sont pas associées à l'export du même cargo (Roucourt, 2015). La protéine ALIX, vraisemblablement centrale à bien des mécanismes, semble aussi être impliquée dans le chargement de manière indépendante au complexe ESCRT. Effectivement, cette protéine peut lier plusieurs cibles de chargement à l'aide de son domaine d'acides aminés YPX₃L (Dores, 2012). Ce domaine lui permet donc de charger des cargos non-ubiquitinés. Un autre mécanisme de chargement indépendant du complexe ESCRT est assuré par l'activité enzymatique de la sphingomyélinase neutre dans le système nerveux. En effet, la formation de céramide à la membrane lipidique du corps multivésiculaire induit la formation de microdomaines ressemblant à des radeaux lipidiques (RL) (Trajkovic, 2008). Un métabolite de la céramide, la sphingosine 1-phosphatase, assure ensuite le chargement des tétraspanines CD63 et CD81.

1.2.4.2 Cargo intraluminal

Ensuite, des protéines cytosoliques peuvent se voir chargées dans les EVs de façon concomitante avec certaines protéines membranaires. Par exemple, la protéine HSP73 est chargée en même temps que le récepteur de la transferrine après son internalisation (Géminard, 2004). À son tour, HSP73 séquestre des protéines cytosoliques possédant le motif d'acide aminé KFERQ (Sahu, 2011) comme la ribonucléase A, reconnue pour son rôle dans l'autophagie reliée aux chaperonnes (Cuervo, 2010). Parallèlement, les modifications post-traductionnelles des protéines ciblées peuvent jouer un rôle dans leur chargement. Par exemple, la ribonucléoprotéine (RNP) nucléaire hétérogène A2B1 (heterogeneous nuclear A2B1 ou hnRNPA2B1) peut être chargée dans les ILVs grâce à l'attachement d'une petite protéine modificatrice ressemblant à l'ubiquitine (Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO)ylation) (Villaroya-Beltri, 2013). Cette RNP est reconnue pour son implication dans le chargement de microARNs spécifiques dans les exosomes. De plus, la phosphorylation (Annexin A2) (Valapala, 2011), l'oxydation (γ -synuclein) (Surgucheva, 2012) et l'ISGylation (TSG101) (Villaroya-Beltri, 2016) jouent sur la capacité de chargement des protéines modifiées. Aussi, le clivage protéolytique joue un rôle important dans le chargement de cargo dans les exosomes. Ainsi, l'héparanase non seulement catalyse l'héparan sulfate à l'intérieur même de la cellule (Roucourt, 2015), mais stimule aussi la voie de formation vésiculaire syndecan-syntenin-ALIX décrite plus haut, favorisant la formation de nouvelles ILVs (Palmulli & van Niel, 2018).

Finalement, en plus des protéines cytosoliques, du matériel génétique – ADN et ARN – a été détecté dans les EVs, incluant des ARNs non-codants et mitochondriaux (Nilsson, 2016 ; Li, 2015). Peu importe la nature des acides nucléiques, ils sont chargés dans ces vésicules à l'aide de protéines de transport (Hobor, 2016). Comme mentionné ci-haut, la protéine hnRNPA2B1 est chargée après modification par SUMOylation. Cette même modification permet la liaison de hnRNPA2B1 aux ARNs, incluant les microARNs (Villaroya-Beltri, 2013). De plus, cette ribonucléoprotéine reconnaît la séquence GGAG/CCCU en 3' des microARNs, maintenant considérée comme une signature de chargement. Parallèlement, des protéines appartenant au complexe de répression génique induit par l'ARN (RNA-Induced Silencing Complex ou RISC)

seraient aussi présentes dans les EVs (Melo, 2016), leur conférant un rôle régulateur auprès des cellules réceptrices.

1.2.5 Communication intercellulaire

Les vésicules extracellulaires, une fois relarguées, peuvent influencer les cellules avoisinantes et distantes de différentes façons. Pour ce faire, elles peuvent se lier à la cellule via des interactions avec des récepteurs ou être internalisée par diverses voies d'endocytose.

1.2.5.1 Liaison avec ligand

D'abord, les EVs peuvent se lier à un récepteur et activer une voie de signalisation dans la cellule réceptrice. Plusieurs molécules transmembranaires peuvent remplir ce rôle. Les molécules d'adhésion, comme les molécules d'adhésion intercellulaires (InterCellular Adhesion Molecule ou ICAM) et les intégrines, peuvent servir de point d'adhésion aux molécules présentes sur les vésicules (French, 2017). Aussi, des molécules, comme la fibronectine et la laminine, peuvent servir de protéine échafaud dans la formation de ce complexe cellule-vésicule (Desrochers, 2016). De plus, certains récepteurs peuvent interagir directement avec l'enveloppe lipidique de la vésicule, comme les protéines de la famille TIM, reconnues pour se lier à la phosphatidylsérine (Wei, 2016). Enfin, l'identité des protéines à la surface des vésicules détermine les types cellulaires susceptibles d'interagir avec ces vésicules. Autrement dit, les vésicules exprimant des molécules d'adhésion – comme les ICAM et les intégrines – auront une meilleure affinité avec certaines cellules immunitaires, notamment celles reconnues pour être activées par le ligand ICAM-1 (Hoen, 2009 ; Sabatier 1999; Bui, 2020).

Ensuite, ces liaisons avec les récepteurs peuvent démarrer une cascade de signalisation. Comme mentionné ci-haut, les vésicules contenant de la phosphatidylsérine peuvent se lier aux cellules réceptrices via un récepteur de la famille TAM (Linger, 2008). Ces récepteurs possèdent une fonction tyrosine kinase permettant de phosphoryler des protéines intracellulaires, déclenchant ainsi des cascades de signalisations. Finalement, la liaison peut mener à l'internalisation des vésicules.

1.2.5.2 Internalisation

Les EVs peuvent influencer les cellules réceptrices par internalisation. Les vésicules peuvent relâcher leur contenu une fois internalisées, ce qui influencera les cellules de l'intérieur. Ce phénomène peut être constitutif (i.e. : pinocytose) ou déclenché (i.e. : endocytose) (French, 2017 ; Feng, 2010). Par exemple, la pinocytose est présente sur les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules endothéliales. Ces types cellulaires sont donc susceptibles d'internaliser des vésicules de façon spontanée par leur activité constitutive de recensement du milieu extracellulaire avoisinant. En revanche, les processus déclenchés sont souvent associés à l'activation d'un récepteur – comme TIM3, auparavant mentionné. Le récepteur recrute alors de la machinerie protéique sous la membrane plasmique afin de créer un endosome (Février & Raposo, 2004 ; Tian, 2010). Ce faisant, le ligand sera internalisé par la cellule, enveloppé par une vésicule à double-membrane, pour se déplacer à travers le réseau endomembranaire à l'aide de transporteurs protéiques jusqu'à destination.

1.3. L'endocytose

1.3.1 Généralités

L'endocytose est un processus cellulaire présent sur virtuellement tous les types cellulaires. Il s'agit d'une façon pour les cellules d'interagir avec leur milieu et d'incorporer des éléments du milieu extracellulaire de manière sélective (Doherty & McMahon, 2009). Même si ce phénomène peut se produire avec ou sans l'aide de récepteur extracellulaire, il requiert toujours une réorganisation des protéines sous-jacentes à la membrane plasmique. Ce processus peut aussi favoriser la polymérisation des molécules d'actine localement (Mooren, 2012), poussant sur la membrane cellulaire et formant des protrusions à la surface de la cellule.

La résolution du processus d'endocytose – l'endosome – suit alors des stades de maturation pendant lesquels il y aura échange des protéines associées (Rab5 et ses effecteurs), modification de signature lipidique (phosphatidylinositol mono- (PIP), bi- (PIP₂), triphosphate (PIP₃)) fragmentation de l'endosome et fusion avec d'autres vésicules intracellulaires (Gorvel; 1991 ;

Corvera, 1999 ; Naslavsky, 2018). Comme mentionné plus-haut (voir section 2.3.1 : Dégradation #ou recyclage), ces endosomes matures seront dégradés ou recyclés à la membrane.

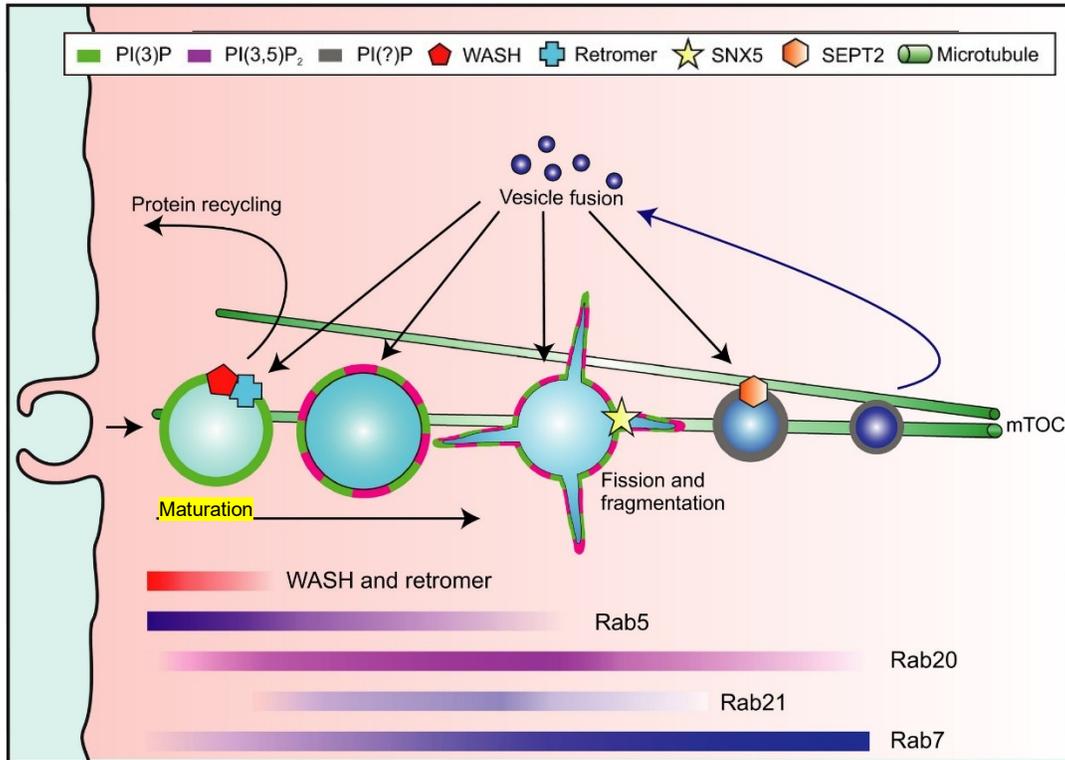


Figure 9. – **Étapes générales de maturation d'un macropinosome.** La maturation du macropinosome est un processus dynamique au cours duquel la signature protéique et lipidique est modifiée. La présence du rétromère et de la protéine WASH favorise le changement initial de la signature lipidique de l'endosome. Ces protéines sont remplacées par des petites protéines G de la famille Rab, puis recyclées à la membrane plasmique. Ce changement de protéines modifie à son tour la signature lipidique, formant des îlots distincts à la surface du macropinosome. Ces îlots caractéristiques permettent l'incorporation de protéines (SNX5) servant à la fragmentation du macropinosome. Les fragments seront redistribués dans le système endomembranaire. Tout au long du processus de maturation, d'autres vésicules et endosomes pourront fusionner avec le macropinosome. Seule une petite partie de l'endosome original se dirige vers le centre organisationnel des microtubules (mTOC) grâce aux septines (SEPT2). Image adaptée de Buckler & King. Licence obtenue via CCC-RightsLink.

Pour ce faire, les endosomes peuvent emprunter différentes voies de transport, soit les voies rétrogrades ou antérogrades (Varlamov, 1998). Plus particulièrement, il semble que les endosomes exprimant des récepteurs hydrolase acide ou des protéines SNAREs soient

transportées de façon rétrograde à l'appareil de Golgi. Certaines sous-unités de ces protéines font aussi partie d'un complexe nommé rétromère, nommé ainsi pour son rôle dans le transport rétrograde. (Seaman, 2005). En tous les cas, pendant son processus de maturation, les endosomes possédant un manteau protéique peuvent produire un réseau tubulaire avec bourgeons (Bonifacino & Rojas, 2006). Ainsi, les bourgeons ayant un simple manteau de clathrine ou la petite GTPase Rab11 seront recyclés à la membrane plasmique. Parallèlement, la protéine adaptatrice 3 (Adaptor Protein 3 ou AP3) mènerait les vésicules bourgeonnantes vers la voie de dégradation.

1.3.2 Les modes d'endocytose classiques

1.3.2.1 L'endocytose médiée par la clathrine

L'endocytose médiée par la clathrine (Clathrin-Mediated Endocytosis ou CME) est un important procédé non seulement dans la prise de cargo lié à un récepteur, mais aussi dans la régulation de la signalisation par récepteur couplé à une protéine G (G-Protein Coupled Receptor ou GPCR) (Thomsen, 2016). Il est aussi présent sur la majorité des cellules eucaryotes, incluant les cellules endothéliales vasculaires (Zhang, 2014). Le processus se divise en plusieurs étapes distinctes, culminant en la formation d'une vésicule enrobée d'un manteau de protéines servant à recruter la machinerie nécessaire à la maturation, l'extension et la fission de l'endosome (Kaksonen & Roux, 2018).

D'abord, l'initiation du processus est assurée par la liaison d'un ligand à son récepteur (Stillwell, 2016). Cette liaison permet alors à la protéine adaptatrice 2 (Adaptor Protein 2 ou AP2) d'être recrutée au feuillet interne de la membrane plasmique. Chacun leur tour, une série de protéines échafauds sont recrutées, forçant la membrane à se courber vers l'intérieur. Ceci est possible grâce à la forme particulière des hétéromères de clathrine, nommés triskelions (Kirchhausen, 1981). L'hétérogénéité de l'assemblage des triskelions – en hexagone ou en pentagone (Pearse, 1975) – applique une tension, forçant la membrane à s'incurver vers l'intérieur de la cellule. Du même coup, cette courbure accommode la forme naturelle des échafauds des triskelions qui sont alors juxtaposés au manteau de clathrine existant (Lee, 2010). Parallèlement, le recrutement de complexes échafauds additionnels favorise l'enrichissement de récepteurs

transmembranaires, formant un focus de molécules extracellulaires destinées à être internalisées. Ces interactions sont vues comme un point de contrôle de chargement ; un certain seuil du nombre de molécules à internaliser doit être atteint (Mettlen, 2010). Sinon, le manteau de clathrine se dissipe et le processus est arrêté.

Ensuite, une fois la courbature suffisante, la protéine structurale d'actine prend le relais pour la maturation de l'endosome enrobé de clathrine. Habituellement uniforme sous la membrane plasmique, les filaments d'actine se concentrent en périphérie de la vésicule naissante (Idrissi, 2012). Pour ce faire, le complexe protéique Wiskott-Aldrich Syndrome (WASp), est localement activé par la GTPase Cdc42, ce qui expose un domaine de liaison pouvant recruter la protéine associée à l'actine 2/3 (Actin Related Protein 2/3 ou Arp2/3). À son tour, Arp2/3 permet la nucléation des sous-unités de F-actine (Brunetti, 2021). Ce recrutement localisé de composantes de formation de l'actine - au site de formation de l'endosome - est possible grâce au manteau de clathrine, plus précisément aux protéines adaptatrices (Sun, 2015). En plus, des molécules motrices de myosine de type I recrutées au site d'endocytose (Idrissi, 2008), repousse du même coup l'actine, le manteau de clathrine et la coupe endosomale.

Finalement, la fission de la coupe d'endocytose est assurée par la dynamine conjointement avec des protéines courbées possédant un domaine BAR, incluant SNX9 et l'endophiline (Ringstad, 1999). Avec leur recrutement de façon séquentielle, elles ont la capacité de former des anneaux protéiques autour du cou de la vésicule et effectivement séparer la vésicule de la membrane (Takei, 1999). De plus, les protéines BAR pourraient jouer un rôle dans la fission vésiculaire indépendante de la dynamine en empêchant l'échange de lipides entre la vésicule et le reste de la membrane plasmique (Zhao, 2013). Afin de pouvoir procéder aux étapes de maturation, la vésicule est ensuite dénudée de son manteau protéique. Pour ce faire, deux processus s'exécutent en parallèle (Kaksonen & Roux, 2018). D'une part, la déphosphorylation du PIP2 par la phosphatase OCRL1 – qui possède une affinité pour la clathrine et AP2 – est activée par la présence de la GTPase Rab35 (Cauvin, 2016), ce qui déstabilise les interactions entre les protéines échafaud et la membrane vésiculaire (Ungewickell, 2004). D'autre part, une fois la déphosphorylation enclenchée, un complexe protéique composé d'auxiline et de HSC70 – la

forme constitutive de HSP70 – s’active et sépare le triskelion de clathrine à la fois de la membrane et des autres vésicules naissantes des environs (Sousa, 2015 ; Fotin, 2004).

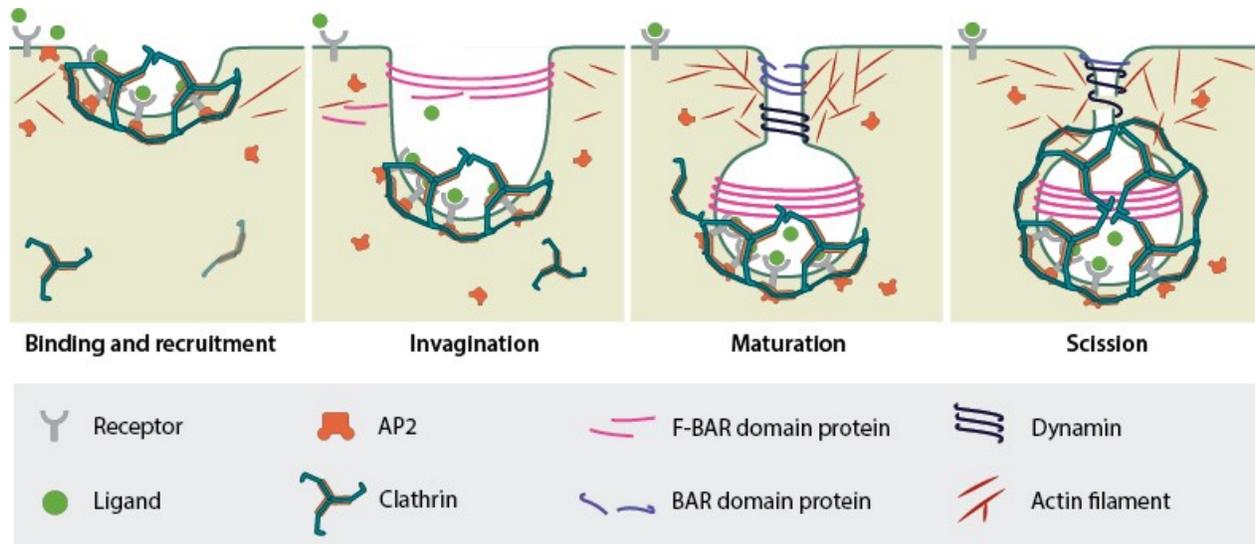


Figure 10. – **Formation d’un puit enrobé de clathrine.** 1) Initiation et recrutement : La liaison d’un ligand à un récepteur transmembranaire recrute la protéine intracellulaire AP-2, qui sert d’échafaud aux sous-unités de clathrine. 2) Invagination : La polymérisation de ces échafauds cause une courbure locale de la membrane plasmique. L’invagination du puit recrute ensuite des protéines contenant le domaine F-BAR en plus de filaments d’actines à proximité de la membrane plasmique en périphérie de l’invagination. 3) Maturation : Ce faisant, le puit mature par incorporation d’autres triskelions de clathrine, et les filaments d’actine resserrent le col du puit. Ce nouveau diamètre accomode la polymérisation de protéines BAR et la dynamine. 4) Scission : Une fois la vésicule entièrement recouverte de son manteau de clathrine, la dynamine scinde le col du puit, et la vésicule est formée. Image tirée de [Mechanobiology Institute](https://www.mechanobiologyinstitute.com/). CC BY-NC-4.0

1.3.2.2 L’endocytose médiée par les caveolae

Les caveolae sont des invaginations de la membrane plasmique riches en sphingolipides et cholestérol (Anderson, 1998). De ce fait, il est difficile de les distinguer des autres invaginations aux RLs. Cependant, leur expression est intrinsèquement liée à la présence de la protéine caveolin-1 (Cav-1) (Drab, 2001). Ce mode d’endocytose requiert lui aussi la présence de la GTPase dynamine située au col de l’invagination (Pelkmans & Helenius, 2002). Une fois l’endosome détaché de la membrane plasmique, aucune protéine Cav-1 n’est détectable à la membrane plasmique. Une isoforme de cette protéine est aussi détectable au réseau transgolgien et dans les caveosomes (Pelkmans, 2001).

La formation des caveolae est similaire aux puits enrobés de clathrine, quoique les effecteurs soient bien distincts. D’abord, Cav-1 - et ses orthologues chez l’humain – se lie à la membrane enrichie de cholestérol. Ceci cause une légère courbature de la membrane. Ensuite, les protéines cavines sont recrutées du cytosol, s’assemblent en trimères (Gambin, 2014), et enrobent l’invagination, formant une caveola stable. Cependant, des changements dans la tension de la membrane plasmique est suffisant pour déstabiliser le manteau de cavines. Afin de minimiser ce risque, la protéine Pacsin2 contenant un domaine BAR – donc qui interagit avec la dynamine – est recrutée au col de la caveola. De plus, l’ATPase EHD2, aussi localisée au col, se couple avec EHBP1, qui stabilise la caveola d’avantage dans les cellules endothéliales (Webb, 2020).

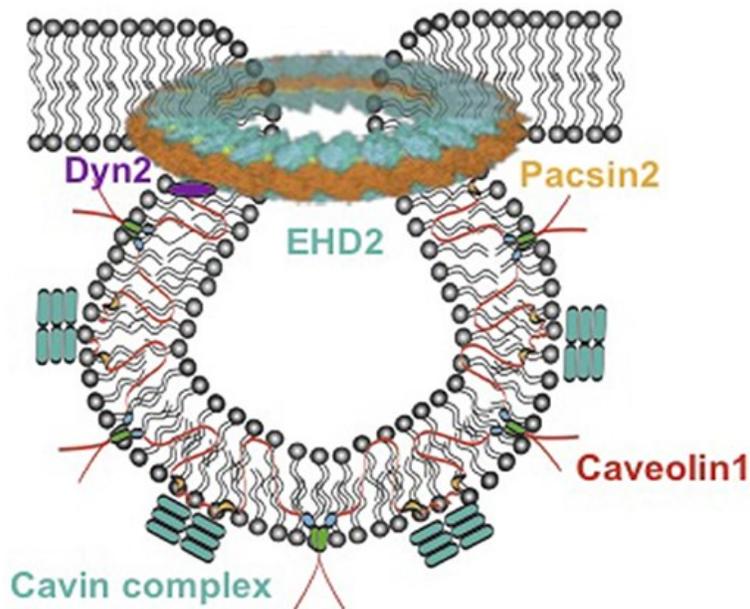


Figure 11. – **Schématisation des éléments essentiels à la formation d’une cavéola.** Des domaines riches en sphingolipides et en cholestérol recrutent la protéine membranaire Caveoline1 (Cav-1), courbant la membrane plasmique. Cette nouvelle conformation recrute les complexes de cavines qui forment un manteau stabilisateur. La protéine Pacsin2 est alors recrutée au col de la vésicule, en plus de la protéine EH domaine 2 (EHD2). Cette dernière possède une affinité pour les domaines EH de la pacsine en plus de l’actine. Elle favorise alors la formation de filaments du cytosquelette. Une fois le col de la cavéola assez petit, le domaine BAR de Pacsin2 recrute la dynamine (Dyn2). Une fois polyérisées au pourtour du col, la dynamine le scinde, séparant la cavéola de la membrane plasmique. Le cavéosome est maintenu attaché au cytosquelette grâce à la protéine EHD2 recrutée plus tôt. Image tirée de Lian et al. CC BY-4.0

Plusieurs substrats sont connus pour entrer dans les cellules par endocytose médiée par les caveolae, incluant l’albumine (Minshall, 2000). Les caveolae ont aussi des fonctions régulatrices

chez les cellules endothéliales. Elles seraient impliquées dans le développement des vaisseaux sanguins (Webb, 2020), la protection des mécanosenseurs comme le VEGFR2 (Shin, 2018) et la régulation de l'enzyme oxyde nitrique synthase endothéliale (endothelial Nitric Oxyde Synthase ou eNOS) (Förstermann, 2012).

1.3.3 Les modes d'endocytose non-classiques

1.3.3.1 La fusion vésiculaire

Un autre moyen pour les EV d'accomplir leur rôle de communicateur est de fusionner directement avec la cellule cible. Ce modèle d'endocytose est caractéristique dans la communication neuronale, plus particulièrement au niveau des synapses. Même si la fusion vésiculaire avec la membrane plasmique peut se produire de façon spontanée (Fredj & Burrone, 2009), le phénomène est le plus souvent facilité par les protéines de la famille des récepteurs de la protéine d'attachement au facteur soluble sensible au *N*-ethylmaleimide (Soluble *N*-ethylmaleimide sensitive factor Attachment Protein (SNAP) REceptor ou SNARE).

Effectivement, les protéines SNAREs servent de molécules d'ancrage de la vésicule (v-SNARE) à la membrane ciblée (t-SNARE). Les nombreux membres de chacun des deux groupes confèrent une spécificité combinatoire pour la fusion vésiculaire (McNew, 2000). Une fois ancrées, les sous-unités en forme d'hélice du complexe *trans*-SNARE glissent les unes sur les autres à la manière d'un tire-bouchon. Ce mouvement de translation se traduit en « fermeture éclair » au niveau de la fourche formée par le complexe *trans*-SNARE, rapprochant la membrane vésiculaire de la membrane plasmique (Südhof & Rothman, 2009). Cette proximité favorise la fusion membranaire, ce qui libère le cargo vésiculaire directement dans le cytosol de la cellule cible.

Finalement, ce type de fusions vésiculaires est aussi utilisé par les cellules dans le relâchement des ILVs dans le milieu extracellulaire et la maturation endosomale (Gurung, 2021) ainsi que l'autophagie (Moreau, 2011; Abeliovich, 1999). En bref, les SNAREs sont impliquées dans presque tous les types de fusion vésiculaires à l'intérieur même de la cellule.

1.3.3.2 La phagocytose

Classiquement la phagocytose était reconnue pour être presque exclusivement utilisée par les cellules immunitaires. Cependant, d'autres types de cellules sont maintenant bien reconnus comme phagocytes dits non-professionnels. La phagocytose consiste en l'engloutissement actif d'un substrat par extension de la membrane plasmique, qu'il s'agisse d'un pathogène ou de débris cellulaires. Effectivement, les phagocytes font partie intégrante de l'homéostasie des organismes multicellulaires (Rosales & Uribe-Querol, 2017). Les phagocytes professionnels n'incluent pas seulement les macrophages et cellules dendritiques, mais aussi les monocytes, neutrophiles, éosinophiles et ostéoclastes (Rabinovitch, 1995). Cependant, d'autres types cellulaires sont aussi capables de phagocytose, incluant les cellules endothéliales et fibroblastes ; ces cellules seront reconnues comme des phagocytes non-professionnels. En tous les cas, la phagocytose est initiée par la reconnaissance de certains patrons moléculaires.

Ainsi, il existe deux types de récepteurs situés à la surface de la membrane plasmique des phagocytes, soit les récepteurs opsoniques ou non-opsoniques (Canton, 2013). Plusieurs récepteurs de chaque type sont présents sur une même cellule. D'une part, les récepteurs opsoniques reconnaîtront indirectement les particules à phagocyter par l'entremise d'opsonines issues de l'hôte (Flannagan, 2012). Des opsonines bien connues sont les anticorps et les molécules du complément. D'autre part, les récepteurs non-opsoniques reconnaissent des patrons moléculaires directement sur la particule à phagocyter, comme les patrons moléculaires associés aux pathogènes et la PtdSer. Suivant la liaison aux différents récepteurs, une cascade de signalisation est entamée, ce qui mène à la polymérisation locale des sous-unités d'actine, et formation de pseudopodes autour de la particule (Sanchez-Mejorada, 1998). En fusionnant, les pseudopodes reforment la membrane plasmique et repoussent le phagosome vers l'intérieur. Ce dernier commence alors son processus de maturation, et fusionne avec un lysosome afin de digérer la particule phagocytée.

1.3.3.3 L'endocytose médiée par les radeaux lipidiques

Comme mentionné plus haut, les RLs sont des domaines de la membrane plasmique riches en sphingolipides et en cholestérol. Ces domaines délimités favorisent le regroupement de différents récepteurs (Mulcahy, 2014). Ces structures aussi sont sensibles à la molécule méthyl- β -

cyclodextrine (M β CD), qui séquestre le cholestérol de la membrane. Ce faisant, il est possible de réduire les niveaux d'internalisation d'exosomes dans les cellules réceptrices (Koumangoye, 2011). De plus, la flotilline, une composante des radeaux lipidiques, augmente à la fois le nombre d'événements d'endocytose médiée par les RLs et par les caveolae (Phuyal, 2014). Il ne faut cependant pas confondre les deux, puisque les protéines cavéolines et cavines ne sont pas impliquées dans les processus décrits ici (Lajoie & Nabi, 2007). De plus, ces modes d'endocytose sont indépendants de la dynamine.

En général, l'endocytose médiée par les RLs est enclenchée par des récepteurs se groupant aux RLs à la suite de la liaison de leur ligand. Par exemple, une grande proportion (environ 40%) de la charge en toxine du choléra est internalisée par ce mode (Torgersen, 2001) à la suite de la liaison au sphingolipide GM1, enrichi dans les radeaux lipidiques.

1.3.3.4 La macropinocytose

L'événement de macropinocytose consiste en l'extension de lamellipodes qui forment une coupe en se refermant sur elles-mêmes. Ce faisant, la cellule internalise son environnement immédiat de façon non-discriminatoire à l'intérieur d'un macropinosome (Doherty & McMahon, 2009). Ainsi, ce processus permet à la cellule d'absorber des nutriments, sentir son milieu immédiat et même de diriger sa migration (Swanson & King, 2019). Conséquemment, les rôles caractéristiques des macrophages pour la localisation et le nettoyage de particules et pathogènes peuvent tout à fait être attribués à la macropinocytose.

Pour ce faire, la coordination de différents effecteurs aux microdomaines mentionnés plus-haut (Section 1.3.3.3) est essentielle. D'abord, la phosphatidylinositol-3' kinase (PI3K) phosphoryle le phosphatidylinositol-(4,5) biphosphate (PI(4,5)P₂) en phosphatidylinositol triphosphate (PIP₃). Ensuite, ces molécules recrutent conjointement des petites GTPases de la famille Rho - Rho, Cdc42 et Rac – à la membrane plasmique en plus de protéines de la famille protéine WASp (i.e. : le complexe SCAR/WAVE). Étant maintenant regroupées, les GTPases activent WASp, qui recrute à son tour des effecteurs, incluant la protéine Arp2/3. Jusqu'ici, on remarque une similitude assez marquée avec les autres modes d'endocytose pour le recrutement de la machinerie de polymérisation de l'actine. Cependant, en l'absence de protéines manteau pour guider la

courbure de la membrane plasmique, cette polymérisation force la formation de repliements et protrusions de la membrane. Finalement, ces protrusions se referment sur la membrane à une distance du point de formation variant entre 0.2 μm et 6 μm (Swanson, 2008). Ce repliement forme alors un macropinosome de taille similaire à l'extension membranaire, engouffrant le milieu extracellulaire – et ses composantes – s'y retrouvant. Une fois formé, le macropinosome mature rapidement, adoptant une signature membranaire similaire aux autres types d'endosomes, sans toutefois posséder un marqueur spécifique à la macropinocytose (Swanson, 2018).

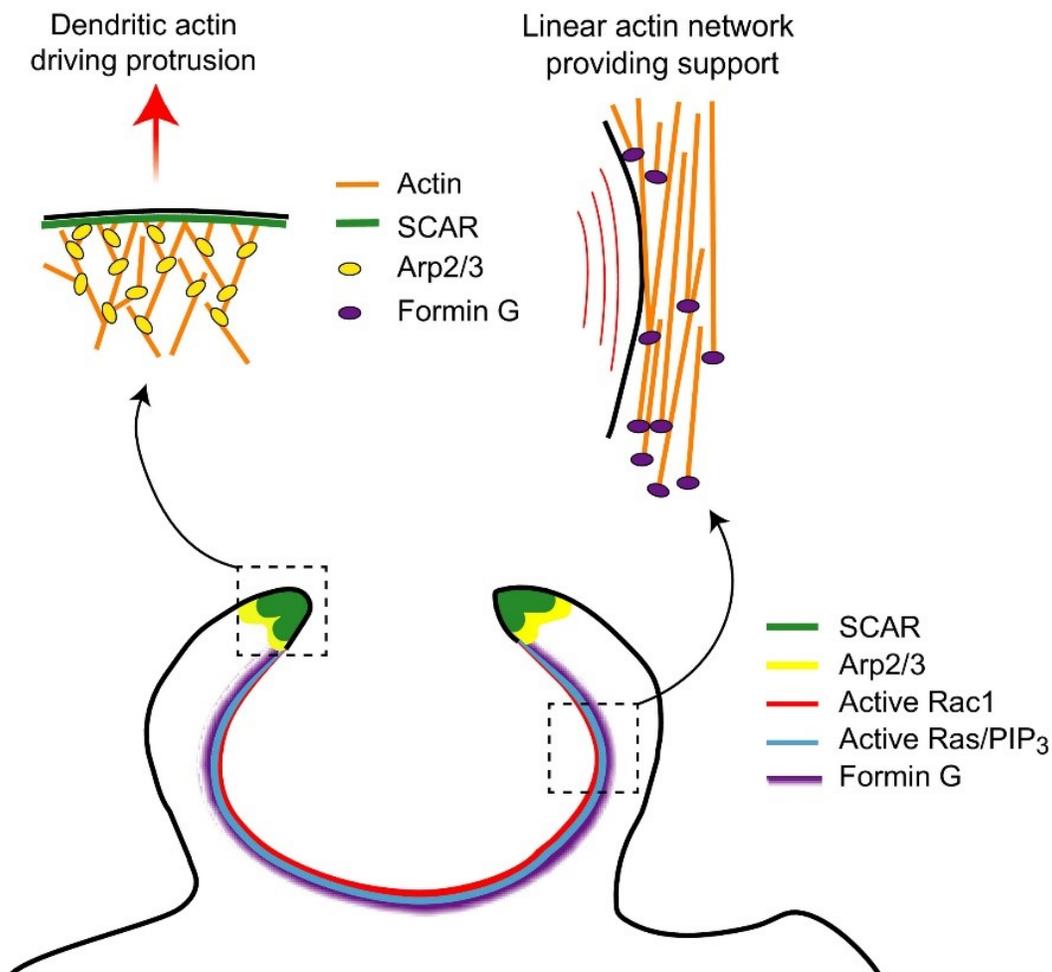


Figure 12. – **Polymérisation de l'actine menant à la formation d'un macropinosome.** En présence d'îlots de PIP₃, les petites protéines G (Ras et Rac1) sont recrutées à la membrane plasmique. Des îlots de polymérisation en forme de filets sont ainsi établis et assurés par les protéines SCAR et Arp2/3, forçant la protrusion de la membrane plasmique. En s'éloignant du lieu initial, ces îlots laissent un réseau d'actine filaire qui supporte la forme de la coupe macropinocytique, le tout stabilisé par la Formine G pour éviter la dépolymérisation des filaments d'actines. Image tirée de Buckley & King. Licence obtenue via CCC-RightsLink.

1.3.3.4.1 La macropinocytose chez différents types cellulaires

Naturellement, il existe des mécanismes de régulation de l'activité macropinocytique, quoique ce processus puisse se produire de façon constitutive (Redka, 2017). Plus particulièrement, les récepteurs tyrosine kinase (RTK), à la suite de leur activation, sont capables de recruter des facteurs importants par la régulation de la phospholipase C γ (PLC γ). Pour ce faire, la PLC γ scinde le PIP₃, déjà présent aux microdomaines, formant du diacylglycérol. À son tour, cette molécule favorise l'échange de nucléotide essentiel au fonctionnement des GTPase en amont de la cascade de polymérisation de l'actine (Doodnauth, 2018). De plus, certains GPCRs sont aussi responsable de l'augmentation de l'activité macropinocytique par leur contribution aux taux de PIP₃ présents aux microdomaines membranaires. Aussi, des inhibiteurs pharmacologiques bloquant la macropinocytose ont été découverts. L'amiloride et ses dérivés sont parmi les plus efficaces et les spécifiques grâce à leur action localisée à la membrane plasmique (Lin, 2020), même s'ils affectent tout de même d'autres processus cellulaires à cet endroit.

De ce fait, certains pathogènes ont les moyens de favoriser la macropinocytose pour infecter les cellules et échapper au système immunitaire (Haraga, 2007 ; Schroeder, 2008). Plus spécifiquement, les bactéries *Shigella flexneri* et *Salmonella typhi* insèrent des facteurs de virulence directement dans la cellule hôte par sécrétion de type III, soit par injectisome (Kimbrough, 2002). Ces facteurs sont capables d'influencer les voies de régulation de la macropinocytose décrites ci-haut. Elles sont alors encapsulées dans un macropinosome, et en modifient alors la signature lipidique afin d'éviter la dégradation lysosomale (Schroeder, 2008). Parallèlement, plusieurs virus utilisent la macropinocytose comme voie d'entrée dans la cellule (Mercer & Helenius, 2012). Les virus exploitent la non-spécificité de l'internalisation de l'environnement immédiat par les macropinosomes. De plus, certains virus ont la capacité d'induire la macropinocytose en se liant aux récepteurs mentionnés plus haut (Grove and Marsh, 2011). Ils peuvent même être adsorbés aux composantes de la matrice extracellulaire, comme le HSPG.

Enfin, la macropinocytose joue un important rôle dans le maintien des cellules cancéreuses. Effectivement, elle permet de pallier la demande accrue en nutriments des cellules cancéreuses, qu'il s'agisse d'acide aminé, glucose ou ATP (Commisso, 2013 ; Qian 2014) leur conférant une résistance aux drogues qui compétitionne avec l'ATP. Cependant, l'augmentation dérégulée de la macropinocytose peut induire la mort cellulaire par methuose (Overmeyer, 2008). Brièvement, la surproduction ou l'arrêt de la maturation et de la dégradation des macropinosomes mène à une déstabilisation de la membrane plasmique. Cet état précaire de la membrane rend le trafic vésiculaire - et conséquemment le recyclage de la membrane - difficile, menant au gonflement de la cellule et à la rupture de la membrane.

1.3.3.4.2 La macropinocytose chez différents types cellulaires

Nonobstant son rôle important pour les cellules cancéreuses, d'autres types cellulaires sont aussi capable de macropinocytose. De prime abord, les cellules immunitaires font partie des premières cellules à être identifiées comme telles (Lewis, 1931). De nos jours, ces mécanismes sont bien connus et décrits en détail. Cependant, la macropinocytose peut affecter ces cellules de manière surprenante.

En effet, une compétition pour les ressources nécessaires à la migration s'effectue lors de l'activation de la macropinocytose chez les cellules dendritiques (CD) (Heuze, 2013). D'une part, ce phénomène permet aux CD matures et présentatrices d'antigène de migrer lentement à travers des tissus (Vargas, 2016) et mieux détecter les antigènes – et autoantigènes – locaux (Moreau, 2019). D'autre part, les CD immatures sont avantagées dans l'exploration contre la pression hydrostatique dans les capillaires terminaux (Moreau, 2018). Quant à eux, les macrophages possèdent deux sites distincts de macropinocytose. La macropinocytose périphérique est associée à la migration et la capture de particules, alors que la macropinocytose dorsale est dédiée à la signalisation cellulaire, puisqu'elle survient après stimulation de TLR menant à la sécrétion de cytokines (Wall, 2017). De plus, les lymphocytes B et T sont aussi capables de macropinocytose. Quoique les niveaux basaux soient quasi-absents, les lymphocytes B peuvent produire des macropinosomes dans un contexte de pathogenèse (Garcia-Perez, 2012)

de façon similaire à la régulation par les pathogènes décrite plus-haut. Récemment, les capacités macropinocytiques des lymphocytes T a été réévaluée positivement (Charpentier, 2020). Elle servirait ici à soutenir la croissance des deux types (CD4⁺ et CD8⁺).

Finalement, les cellules du système vasculaire sont bien connues pour leur activité de macropinocytose. Effectivement, des cellules endothéliales aortiques de porc expriment des niveaux basaux de macropinocytose qui sont modulés en réponse au facteur de croissance dérivé des plaquettes (Platelet-Derived Growth Factor ou PDGF) grâce à une expression accrue de la PI3K et la formation du PIP₃. De leur côté, les fibroblastes, tout comme les macrophages, sont aussi capable de macropinocytose périphérique et dorsale, qui sont chacune médiée par différents effecteurs, soit la protéine WAVE1 et WAVE2, respectivement (Suetsugu, 2003). De plus, ces deux types auraient des fonctions similaires à celles des macrophages, soit la migration et la signalisation. Un dernier type de cellules vasculaires, les cellules endothéliales, peuvent même voir leur activité métabolique changer à la suite d'événements de macropinocytose. Plus précisément, les HUVECs, sous des conditions de carence en glutamine, sont capables d'augmenter leur niveau de macropinocytose (Kim, 2017). Ceci leur permet d'internaliser d'autres acides aminés non-essentiels afin de promouvoir leur prolifération sans pour autant jouer sur leur niveau de migration.

1.3.4 L'échappement endosomal

Peu importe le mode d'entrée, certaines composantes endosomales peuvent s'échapper de l'endosome, avant ou pendant le processus de dégradation. La littérature décrit plusieurs mécanismes d'échappement endosomal, tantôt viral ou bactérien, tantôt par des molécules synthétiques (Haisma, 2011). Dans tous les cas, l'intégrité des membranes endosomales et lysosomales est affectée.

Premièrement, la formation de pores peut se produire dans les deux types de compartiments. Des peptides amphiphiliques, c'est-à-dire qui possèdent une affinité pour les régions hydrophiles et hydrophobes, changent la dynamique et la fluidité des membranes lipidiques en s'insérant à travers celle-ci (Huang, 2004). La formation de pores est ensuite assurée par la multimérisation et réorientation spatiale de ces peptides, créant des structures en forme de barils.

Deuxièmement, l'accumulation de charges négatives pendant l'acidification des endosomes crée un environnement avec une faible osmolarité, créant une tension sur la membrane endosomale qui peut mener à sa rupture (Haisma, 2011). Sinon, ces charges négatives modifient les chaînes hydrophobiques des molécules avec amines tertiaires, leur conférant des propriétés s'apparentant aux détergents (Miller, 1983).

Troisièmement, les vésicules contenues dans les endosomes peuvent fusionner avec la membrane de celui-ci, menant au relargage de leur contenu dans le cytosol. Parallèlement à l'acidification des endosomes décrite précédemment, certains peptides fusogéniques, souvent d'origine virale, force la fusion des enveloppes virales avec l'endosome (Horth, 1991). Autrement, certains récepteurs, dont la famille des récepteurs au facteur de croissance des fibroblastes (FGFR), ont la capacité d'échapper à la dégradation en liant l'héparan sulfate (HSPG). Cette liaison leur permettrait de traverser la membrane endosomale (Cho, 2004 ; Lindhart, 2004), et potentiellement de transférer leur ligand dans le cytosol.

Question et objectifs

Mise en contexte

Les ApoExo sont différents des exosomes classiques et des corps apoptotiques. Ils contiennent un protéasome 20S actif ainsi que le fragment LG3 du perlecan, qui sont tous deux responsables de fortes réponses inflammatoires et auto-immunes. En plus de leurs caractéristiques distinctes, les ApoExo ont la capacité d'influencer leur environnement. Les ApoExo induisent aussi la dysfonction et la dédifférenciation des cellules endothéliales en condition de stress.

De plus, le contenu en ARN des ApoExo est largement différent non seulement des corps apoptotiques, mais aussi des cellules apoptotiques à l'origine des ApoExo. En fait, une proportion de ces ARNs sont décrits comme immunostimulateurs et ressemblant à des ARNs viraux. Cependant, les mécanismes de partage du contenu des ApoExo est encore à caractériser.

Question

Puisque les ApoExo sont relâchés à la suite d'un dommage vasculaire et qu'ils induisent une réponse immunitaire *in vivo*, est-ce que les ApoExo sont capables de transmettre leur cargo aux cellules endothéliales avoisinantes? Si oui, quelles voies d'internalisation empruntent-ils, et quel type de cargo transfèrent-ils?

Hypothèse

Les ApoExo seront internalisés par les cellules endothéliales via un mode d'endocytose non classique et y relargueront leur cargo spécifique d'ARN.

Objectif

Caractériser le mode d'entrée des ApoExo chez les cellules endothéliales et les composantes qui y sont relarguées.

Chapitre 2 – Méthodologie

Culture cellulaire et réactifs

Des cellules endothéliales de veines de cordons ombilicaux (HUVEC) ont été achetées chez Cell Applications et cultivées sur une surface gélatinisée avec milieu M200 enrichi d'un milieu de croissance faible en sérum (Gibco, Waltham, MA, USA) jusqu'au 4^e passage. Afin de produire les vésicules, les cellules sont incubées dans un milieu RPMI sans sérum (Gibco) pour une durée de 4 heures, tel que décrit (Dieudé, 2015 ; Hardy, 2019 ; Migneault, 2020 ; Dieudé, 2020). Afin de produire des vésicules fluorescentes, des HUVEC ont été traitées avec les marqueurs fluorescents Cell Tracker Orange-CMRA ou SYTO RNASelect Green Fluorescent (Molecular Probes, Waltham, MA, USA) pendant 15 m avant l'incubation sans sérum. La Cytochalasine D (Cyto D), la monosansylcadavérine, le methyl- β -cyclodextrine (M β CD) et le 5-(N-ethyl-N-isopropyl)amiloride (EIPA) utilisés pour les traitements cellulaires ont été achetés chez Sigma (Burlington, MA, USA). La transferrine couplée à la fluorescine thioisocyanate (FITC) a été achetée chez ThermoFisher (Waltham, MA, USA, et l'annexine 5 (AnxV) chez Biolegend (San Diego, CA, USA)

Isolation de vésicules extracellulaires

Le milieu de culture sans sérum conditionné pendant 4 h par les HUVECs a été fractionné par centrifugation séquentielle selon les indications publiées dans le passé (Dieudé, 2015; Migneault, 2020). Rapidement, une première centrifugation de 15 m à une vitesse de 1200 g à 4°C est effectuée, suivi d'une deuxième centrifugation de 15 m à 50 000 g à 4 °C, puis une dernière centrifugation de 18 h à 200 000 g à 4 °C. Les culots de 50 000 g et 200 000 g correspondent aux corps apoptotiques et ApoExo, respectivement. Les culots sont resuspendus dans le volume initial de milieu avec ou sans sérum, le cas échéant.

Évaluation de l'apoptose

Les HUVECs ont poussé dans des plaques de 6 puits jusqu'à presque confluence (90-95%). Les cellules ont ensuite été rincées deux fois au RPMI avant d'être incubées pendant 4 h dans un milieu avec ou sans sérum. Elles ont ensuite été colorées au Hoechst33342 (1,0 μ g/mL) (Molecular

Probes, Waltham, MA, USA) pendant 10 m. Une solution d'iodure de propidium (5 µg/mL) est ajoutée au moment de l'acquisition à une longueur d'onde d'excitation de 360 nm à 425 nm. Les pourcentages de cellules normales, apoptotiques et nécrotiques sont calculés à partir de 8 images captées aléatoirement à des endroits différents dans le même puit pour chaque condition à grossissement total de 5X. Les niveaux d'apoptose sont calculés à partir du nombre de cellules apoptotiques (noyau condensé (bleu brillant) avec absence de perméabilité membranaire (rouge)) divisé par le nombre de cellules totales pour chaque micrographie.

Mesure de l'activité du protéasome

Les ApoExo et CA isolés sont resuspendus à une concentration de 200X dans du PBS. La concentration en protéine de la resuspension est quantifiée par une trousse de microdosage BCA (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). Ensuite, une trousse de mesure d'activité du protéasome similaire à la caspase (Promega, Madison, WI, USA) est utilisée selon les instructions du fabricant pour mesurer l'activité du protéasome. Brièvement, les ApoExo et CA sont dilués dans du PBS à protéines égales, et amenés à température ambiante. Le réactif luminescent est ajouté aux échantillons à volume égal, protégé de la lumière, puis mélangés par agitation sur une plaque rotative à 200 rpm. Les échantillons incubent à température ambiante pour 10 m avant d'être lus au lecteur de luminescence Victor³ (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Le niveau de luminescence est normalisé sur la concentration en protéine et rapporté en tant qu'activité du protéasome sur le volume de surnageant initial.

Cytométrie en flux des vésicules

Les cellules sont cultivées dans le Medium 200 + LSGS déplété en vésicules ou dans le RPMI sans sérum, tel que décrit plus tôt. Les surnageants sont centrifugés à 1200 g à 4 °C pendant 15 m afin d'enlever les débris cellulaires. Les vésicules sont marquées pendant 60 m à 32°C avec la sonde LWA300 (300 nM), puis au Cell Tracker Deep Red (1 µM, Thermo Fisher) pendant 30 m. Ensuite, de l'AnxV couplée au fluorophore BV421 est ajoutée à température pièce pendant 20 m. L'analyse de la cytométrie en flux est effectuée telle que décrite (Beillevaire, 2022) sur l'appareil BD Canto II Special Order Research Product (BD Biosciences) équipé de l'option à petites particules

Cytométrie en flux

Les cellules confluentes sont incubées avec des ApoExo fluorescents et les inhibiteurs pharmacologiques ou leur véhicule (voir section : Culture cellulaire et réactifs) pour les temps mentionnés avant d'être rincées au PBS et décollées à la trypsine. Les cellules sont alors marquées avec la trousse AquaDead (Invitrogen, Waltham, MA, USA) selon les instructions du fabricant et lavées deux fois puis resuspendues au PBS supplémentés avec BSA (1 % m/v). L'internalisation des ApoExo quantifiée sur un cytomètre FACS-LSRII avec le logiciel FACSDiva (BD Biosciences Franklin Lakes, NJ, USA) jusqu'à 30 000 événements par échantillon. Les données ont été analysées avec le logiciel FlowJo.

Microscopie confocale

Le protocole suivant est une adaptation de Migneault *et al.* (Migneault, 2020). Rapidement, les cellules ont été cultivées sur des lamelles de verre recouvertes de gélatine jusqu'à confluence. Elles ont ensuite été incubées avec des ApoExo marqués au CMRA (description ci-haut) pour les périodes mentionnées. Les cellules ont été rincées au PBS puis fixées dans une solution de PBS-paraformaldéhyde (4 % m/v) pendant 20 m à température ambiante. Les cellules fixées ont été marquées au DAPI (300 nM) puis les lamelles montées sur des lames de microscope en verre avec le milieu de montage Prolong Gold. Les images confocales ont été acquises avec un appareil Leica TCS-SP5 inversé à l'aide d'un objectif à huile HCX PL APO 63x/1.4. L'excitation des fluorophores a été effectuée avec un laser à diode 405 nm pour le DAPI ou 561 nm pour le CMRA avec une acquisition séquentielle à fréquence de balayage de 400 Hz. Les images ont été acquises grâce au logiciel Las-AF. Les images finales ont un format de 12 bits de 2048x2048 pixels (Zoom 2x) avec l'échelle indiquées sur les images. Ces images ont été analysées avec le logiciel FIJI (NIH). La fluorescence cellulaire totale corrigée (CTCF) correspond à la densité intégrale moins la surface cellulaire multipliée par le signal moyen du bruit de fond (Migneault 2020 ; McCloy, 2014).

Microscopie électronique

Les cellules confluentes ont été incubées dans le Medium 200 + LSGS déplété en vésicules ou le RPMI sans sérum, avec ou sans ApoExo pour les temps indiqués, puis fixées au PBS supplémenté

de glutaraldéhyde 1 % v/v à pH 7.2. Les cellules ont ensuite été lavées au PBS puis décollées et culotées. Le culot a été fixé de nouveau dans le PBS supplémenté avec de l'OsO₄ 1 % pendant une heure à 4 °C. Les échantillons ont ensuite été déshydratés dans une série de bain d'éthanol, puis incorporés à une matrice d'Epon selon les protocoles usuels (Luft, 1961). Des sections ultra-minces ont été tranchées à l'aide d'un ultramicrotome Reichert Ultracut, puis montées sur des grilles de nickel. Les sections ont été marquées avec une solution aqueuse d'acétate d'uranyl et de citrate de plomb à une concentration de 3 %. Les micrographies ont été acquises avec un microscope électronique à transmission Philips CM100 équipé d'une caméra digitale AMT XR80.

Transfection d'ARN interférant

Ce protocole est une adaptation de Migneault *et al.* (Migneault, 2020). Des plaques 6 puits ont étéensemencées avec des HUVEC à 2500 cellules par cm². Après 72 h, les cellules ont été transfectées avec des petits ARN de marque ON-TARGETplus – SMARTpool (Dharmacon, Lafayette, CO, USA) contre les gènes humains CAV1, DNM I/II, PCSK5 ou des petits ARN sans cible à l'aide de la trousse Magnet Assisted Transfection (MATra) (IBA Lifesciences, Göttingen Allemagne) selon les instructions du fabricant. Rapidement, le réactif MATra a été ajouté à une solution de siARN (1 mL : 1 µg) dans le milieu Opti-MEM (Gibco) et incubé à température ambiante pendant 25 m. Ensuite, la solution est ajoutée au milieu de culture des cellules qui ont ensuite été placées sur une plaque magnétique pour 15 m à 37 °C, puis 30 m additionnelles sans plaque magnétique, toujours à 37 °C. Un changement de milieu pour le Medium 200 + LSGS st effectué immédiatement, puis après 24 h. Les cellules sont utilisées pour les essais et traitements appropriés 48h après la transfection.

Lyse cellulaire, isolation des protéines et immunobuvardage

Les protéines cellulaires totales ont été obtenues à la suite de deux lavages au PBS froid et une lyse cellulaire sous agitation à 4 °C pendant 15 m avec un tampon de lyse (1 % Triton X-100, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA et 50 mM Tris, pH 7,5) supplémenté avec un mélange d'inhibiteurs de protéases (Calbiochem, San Diego, CA, É.-U.) et de phosphatases (Sigma). Le fond des puits a été gratté avec un patin en caoutchouc puis les surnageants récoltés et centrifugés à 12,000 g à 4 °C

pendant 10 m. La concentration en protéine a été évaluée avec une trousse de dosage protéine BCA (Thermo Fisher) selon les instructions du fabricant.

Les protéines ont ensuite été solubilisées dans un tampon de chargement (25 nM Tris-HCl, 1 % SDS, 0,1 % bleu de bromophénol, 10 % glycérol, 2 % β -mercaptoéthanol, pH 6,8) puis incubées à 95 °C pendant 10 m avant d'être assujetties à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE). Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose par électrophorèse. La membrane a par la suite été bloquée dans une solution saline tamponnée avec Tris avec Tween (0,05% v/v) (TBST), supplémentée de lait en poudre sans gras à 5 % m/v pendant une heure. La membrane a alors été incubée dans le TBST-Lait 5 % ou TBST-BSA 5 % avec un anticorps primaire contre LG3, PSMA3, CAV1, DNM I/II (Cell Signaling), PCSK5 (Thermo Fisher), GAPDH (Cell Signaling) ou b-actin (Sigma). Après lavage dans le TBST, les membranes ont été incubées avec un anticorps secondaire conjugué avec la peroxydase du raifort contre l'anticorps primaire approprié pendant 1 h. Après d'autres lavages, les membranes ont été incubées avec le réactif de révélation Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche, Basel, Suisse) ou ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) pendant 5 m avant la capture de la luminescence avec le système ChemiDoc XRS+ (BioRad Laboratories Inc.). Le signal de chaque bande spécifique a été quantifié avec le logiciel Image Lab 5.2 (BioRad Laboratories Inc.)

Séquençage d'ARN

Les données du séquençage d'ARN proviennent de Hardy *et al.* (Hardy, 2019), téléchargées depuis les archives Gene Expression Omnibus avec le numéro d'accès GSE119108. Les lectures ont été quantifiées et alignées sur les transcrits annotés sur ENSEMBL (GRCh38.91) avec l'algorithme Kallisto (v0.43.1). Les niveaux d'expression des transcrits ont été exprimés en transcrits par million (TPM). Les transcrits possédant une expression relative supérieure à 10 TPM dans les deux réplicats dans au moins un échantillon ont été considéré comme enrichis.

RT-qPCR

L'ARN total a été extrait à partir des cellules avec la trousse miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Allemagne) selon les instructions de fabricant. La concentration en ARN extrait a été quantifiée

avec le spectrophotomètre et fluoromètre DeNovix DS-11 FX (Logiciel d'acquisition RNA V3.51). Un microgramme d'ARN total a été traité à la DNase I (Invitrogen, Waltham, MA, É.-U.), et inversement transcrit en ADN complémentaire avec la trousse iScript Reverse Transcription Supermix (BioRad, Hercules, CA, É.-U.) selon les instructions du fabricant. Pour l'amplification quantitative par PCR, 5 ng d'ADN complémentaire a été amplifié avec des sondes TaqMan (Thermo Fisher, Waltham, MA, É.-U.) pour PCSK5 ou HPRT1 and le réactif d'amplification TaqMan Fast Advanced Master Mix (ThermoFisher, Waltham, MA, É.-U.). Les réactions ont été effectuées à l'aide de l'appareil QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR (LifeBiosciences). Après une incubation initiale de 20 secondes à 95 °C, les échantillons ont été amplifiés sur 40 cycles comprenant d'une étape de dénaturation d'une seconde à 95°C, suivi d'une hybridation et élongation à 60 °C pendant 20 secondes. Les niveaux d'expression de PCSK5 ont été calculés selon la méthode du ΔCt , puis normalisés sur l'expression du gène HPRT1 ($\Delta\Delta\text{Ct}$).

Analyse statistique

Toutes les données sont présentées en tant que la moyenne \pm SEM sur au moins 3 réplicats indépendants, sauf indication contraire. Les données ont été testées par le test de Student, sauf sous indication contraire, avec le logiciel GraphPad Prism 8.0 (GraphPadSoftware Inc. San Diego, CA, É.-U.) Une valeur $p < 0,05$ a été considérée comme significative.

Chapître 3 – Résultats

3.1 Les ApoExo sont différents des corps apoptotiques et des exosomes normaux.

Lors d'une carence en sérum, les cellules endothéliales (CE) démontrent des signes d'apoptose sans démontrer de caractéristiques propres à la nécrose (Figure. 13A). Grâce à la cytométrie en flux à petites particules (spFACS), nous avons confirmé que les CE relâchent des vésicules extracellulaires de différentes tailles en conditions normales et en absence de sérum. Les CA et ApoExo isolés du milieu de culture des CE carencées en sérum démontrent des caractéristiques ultrastructurelles distinctes. Effectivement, les CA ont une taille supérieure à 1 μm alors que celle des ApoExo varie entre 30 et 100 nm (Figure 13B) tel que déjà observé (Migneault, 2020; Dieudé 2015).

De plus, seul le surnageant provenant des cellules carencées en sérum contenait des nanovésicules exprimant la phosphatidylsérine (PtdSer) et un protéasome actif, une caractéristique des ApoExo (Figure 13C). En accord avec les résultats spFACS, l'activité du protéasome similaire à la caspase (« caspase-like proteasome activity ») est plus élevée dans les ApoExo que dans les CA et dans les exosomes produits en conditions normales (ExoN) (Figure 13D).

Les analyses d'immunobuvardage de type Western confirment que les ApoExo produits expriment des marqueurs différents des CA (Figure 13E). Ce faisant, les ApoExo expriment les protéines LAMP2, LG3 et la sous-unité 20S du protéasome, alors que les CA expriment GM130, l'histone H3 et la tubuline. De plus, certains marqueurs classiques des exosomes sont absents des ApoExo, telles que les tétraspanines CD63 et CD82 (Figure S1).

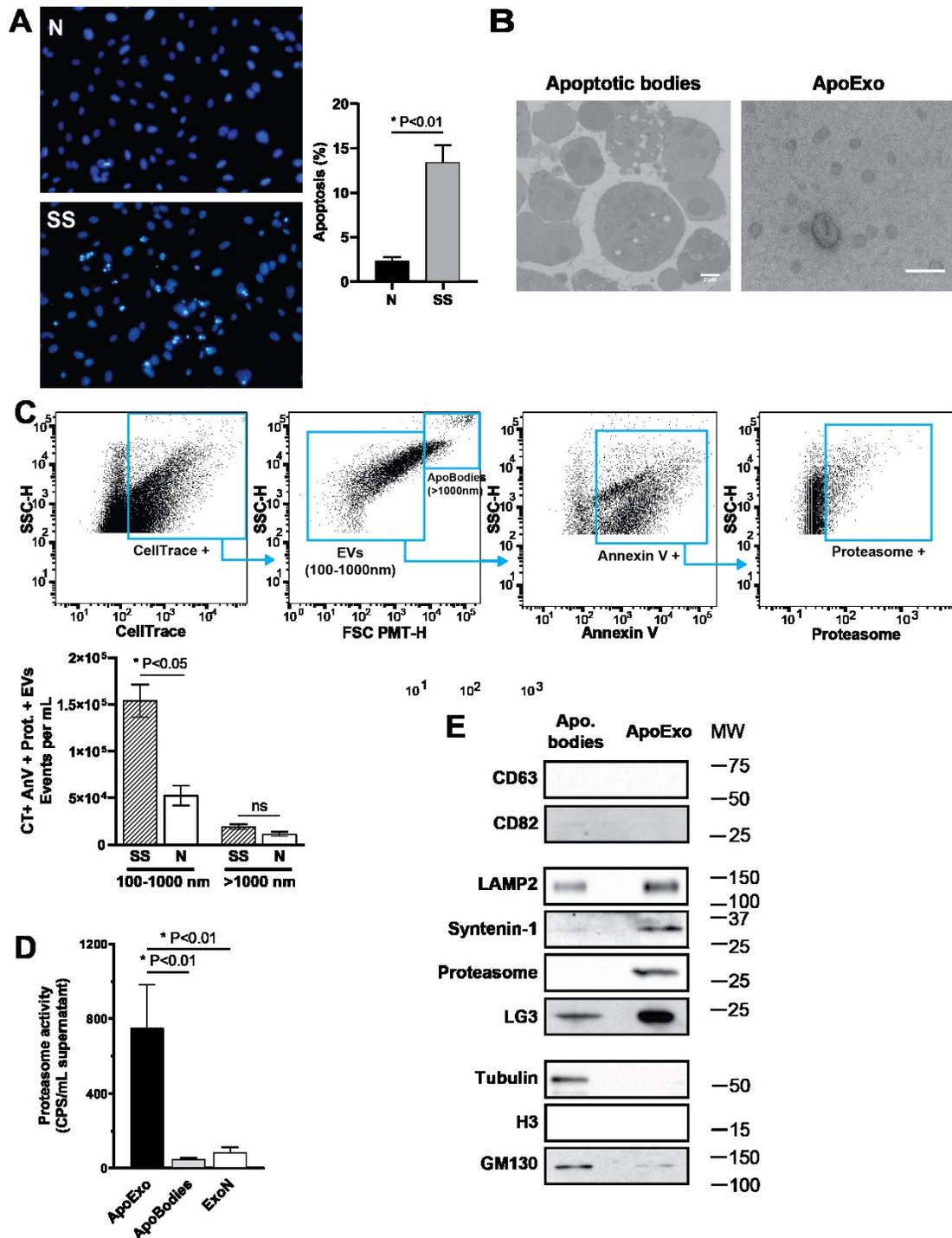


Figure 13. – Les vésicules apoptotiques apparentées aux exosomes sont différentes des exosomes classiques et des corps apoptotiques. (A) Quantification des niveaux d'apoptose chez les cellules endothéliales en carence de sérum pendant 4 h avec micrographie représentatives. Microscopie fluorescente de cellules endothéliales marquées au Hoechst et à l'iode de propidium. Le nombre de cellules apoptotique et totales ont été quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ. Les niveaux d'apoptose sont exprimés en tant que moyenne

± SEM. n ≥ 3 pour chaque condition. (B) Micrographies électronique à transmission représentatives des corps apoptotiques (gauche, échelle: 2 µm) et des ApoExo (droite, échelle: 1 µm). n ≥ 3 pour chaque condition. (C) Stratégie de guérite pour analyser l'expression de la phosphatidylsérine et du protéasome sur les vésicules positives pour le marqueur CellTrace dans le milieu conditionné par des cellules endothéliales et graphique en nuage de points représentatif; n≥5 pour chaque condition. (D) Comparaison de l'activité du protéasome chez les ApoExo, les corps apoptotiques (ApoBodies) et les exosomes classiques (ExoN). Les valeurs sont exprimées en tant que moyenne ± SEM. n≥4 pour chaque condition. (E) Immunobuvardage de type Western montrant différents marqueurs protéiques chez les corps apoptotiques et les ApoExo. Les poids moléculaires sont exprimés en kDa. Des immunoblots représentatifs sont montrés. n ≥ 3 pour chaque condition. Les valeurs P ont été obtenues par test de Student non-jumelé (* P < 0.05, ** P < 0.01, and *** P < 0.001).

3.2 Les ApoExo sont activement internalisés par les cellules endothéliales.

Ensuite, le potentiel d'internalisation des ApoExo par les cellules endothéliales a été vérifié indirectement par transfert de fluorescence. Pour ce faire, des cellules ont d'abord été marquées par fluorescence avec le réactif Cell Tracker Orange-CMRA. Ce marqueur est perméable à la membrane plasmique des cellules. Une fois incorporé dans le cytoplasme, les enzymes glutathione-S-transférases de la cellule attachent le fluorophore aux groupements thiols des protéines de façon covalente. Le marqueur devient donc séquestré à l'intérieur de la cellule. L'excédent de marqueur est lavé, puis les cellules assujetties à une carence en sérum. Ce traitement induit l'apoptose des cellules endothéliales fluorescentes, ce qui produit des vésicules apoptotiques fluorescentes. De plus, ce fluorophore est stable et au travers de plusieurs générations cellulaires ainsi que dans les vésicules extracellulaires produites par ces mêmes cellules. (Toda, 2012 ; Cho, 2018).

Ainsi, des monocouches de HUVEC ont été exposée à des ApoExo fluorescents jusqu'à 6 heures. Ensuite, la fluorescence des CE a été mesurée par cytométrie en flux et microscopie confocale. Cette mesure permet de conclure que les ApoExo sont internalisés par les CE de façon efficace en fonction du temps et de la concentration. De plus, les micrographies confocales ont permis l'observation de la fluorescence dans le cytoplasme plutôt qu'à la membrane plasmique des

cellules (Figure 14A & 14B). La spécificité du signal fluorescent correspondant aux ApoExo a été vérifiée en deux temps, d'abord par compétition par incubation simultanée avec des ApoExo non-fluorescents et aussi par traitement des ApoExo avec le détergent Triton X-100 (Figure 14C). Ceci confirme que le marqueur fluorescent est bel et bien contenu dans les ApoExo, et que la membrane vésiculaire se doit d'être intacte afin de pouvoir transférer le cargo vésiculaire.

Après, la dépendance énergétique pour l'internalisation a été évaluée par incubation à froid. Pour ce faire, les CE ont été incubées en présence d'ApoExo à 4 °C et 37 °C, résultant en une baisse marquée de l'internalisation dans les conditions froides (Figure 14D). Ceci suggère que l'internalisation des ApoExo est un processus actif initié par la cellule.

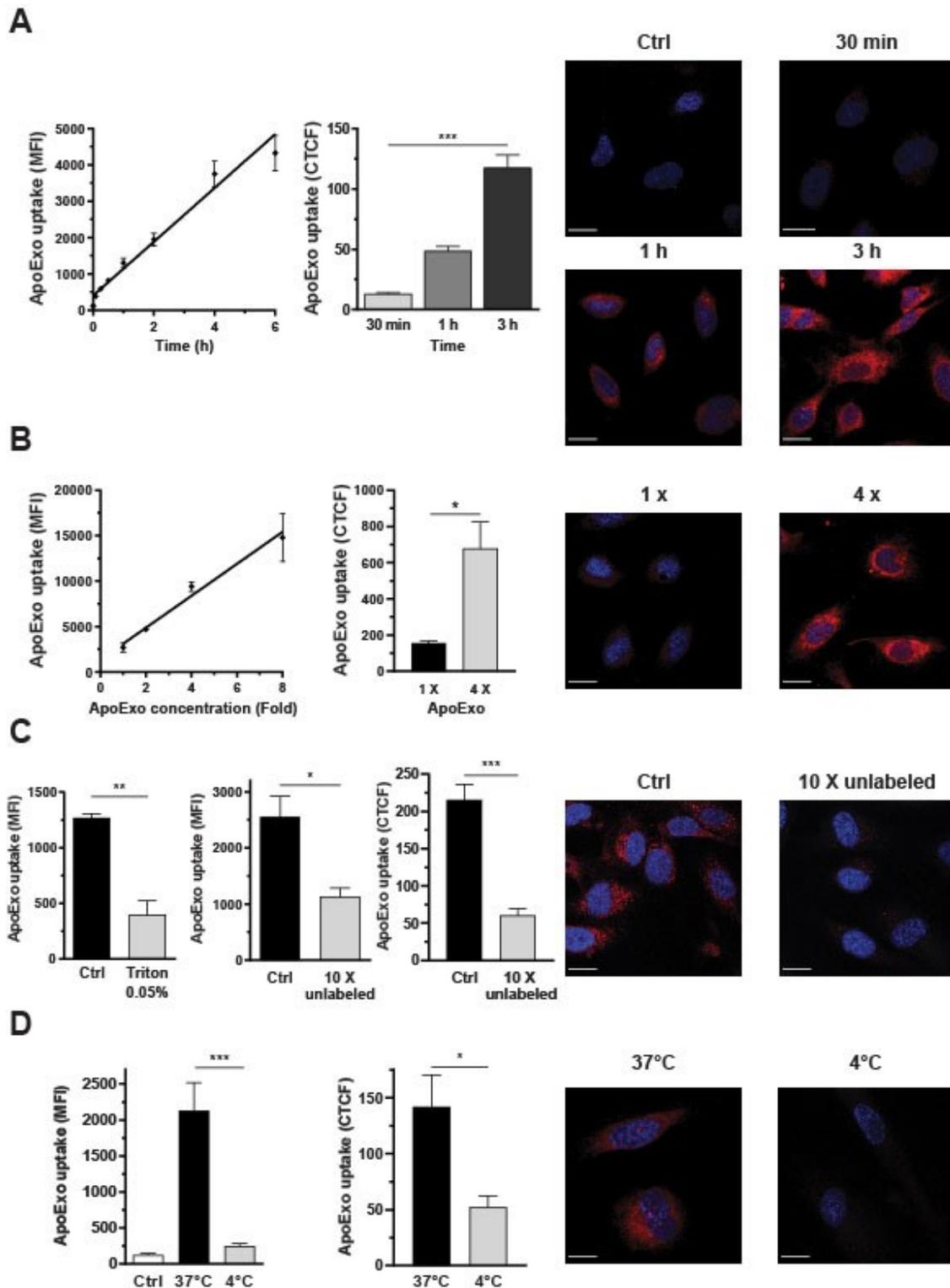


Figure 14. – Les ApoExo sont activement internalisés par un mécanisme dépendant de l'énergie. (A)

Internalisation dans le temps des ApoExo à protéines marquées par les cellules endothéliales en carence de sérum de 1h à 6h. Gauche: Mesure quantitative de l'internalisation des ApoExo par cytométrie de flux. Droite: Mesure semi-quantitative de l'internalisation des ApoExo par microscopie confocale. $n \geq 3$ pour chaque

condition. **(B)** Internalisation en fonction du temps des ApoExo à protéines marquées par les cellules endothéliales carencées en sérum pendant 1h. Gauche: Mesure quantitative de l'internalisation des ApoExo par cytométrie de flux. Droite: Mesure semi-quantitative de l'internalisation des ApoExo par microscopie confocale. $n \geq 3$ pour chaque condition. **(C)** Quantification de l'internalisation des ApoExo par cytométrie de flux (milieu) ou microscopie confocale (droite) chez les cellules endothéliales en carence de sérum traitées aux ApoExo traités au Triton X-100 (gauche) ou un excès d'ApoExo non marqués pendant 1h. $n \geq 3$ pour chaque condition. **(D)** Quantification de l'internalisation des ApoExo par cellules carencées en sérum traitées à 37 °C ou 4 °C pendant 1 h par cytométrie de flux (gauche) ou microscopie confocale (droite). Les expériences de cytométrie de flux sont exprimées en tant que médiane d'intensité fluorescente (MFI) (30,000 événements/échantillon) \pm SEM. Les expériences de microscopie confocale sont exprimée en tant que fluorescence cellulaire totale corrigée (CTCF) \pm SEM. Des images représentatives de l'internalisation des ApoExo par microscopie confocale sont présentées. (Échelle: 20 μ m; rouge – ApoExo et bleu – noyau). Le contrôle (Ctrl) représente les cellules traitées avec le véhicule en carence de sérum. Les valeurs P ont été obtenues par test de Student non-jumelé (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$).

3.3 Les ApoExo sont internalisés par endocytose non-classique.

Étant donnée la dépense énergétique nécessaire à l'internalisation, et afin d'identifier la voie d'entrée des ApoExo, différents mécanismes d'internalisation ont été investigués. D'abord, un mécanisme reconnu pour permettre l'entrée des exosomes, l'endocytose, a été testé (Rikitake, 2018; Tian, 2013; Théry, 2019).

D'abord, l'endocytose dépendante la clathrine a été testée par l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique, la monodansylcadavérine (Guo, 2015). Son utilisation sur les cellules n'a pas réduit le niveau d'internalisation des ApoExo contrairement à la transferrine, une protéine reconnue pour emprunter la voie d'endocytose dépendante de la clathrine (Figure 15A)

Ensuite, l'endocytose dépendante de la cavéoline, un mode bien connu d'endocytose indépendante de la clathrine, a été investiguée. L'extinction génique de la protéine cavéoline-1 n'a pas inhibé l'internalisation des ApoExo (Figure 15B) Cependant, il existe un mécanisme compensatoire entre ces deux voies d'endocytose. Donc, afin d'éliminer ce mécanisme, une protéine en amont de ces deux voies, la dynamine, a été ciblée par extinction génique (Guo, 2015). Cette répression génique n'a pas affecté l'internalisation des ApoExo (Figure 15C). Ces

résultats suggèrent donc que les ApoExo ne sont pas internalisées par les cellules endothéliales via un mode d'endocytose classique.

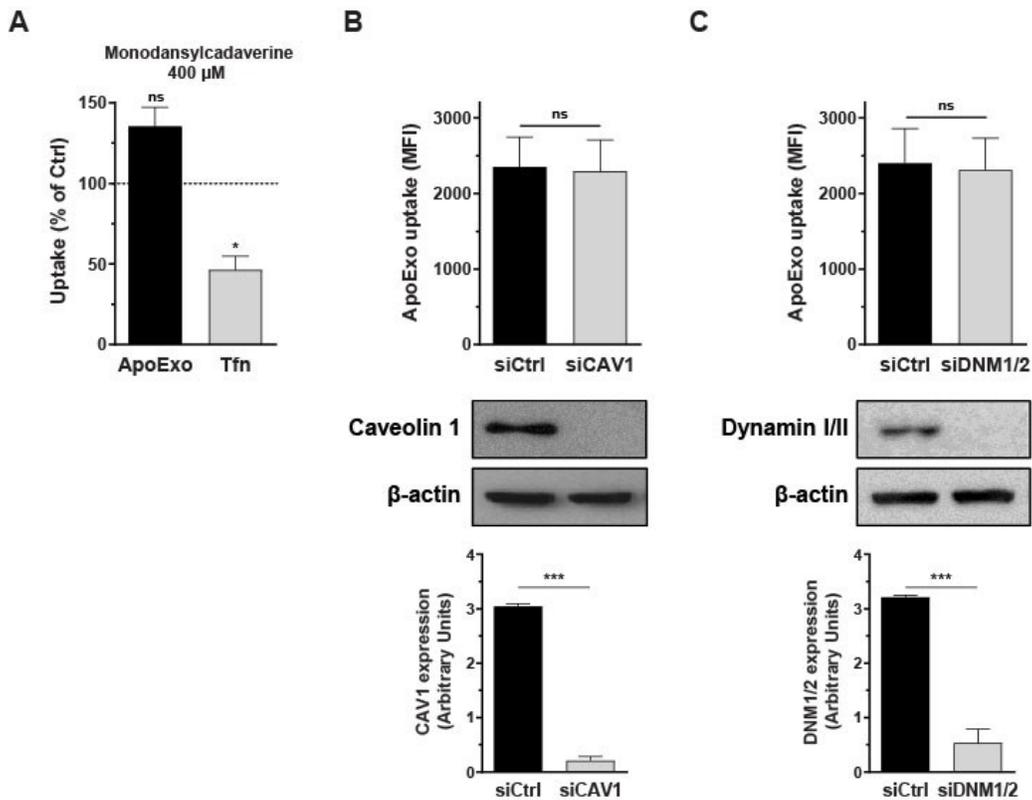


Figure 15. – Les vésicules apoptotiques apparentées aux exosomes sont internalisées par

endocytose non-classique. (A) L'internalisation des ApoExo par les cellules endothéliales est indépendante

de la clathrine. Quantification de l'internalisation des ApoExo et de la transferrine par cytométrie de flux chez les cellules endothéliales carencées en serum prétraitées pendant 30 min avec le véhicule (Ctrl) ou la monodansylcadavérine 400 μ M suivi d'un traitement d'une heure 1 h. n = 3 pour chaque condition.

(B) L'internalisation des ApoExo par les cellules endothéliales est indépendante des caveolae. Des cellules endothéliales en carence de sérum ont été transfectées avec de siARN contrôles ou contre CAV1 (90 nM) puis exposées aux ApoExo marqués pendant 1h. Quantification de l'internalisation par cytométrie de flux. Des immunobuvardages représentatifs de l'extinction de CAV1 sont démontrés. n = 3 pour chaque condition.

(C) L'internalisation des ApoExo par les cellules endothéliales est indépendante de la dynamine. Des cellules endothéliales en carence de sérum ont été transfectées avec de siARN contrôles ou contre DNMI/II (90 nM) puis exposées aux ApoExo marqués pendant 1h. Quantification de l'internalisation par cytométrie de flux. Des immunobuvardages représentatifs de l'extinction de DNMI/II sont démontrés. n = 3 pour chaque condition.

Les expériences de cytométrie de flux sont exprimées en tant que médiane d'intensité fluorescente (MFI) (30,000 événements/échantillon) \pm SEM. Les valeurs P ont été obtenues par un test de Student non-jumelé (* P < 0.05,

** P < 0.01, and *** P < 0.001).

Par conséquent, les modes non-classiques d'endocytose ont fait l'objet des travaux suivants. La molécule M β CD, un inhibiteur des radeaux lipidiques, n'a pas réduit les niveaux d'internalisation des ApoExo lorsqu'il a été utilisé sur les cellules (Figure 16A). Cependant, si cet inhibiteur est a priori exposé aux ApoExo, il permet une réduction efficace de leur internalisation par les CE. Ceci suggère une grande importance accordée à l'intégrité membranaire des ApoExo dans leur processus d'internalisation.

À la suite de ce résultat, la membrane des ApoExo a été la prochaine cible pour déterminer leur mode d'entrée dans les CE. Puisque ces vésicules proviennent de cellules apoptotiques et qu'elles sont capables de lier l'annexine V (AnxV) tel qu'observé dans la Figure 13, l'importance de la phosphatidylsérine (PtdSer) a été évaluée. Les ApoExo traités à l'AnxV, une protéine possédant une haute affinité pour la PtdSer (Andree, 1990), ont démontré des niveaux d'internalisation moindres. À l'opposé, le traitement à l'AnxV sur les cellules avant leur exposition aux ApoExo n'a démontré aucune réduction de l'internalisation. (Fig 16B & 16C). Ces résultats suggèrent non seulement que la PtdSer à la surface des ApoExo est cruciale dans le processus de leur internalisation, mais aussi qu'un récepteur à la surface cellulaire participe à l'internalisation des ApoExo.

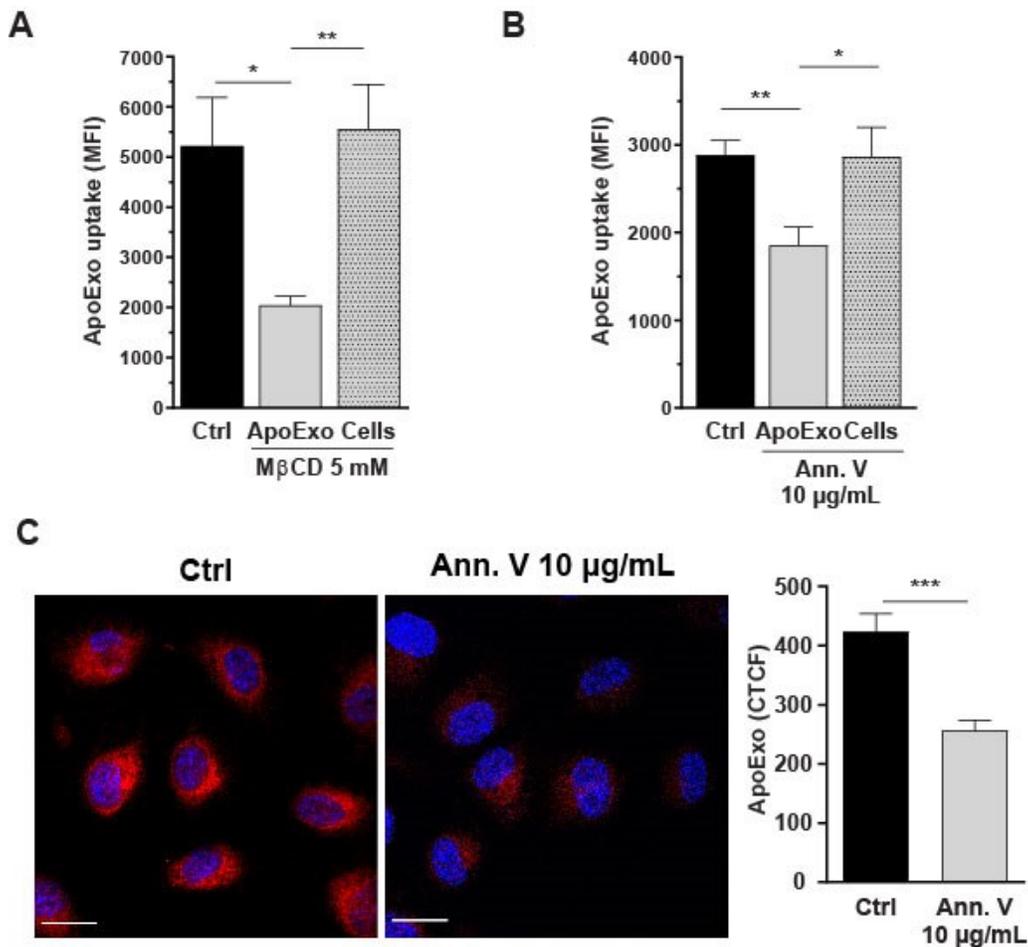


Figure 16. – **L’internalisation des vésicules apoptotiques apparentées aux exosomes est régulée par un mécanisme dépendant de la phosphatidylsérine.** (A) La perturbation de l’intégrité membranaire des ApoExo inhibe leur internalisation. Quantification de l’internalisation des ApoExo par cytométrie de flux chez les cellules carencées en sérum traitées avec le véhicule (Ctrl) ou le MβCD 5 mM. Les ApoExo ont été traités au MβCD 5 mM pendant 1 h puis incubés en présence de cellules carencées en sérum pendant 1 h, ou les cellules ont été prétraitées pendant 1 h au MβCD 5 mM suivi d’une incubation avec ApoExo pendant 1 h sans MβCD. n = 4 pour chaque condition. La séquestration de la phosphatidylsérine à la surface des ApoExo inhibe leur internalisation par les cellules endothéliales. Quantification par cytométrie de flux (B) et microscopie confocale (C) de l’internalisation des ApoExo prétraités pendant 1 h avec le véhicule (Ctrl) ou l’annexine V 10 μg/mL suivi de l’incubation avec cellules carencées en sérum pendant 1 h. n = 5 pour chaque condition. Les expériences de cytométrie de flux sont exprimées en tant que médiane d’intensité fluorescente (MFI) (30,000 événements/échantillon) ± SEM. Les expériences de microscopie confocale sont exprimée en tant que fluorescence cellulaire totale corrigée (CTCF) ± SEM. Des images représentatives de l’internalisation des ApoExo par microscopie confocale sont présentées. (Échelle: 20 μm; rouge – ApoExo et bleu – noyau). Les valeurs P ont été obtenues par test de Student non-jumelé (* P < 0.05, ** P < 0.01, and *** P < 0.001).

3.4 Les cellules endothéliales internalisent les ApoExo par macropinocytose.

Par la suite, d'autres modes d'entrée ont été considérés pour l'internalisation des ApoExo. Parmi les modes d'endocytose considérés non classiques, la macropinocytose est utilisée par les cellules endothéliales dans l'internalisation de composants fluidiques de la matrice extracellulaire, tels des acides aminés libres et de l'ATP extracellulaire (Jin, 2018). Ce mécanisme d'endocytose dépend de la formation de vagues à la membrane plasmique causée par la polymérisation de l'actine. Ces vagues se replient sur elles-mêmes, formant ainsi des vacuoles remplies de liquide extracellulaire (Palm, 2019). La perturbation du cytosquelette d'actine avec l'inhibiteur cytochalasine D a réduit l'internalisation des ApoExo. Ceci a permis de confirmer l'importance de l'intégrité du cytosquelette dans le processus (Fig 17A).

Ensuite, des analyses ultrastructurelles par microscopie électronique ont permis l'étude des dynamiques de la macropinocytose chez des cellules endothéliales au repos et en processus d'internalisation. Ainsi, des signes de macropinocytose ont été observés sous la forme de vagues à la membrane plasmique et la formation de structure similaires à des lamellipodes (Figure 17B). Afin d'investiguer le rôle de la macropinocytose dans l'internalisation des ApoExo, la molécule d'amiloride d'éthyl-isopropyl (EIPA), un puissant inhibiteur de macropinocytose (Ivanov, 2008) a été utilisée sur les CE. Ce faisant, l'internalisation des ApoExo a grandement été réduite (Figure 17C). Enfin, un essai combinatoire avec l'AnxV et l'EIPA n'a pas réduit davantage l'internalisation des ApoExo (Figure S2). Ce résultat suggère alors que la PtdSer et la macropinocytose font partie de la même voie d'internalisation.

Enfin, étant donné que certains agonistes, virus et pathogènes sont capables d'induire leur propre internalisation, la capacité des ApoExo à produire une boucle de rétroactivation en faveur de leur internalisation a été évaluée. Les cellules endothéliales exposées aux ApoExo possèdent un nombre accru de structures similaires à des lamellipodes comparativement aux conditions normales et carencée en sérum. Ces résultats indiquent que la macropinocytose dépendante de la phosphatidylsérine est essentielle dans l'internalisation des ApoExo. En retour, les ApoExo

instaurent une boucle de rétroactivation en favorisant la formation de structures caractéristiques de la macropinocytose.

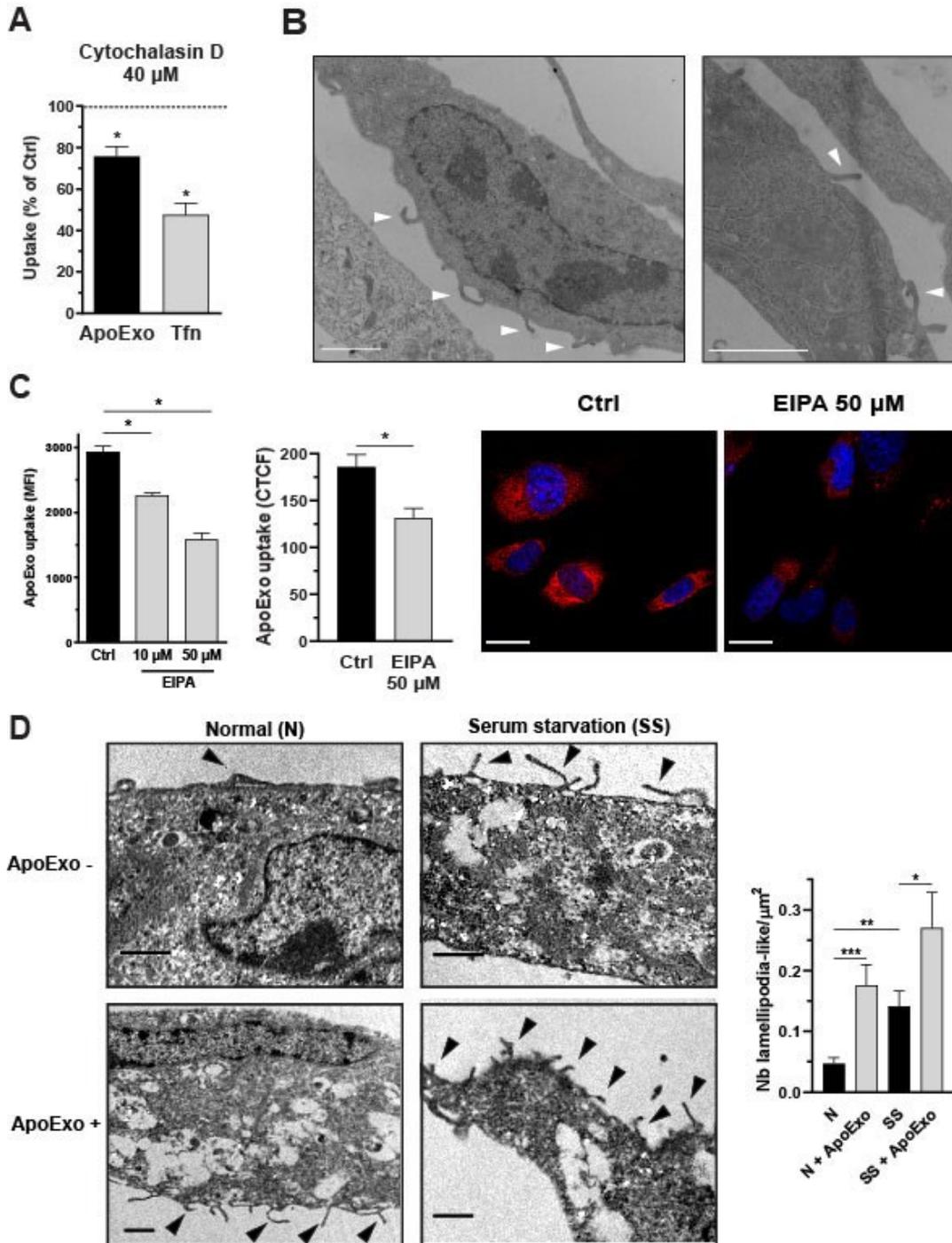


Figure 17. – Les vésicules apoptotiques apparentées aux exosomes sont internalisées par les cellules endothéliales par macropinocytose. (A) L'inhibition de la dynamique du cytosquelette chez les cellules endothéliales a réduit les niveaux d'internalisation des ApoExo. Quantification de l'internalisation des ApoExo et de la transferrine par cytométrie de flux par les cellules endothéliales en carence de sérum avec prétraitement

de 30 min avec le véhicule (Ctrl) ou la cytochalasine D 40 μM suivi d'un traitement d'une heure. $n = 3$ pour chaque condition. **(B)** Les cellules endothéliales démontrent la formation de macropinosomes. Micrographies électroniques représentative montrant la formation de macropinosomes (flèche) chez les cellules endothéliales en carence de sérum pour 2h. (Échelle: 2 μm) $n = 3$. **(C)** L'inhibition de la macropinocytose inhibe l'internalisation d'ApoExo chez les cellules endothéliales. Quantification de l'internalisation des ApoExo par cytométrie de flux (gauche) et microscopie confocale (droite) chez les cellules endothéliales carencées en sérum avec prétraitement de 30 min en présence du véhicule (Ctrl) ou de l'EIPA 10 and 50 μM suivi d'un traitement d'une heure. $n \geq 3$ pour chaque condition. Les expériences de cytométrie de flux sont exprimées en tant que médiane d'intensité fluorescente (MFI) (30,000 événements/échantillon) \pm SEM. Les expériences de microscopie confocale sont exprimées en tant que fluorescence cellulaire totale corrigée (CTCF) \pm SEM. Des images représentatives de l'internalisation des ApoExo par microscopie confocale sont présentées. (Échelle: 20 μm ; rouge – ApoExo et bleu – noyau). **(D)** Le traitement aux ApoExo a induit la formation d'ondulations dorsales (Dorsal ruffles ; flèches) chez les cellules endothéliales en conditions normales et en carence en sérum après 1h. $n \geq 5$ pour chaque condition, d'une seule expérience. Les micrographies électroniques représentatives ont démontré un nombre grandissant de ces structures pour chaque condition. Les expériences de microscopie électronique à transmission ont été exprimées en tant que nombre de structures sur la surface cellulaire \pm SEM. (Échelle: 1 μm). Les valeurs P ont été obtenues par un test de Student non-jumelé (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$).

3.5 Les ApoExo transfèrent leur contenu en ARN aux cellules endothéliales par macropinocytose.

Les exosomes sont reconnus comme transporteur de cargo dans la communication intercellulaire. Ils sont ainsi capables de partager leur contenu en ARNm et miARN avec la cellule réceptrice (Valadi, 2007). Parallèlement, les ApoExo présentent un patron d'expression d'ARNm et miARN distincts des corps apoptotiques et des exosomes classiques (Hardy, 2019). Afin de vérifier l'impact de l'internalisation d'ApoExo sur le transfert d'ARN chez les CE, l'ARN total des cellules productrices d'ApoExo a été marqué par fluorescence.

Ainsi, l'internalisation d'ApoExo à ARN fluorescent démontre des dynamiques similaires à l'internalisation des protéines (Figure 18). Parallèlement, pour savoir si la macropinocytose est essentielle au transfert d'ARN inclus dans les ApoExo, ce mécanisme a été inhibé avec l'EIPA en présence simultanée d'ApoExo à ARN fluorescent. Ce faisant, une inhibition de l'internalisation marquée a été observée, démontrant le rôle primordial de la macropinocytose dans le transfert intercellulaire d'ARN.

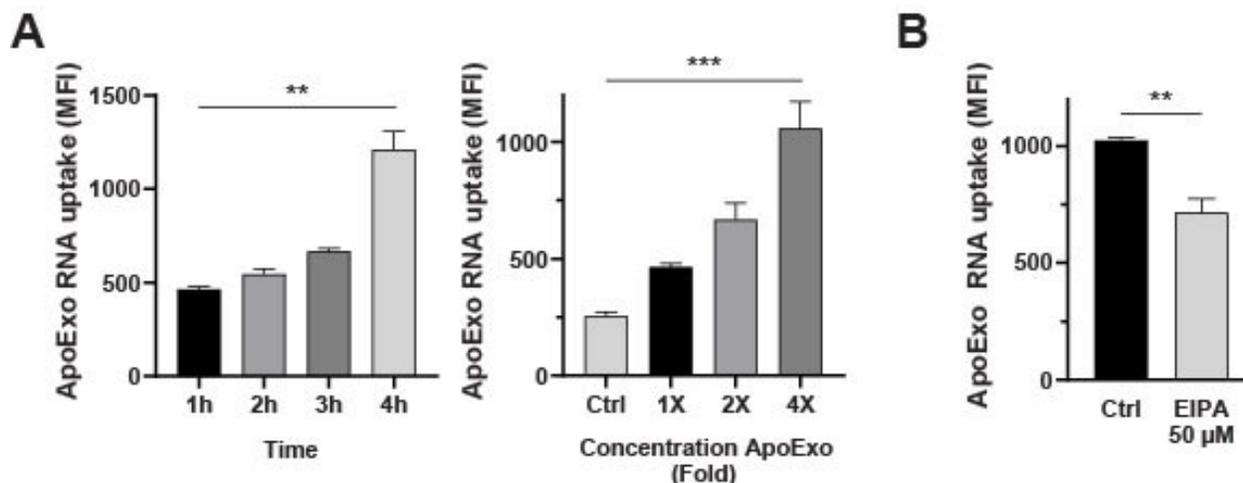


Figure 18. – **Les ApoExo transfèrent de l'ARN aux cellules endothéliales par macropinocytose.** (A)

Mesures quantitative de l'internalisation des ApoExo avec ARN marqué par cytométrie de flux. Gauche: Internalisation dans le temps des ApoExo par les cellules endothéliales carencées en serum de 1h à 4h. Droite: Internalisation des ApoExo par les cellules carencées en sérum pendant 1h en fonction de la concentration d'ApoExo. $n \geq 3$ pour chaque condition. (B) L'inhibition de la macropinocytose diminue les taux d'internalisation des ApoExo par les cellules endothéliales. Quantification de l'internalisation des ApoExo pendant 1h par les cellules endothéliales carencées en sérum en présence du véhicule (Ctrl) ou d'EIPA 50 μ M tel qu'observé par cytométrie de flux. $n \geq 3$ pour chaque condition. Les expériences de cytométrie de flux sont exprimées en tant que médiane d'intensité fluorescente (MFI) (30,000 événements/échantillon) \pm SEM. Les valeurs P ont été obtenues par test Student non-jumelé (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$).

Il est connu que les exosomes classiques peuvent influencer l'expression protéique chez cellules réceptrices par le transfert d'ARN. (Valadi, 2007; Skog, 2008). Nous avons donc évalué cette capacité chez les ApoExo, à savoir s'ils transfèrent des ARNm pouvant être traduits en protéine. Les ARN contenus dans les ApoExo, les corps apoptotiques et les exosomes normaux, ainsi que le transcriptome des CE en conditions normales ou en carence en sérum, ont donc été séquencés.

3.6 Le cargo en ARNm des ApoExo modifie le transcriptome des cellules endothéliales de façon unique

Étant donné la capacité des ApoExo à transférer leur ARN aux cellules endothéliales couplée à leur profil en ARN distinct relevé par Hardy et al, nous avons évalué le potentiel modulateur des ARNm contenus dans les ApoExo. Ainsi, nous avons trouvé que la portion codante de leur transcriptome est effectivement différente des autres exosomes. D'abord, les analyses de regroupement hiérarchique et en composantes principales (PCA) des ARNm codants ont confirmé que les ApoExo expriment un profil d'ARN distincts des corps apoptotiques et des cellules endothéliales (Figure 19A & S3A). Parmi les 430 ARNm exprimés chez les ApoExo (Table S1), seulement 11% du transcriptome des ApoExo est répertorié dans la base de données Exocarta. Parallèlement, 65% de ce même transcriptome est absent de la base de données Vesiclepedia (Figure 19B). Ces résultats renforcent la notion que les ApoExo sont non seulement différents des exosomes classiques, mais aussi comme catégorie de vésicule extracellulaire distincte des corps apoptotiques et présentant un contenu d'ARNm distinct des vésicules extracellulaires répertoriées au sein des banques de données Exocarta et Vesiclepedia.

Ensuite, des analyses de fonctionnalités biologiques ont été effectuées grâce à l'algorithme de Gene Ontology (GO), un organisme reconnu avec une base de données publique incluant les fonctions biologiques et moléculaires de différents gènes et protéines. Cet algorithme a permis d'identifier les fonctions cellulaires potentiellement modulées par le cargo en ARNm des ApoExo (Figure 19C & S3B). De ces fonctions se dégagent la régulation de la dépolarisation de la membrane plasmique, des microtubules du cytosquelette, du chargement de vésicules ainsi que la phagocytose régulée par les IgG.

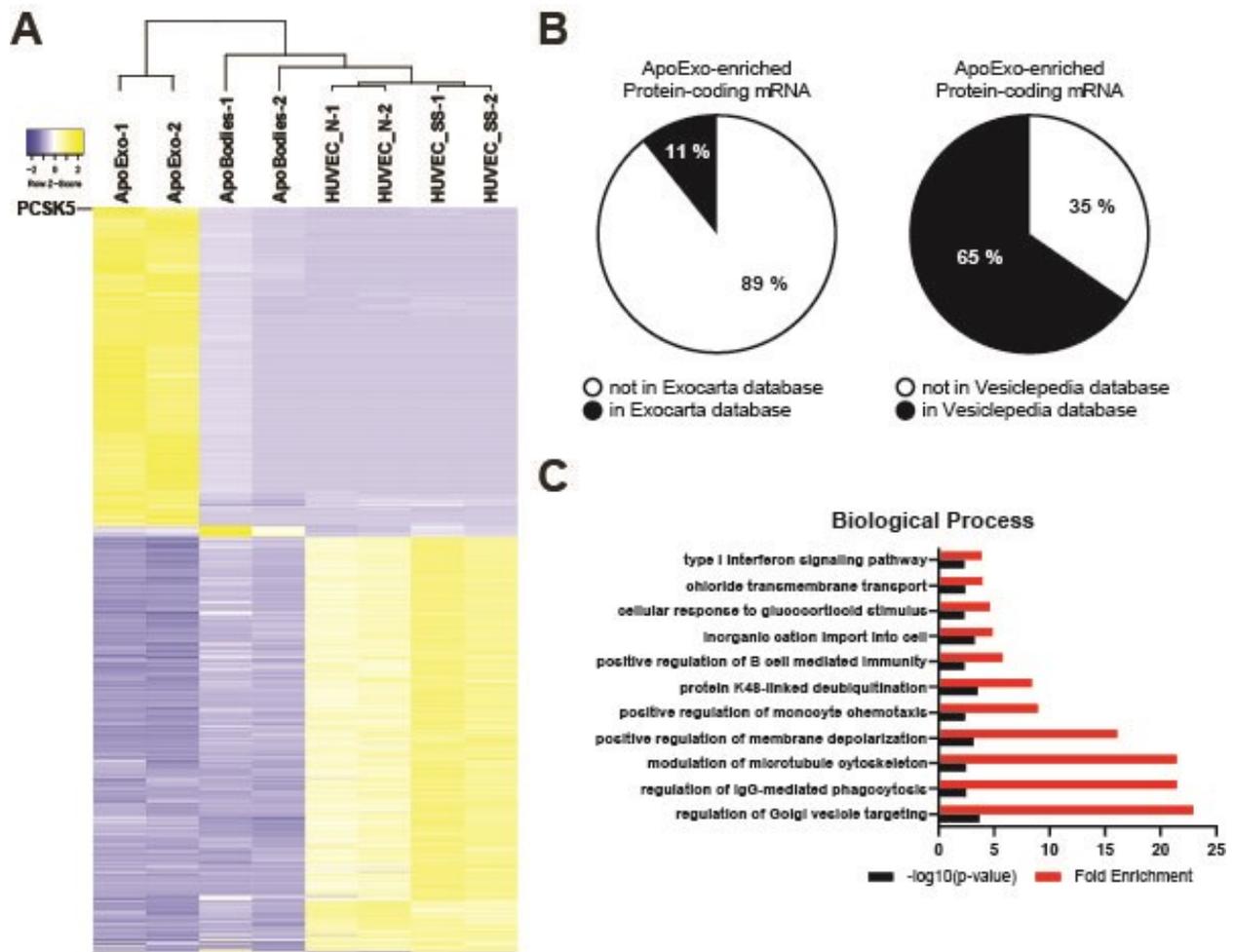


Figure 19. – Les ApoExo expriment un profil d’ARNm spécifique. (A) Représentation par carte de fréquentation des séquences d’ARN codants retrouvées chez les ApoExo, les corps apoptotiques et cellules endothéliales en conditions normales (HUVEC_N) or carencées en sérum (HUVEC_SS); n=2. (B) Analyse des pourcentages des ARNm identifiés dans le transcriptome de ApoExo et présents dans les bases de données Exocarta ou Vesiclepedia. (C) Analyse de Gene ontology des processus biologiques des ARNm enrichis dans les ApoExo. Les termes reliés à la dépolarisation de la membrane, au cytosquelette, à la phagocytose et aux cibles vésiculaires sont enrichis.

De plus, parmi les ARNm enrichis dans les ApoExo, celui codant pour la protéine PCSK5 était le plus enrichi (Figure 7A, Tableau S1). Cet enrichissement a été confirmé par RT-qPCR comparativement aux corps apoptotiques, exosomes normaux et CE en conditions normales ou carencées en sérum. Les niveaux d’ARNm codants pour PCSK5 chez les CE ont augmenté de manière significative à la suite de leur exposition aux ApoExo, mais pas aux ExoN ni aux CA. En

plus, l'inhibition de la macropinocytose à l'aide de la molécule EIPA rétablie les niveaux d'expression de PCSK5 aux niveaux de base (Figure 20A).

Cependant, il se peut que cette augmentation soit causée par une modulation de la transcription à partir de l'ADN nucléaire de la cellule réceptrice plutôt que d'un transfert direct de l'ARNm exosomal. Afin de répondre à cette question, des ApoExo provenant de cellules déplétées en ARNm codant pour PCSK5 (Figure S4A) ont été produits. Ces ApoExo n'ont pas causé l'augmentation en ARNm observée dans les conditions contrôles (Figure 20B). Nous avons aussi évalué la possibilité que l'ARNm des ApoExo, une fois transféré, soit dégradé par la cellule réceptrice. Afin de vérifier l'impact de ce transfert en ARNm codant, les niveaux protéiques de PCSK5 des cellules réceptrices en présence ou non de l'inhibiteur de macropinocytose ont été analysés. Ce faisant, l'exposition de CE aux ApoExo ont augmenté de façon significative l'expression de PCSK5 sous sa forme protéique. De surcroît, l'inhibition de la macropinocytose empêche cette augmentation comparativement au véhicule (Figure 20B & 4SB). Puisque les ApoExo n'expriment pas la protéine PCSK5 (Figure 4SC), ces résultats suggèrent que les ApoExo transfèrent des ARNm codants et fonctionnels aux CE réceptrices. Les ApoExo sont ainsi capables de moduler les niveaux d'expression protéique chez les cellules endothéliales.

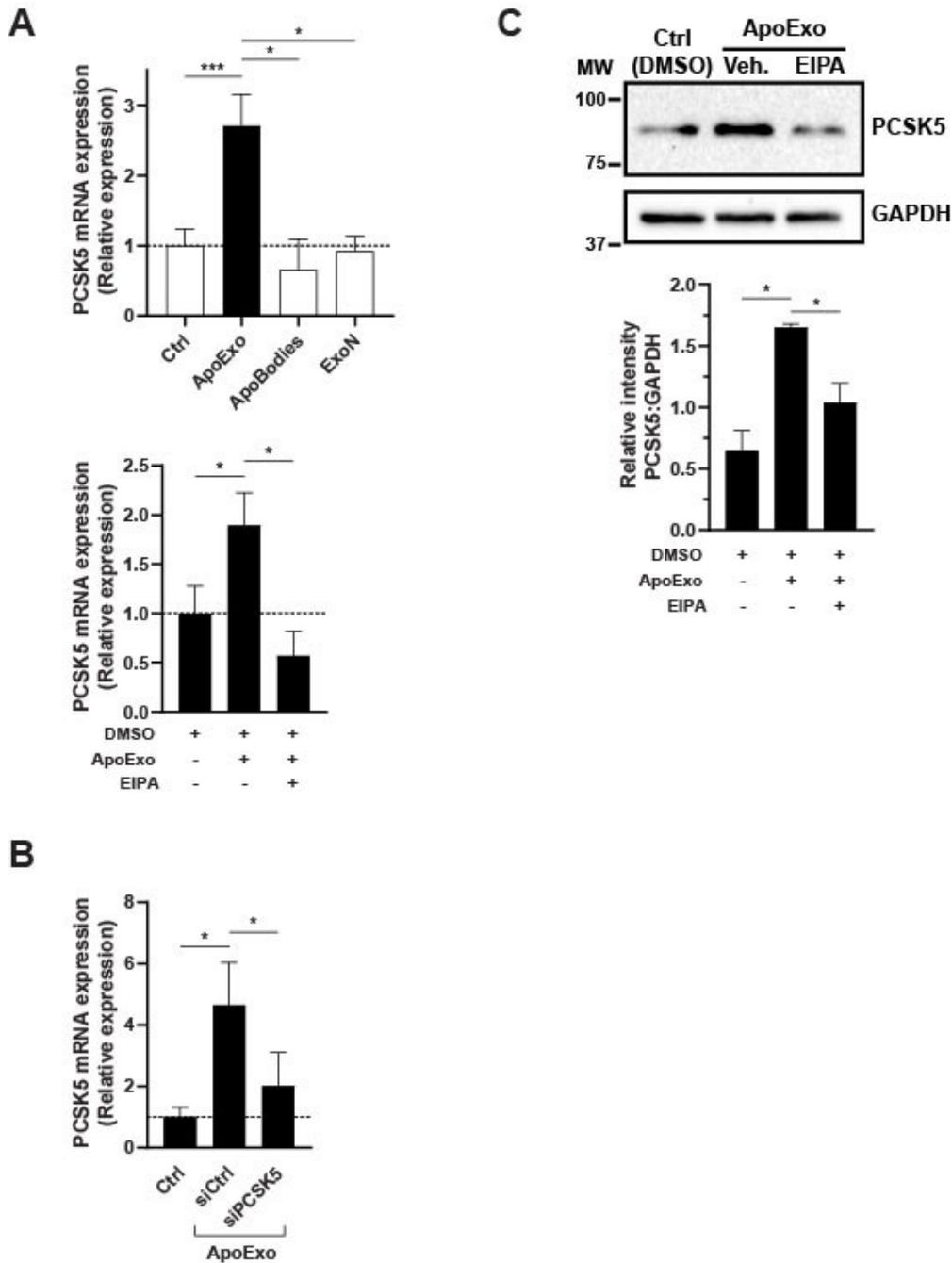


Figure 20. – Les ApoExo transfèrent de l'ARNm fonctionnel et augmente les niveaux d'expression de la protéine PCSK5 chez les cellules endothéliales. (A) L'internalisation des ApoExo augmente l'expression de l'ARNm de PCSK5 chez les cellules endothéliales via la macropinocytose. Les cellules endothéliales ont été traitées avec des ApoExo, des corps apoptotiques (ApoBodies) ou des exosomes normaux (ExoN) pendant 24 h (haut) ou exposées aux ApoExo et DMSO ou ApoExo et EIPA 30µM pour 24h (Bas); n ≥ 3 pour chaque condition. (B) La déplétion de PCSK5 chez les ApoExo inhibe l'augmentation de l'ARNm de PCSK5 chez les cellules réceptrices. Les cellules endothéliales ont été traitées avec ApoExo isolés à partir de cellules

endothéliales transfectée avec du siARN Ctrl ou PCSK5 90 nM ; $n \geq 3$ pour chaque condition. L'expression de l'ARNm PCSK5 a été mesurée par RT-qPCR et présentée en tant qu'expression relative de PCSK5 comparativement aux cellules non-traitées (Ctrl) \pm SEM après normalisation sur HPRT1. (C) L'internalisation des ApoExo par macropinocytose augmente l'expression de la protéine PCSK5. Les cellules endothéliales ont été exposée au véhicule (Ctrl - DMSO), aux ApoExo avec véhicule (ApoExo + DMSO) ou aux ApoExo + EIPA 30 μ M (ApoExo + EIPA) pour 24 h. L'expression de PCSK5 a été quantifiée par densitométrie et exprimée en tant qu'unité arbitraire \pm SEM; $n \geq 3$. Des images représentatives d'immunobuvardage sont incluses. Les valeurs P ont été obtenues par test de Student non-jumelé (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$).

Chapître 4 – Discussion

4.1 Les vésicules apoptotiques apparentées aux exosomes diffèrent des corps apoptotiques et des autres exosomes par leur biogenèse et contexte cellulaire particulier

L'apoptose a longtemps été décrite comme un mécanisme menant à la formation de corps apoptotiques dont l'élimination par des phagocytes professionnels est tolérogénique et anti-inflammatoire. Parallèlement, les ApoExo, produits dans le même contexte, ne sont toujours pas bien caractérisés, et leur mode d'internalisation encore mal compris. Malgré la similitude entre les ApoExo et les exosomes classiques, ces derniers reconnus pour être internalisés par différents types cellulaires, les ApoExo présentent des caractéristiques qui les distinguent autant des corps apoptotiques que des exosomes classiques.

Au cours de ces travaux, j'ai démontré que les ApoExo sont internalisés par les cellules endothéliales par macropinocytose, normalement une voie d'entrée considérée comme complémentaire à l'endocytose classique. Ce faisant, Les ApoExo augmente leur propre taux d'internalisation en favorisant la formation de lamellipodes, structures essentielles à la macropinocytose, à la surface de la cellule réceptrice. Une fois internalisés, les ApoExo modulent le transcriptome et le protéome de la cellule réceptrice. Par la suite, j'ai aussi démontré que l'ARNm codant pour la protéine PCSK5, soit l'un des ARNm hautement enrichis dans les ApoExo, est fortement exprimé dans la cellule réceptrice. L'expression de cet ARNm n'est cependant pas modulée par les corps apoptotiques ni les exosomes normaux. Finalement, l'augmentation des niveaux d'expression de PCSK5, qu'il s'agisse de l'ARNm ou de la protéine, est prévenue par l'inhibition pharmacologique de la macropinocytose avant et pendant l'exposition aux ApoExo.

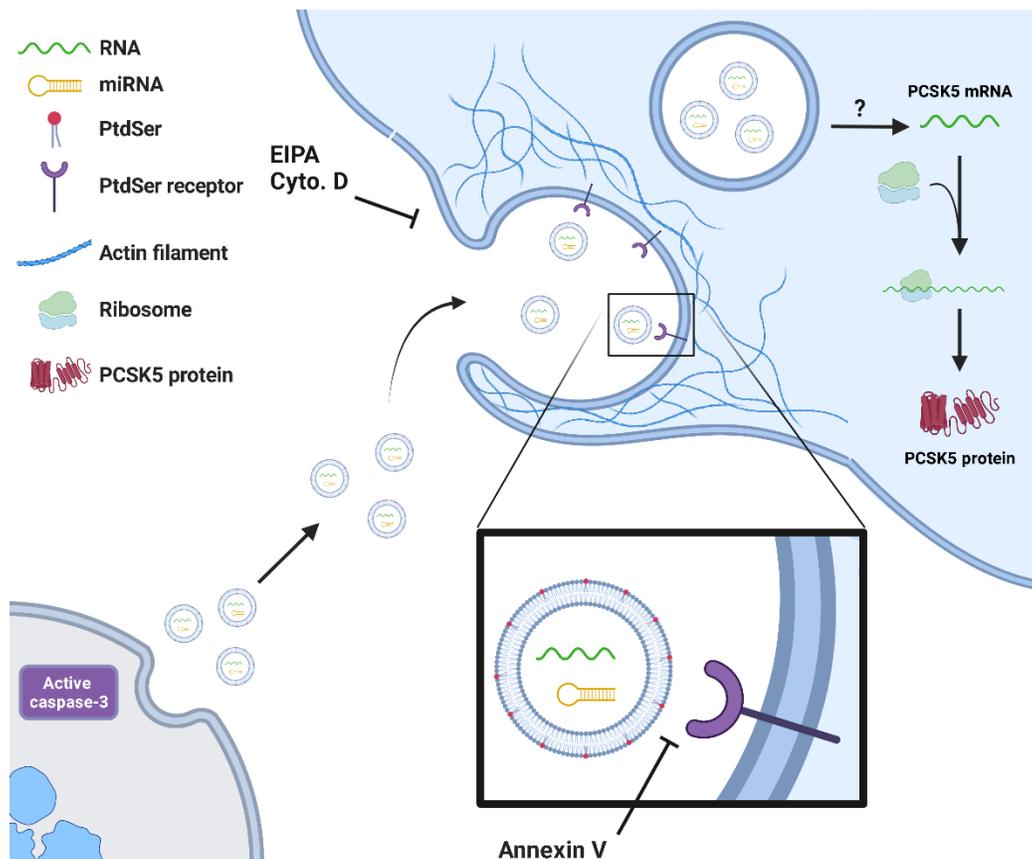


Figure 21. – **Schématisation des ApoExo transférant des ARNm fonctionnels aux cellules endothéliales par macropinocytose dépendante de la phosphatidylsérine.** Suite à l'activation de la caspase-3, les cellules endothéliales relarguent des ApoExo dans le milieu extracellulaire. Une cellule endothéliale avoisinante peut alors capter les ApoExo riches en phosphatidylsérine, processus inhibé par l'Annexin V. La cellule endothéliale réceptrice internalise les ApoExo par macropinocytose. Les inhibiteurs EIPA et Cyto. D réduisent les niveaux d'internalisation des ApoExo. Une fois dans le macropinosome, l'ARNm de PCSK5, l'ARNm le plus enrichi chez les ApoExo, échappe à la dégradation lysosomale et augmente l'expression de sa protéine dans les cellules endothéliales. Schéma obtenu grâce au logiciel en ligne BioRender.

4.1.1 Le cargo d'acides nucléiques des ApoExo diffère des exosomes classiques par le contexte apoptotique

Nonobstant leur mode de formation, il n'en demeure pas moins qu'ils possèdent la capacité d'être internalisés par les cellules endothéliales. Cette internalisation mène non seulement à des

changements phénotypiques (Migneault, 2020), mais aussi à la modulation du transcriptome et du protéome des cellules réceptrices et ce, de façon différente des exosomes classiques et des corps apoptotiques.

Les données suggèrent que les ARNm contenus dans les ApoExo, comme celui codant pour PCSK5, est transféré aux cellules endothéliales à des fins de traduction. Dans le but de vérifier cette hypothèse, une construction génique d'un marqueur exogène menant à l'expression d'une protéine recombinante (par exemple l'ajout d'un épitope viral) pourrait être effectuée puis transfectée aux cellules productrices d'ApoExo. Si le transfert de cet ARNm codant recombinant mène à l'expression protéine recombinante, nous pourrions conclure que l'ARN des ApoExo est traduit par la cellule réceptrice.

Parallèlement, il se peut que les ApoExo modulent l'expression de la protéine PCSK5 chez la cellule réceptrice par d'autres méthodes. Dans ce cas, deux scénarios sont de mise. D'un côté, les ApoExo pourraient contenir ou activer des facteurs de transcription favorisant l'expression de PCSK5, soit directement ou par l'entremise de récepteurs intracellulaires. Par exemple, les ApoExo modulent l'activité des facteurs de transcriptions NF- κ B et KLF4 chez les cellules endothéliales réceptrices (Migneault, 2020). Il se pourrait donc que la modulation de l'expression de l'ARNm codant pour PCSK5 chez les cellules endothéliales soit causée par un processus similaire. Cependant, cela semble peu probable puisque la déplétion de l'ARNm codant pour PCSK5 dans les cellules productrices des ApoExo ne module pas son expression dans les cellules réceptrices.

D'un autre côté, il se peut que les ApoExo agissent de façon post-transcriptionnelle sur l'expression de PCSK5, étant donné leur gabarit d'ARN non-codant. Effectivement, les miARN et ARN longs non-codants sont reconnus pour affecter les taux de traduction des ARNm (Kopp & Mendell, 2018). Des études d'enrichissement et de fonction des ARN non-codants similaires à celles des ARNm serviraient à mieux comprendre leurs impacts sur le phénotype endothélial.

Malgré leurs patrons de protéines et d'ARNm distincts des autres types de vésicules extracellulaires, les mécanismes de chargement des ARN, et donc de l'enrichissement de ce gabarit d'ARNm particulier au ApoExo, est encore inconnu. D'une part, puisque les cellules productrices d'ApoExo sont en processus apoptotique, leur protéome et transcriptome s'en

voient modifiés. Ceci change la population d'ARN disponibles pour le chargement dans les vésicules extracellulaires. D'autre part, la disponibilité des protéines responsables de ce chargement d'acide nucléique est aussi modifiée. Or, il est probable que ces deux altérations parallèles, causée par le changement de phénotype cellulaire, modifient la dynamique d'interaction et de chargement des protéines et des acides nucléiques dans les vésicules. Des études sur cette différence de chargement de cargo protéique et génétique aideraient à cibler les mécanismes différentiels lors de l'apoptose.

4.1.2 Exploration du lien entre la biogenèse et incorporation des marqueurs protéiques connus

Les ApoExo sont générés à partir des autolysosomes de cellules apoptotiques et sont relâchés dans le milieu extracellulaire à la suite de la fusion de cet autolysosome avec la membrane plasmique, un processus dépendant de la caspase-3 (Beillevaire, 2022). Cependant, leur mécanisme de biogenèse est encore inconnu. Afin de mieux définir leur formation, des expériences complémentaires seraient nécessaires, particulièrement celles ciblant certains modes de formation de vésicules intraluminales décrits dans la section d'introduction. Par exemple, il serait intéressant d'évaluer l'implication du marqueur protéique synthénine des ApoExo dans la formation d'ILVs. De plus, un des marqueurs des ApoExo est le fragment LG3 du perlécan. Or, l'héparanase non seulement participe à la formation de vésicules intraluminales (*voir section 1.2.3.1*), mais est aussi impliqué dans la préparation de l'héparan sulfate au clivage par les cathepsines, et donc de la libération du LG3 à partir du perlécan, lors du processus autophagique. Ce mode de formation expliquerait la présence du fragment LG3 dans les ApoExo.

Sinon, étant donné leur provenance des autolysosomes, il est possible que l'autophagie soit impliquée dans leur export puisque le complexe ATG12-ATG3 est une signature d'export d'ILVs (Guo, 2017). La dégradation et le recyclage des nutriments est intrinsèque au processus autophagique. C'est donc dire que les composantes des ApoExo seraient dégradées avant leur export. Or, à la suite de l'activation de la caspase-3, les ApoExo sont relargués par la cellule. Dans ce contexte, l'autophagie aurait un rôle régulateur dans la production des ApoExo,

potentiellement grâce au complexe ATG12-ATG3 (Parbin & Gross, 2020). Ce dynamisme entre deux procédés antagonistes – survie et mort – serait témoin d'un processus hautement régulé, et donc essentiel à l'homéostasie.

4.1.3 Le cargo spécifique d'ARNm des ApoExo semble échapper à la dégradation lysosomale avant de moduler le phénotype cellulaire

Les ApoExo, tout comme les exosomes classiques, sont une composante essentielle dans la communication intercellulaire par leur capacité à transférer des acides nucléiques aux cellules réceptrices. Alors que la plupart des études sur les exosomes se concentrent sur l'impact de miARN, les résultats présentés plus haut démontrent que les ApoExo sont aussi enrichis en ARNm codants. En effet, la majorité des ARNm identifiés dans le cargo des ApoExo ne sont pas enregistrés dans les bases de données en ligne Exocarta et Vesiclepedia. De manière intéressante, les fonctions biologiques, établies par l'analyse des termes GO, qui sont modulées par ces ARNm comprennent la régulation de canaux ioniques, la dépolarisation de la membrane plasmique et la réorganisation du cytosquelette, tous essentielles à la formation de macropinosomes (Zeziulia, 2022). Cela suggère un rôle potentiel des ApoExo dans l'augmentation de l'activité de macropinocytose, concordant avec l'augmentation de structures en lamellipode observée (Fig 17D)

4.1.3.1 Exploration des mécanismes d'échappement endosomal

Une fois internalisés, les ApoExo semblent en mesure de traverser la membrane endosomale et de libérer leur cargo d'ARNm dans le cytosol. Cependant, même si les macropinosomes naissants permettent la distribution de contenu vésiculaire à la voie endosomale, les macropinosomes matures sont généralement dédiés à la dégradation par la fusion avec des lysosomes (Saric, 2020). Les résultats présentés dans cet ouvrage suggèrent que l'ARNm le plus enrichi dans les ApoExo, soit l'ARNm codant pour la protéine PCSK5, échappe à la dégradation lysosomale et mène à l'augmentation de l'expression de la protéine.

Parmi les méthodes d'échappement endosomal connus, la présence de peptides fusogéniques semble peu probable. Lors de l'acidification de l'endosome mature, certains peptides sont capables de fusionner la membrane des vésicules endocytosées avec la membrane de l'endosome. Ce phénomène relâcherait donc le cargo vésiculaire dans le cytosol. De façon similaire, la rupture de la membrane endosomale permettrait effectivement au cargo des ApoExo d'échapper à la dégradation. La résultante de ces voies serait une diffusion du contenu endosomal dans le cytosol. Or, une concentration périnucléaire du signal fluorescent est observée par microscopie confocale chez les cellules endothéliales exposées aux ApoExo dont les protéines ont été marquées par fluorescence. Cette observation rend la possibilité de fusion par peptide ou la rupture de la membrane peu probable.

La présence de peptides amphiphiliques formant des pores à la membrane de l'endosome est plus intéressante. Ces pores en forme de baril ont une dimension définie et une certaine affinité pour des protéines de transport. Ainsi, les protéines responsables du chargement des ARNs – messagers et autres – dans les ApoExo pourraient aussi être impliquées dans l'export à partir de l'endosome jusqu'au cytosol. De plus, cette spécificité de sortie de l'endosome non seulement séquestrerait les protéines trop volumineuses à l'intérieur de l'endosome, mais empêcherait aussi la diffusion libre du cargo dans le cytosol, ce qui expliquerait la concentration de fluorescence de façon périnucléaire observée dans les images de microscopie confocale.

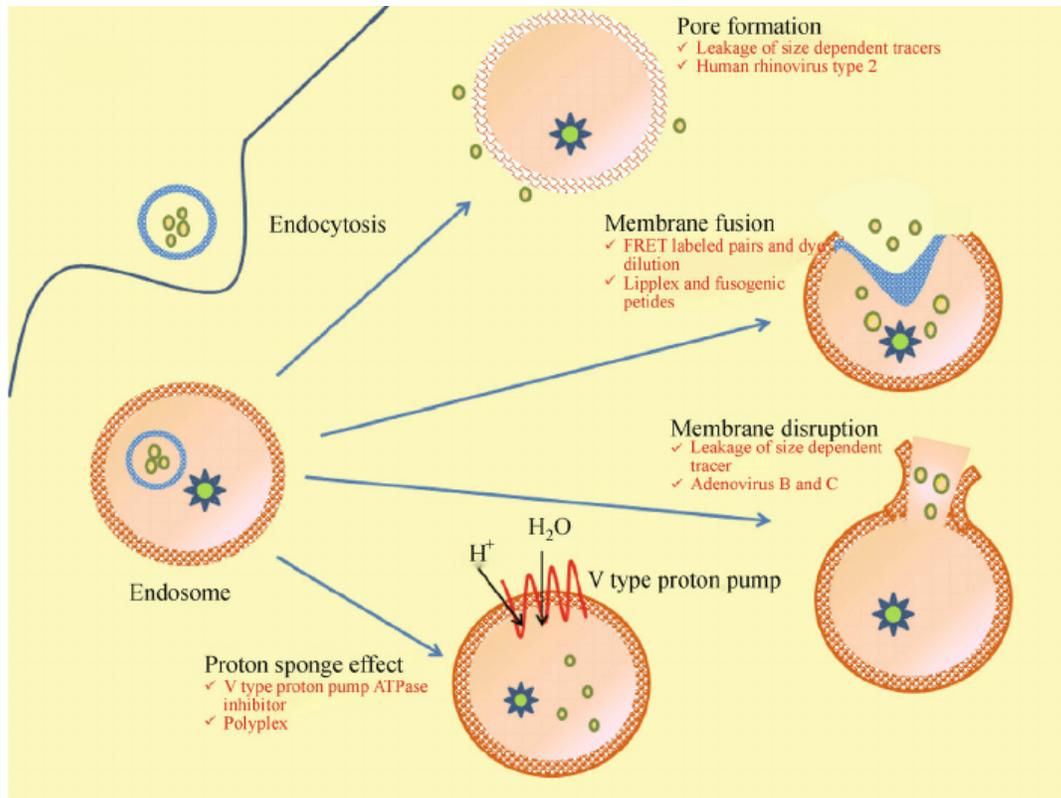


Figure 22. – **Schématisation des méthodes d'échappement endosomal.** La formation de pore mène au relargage sélectif de cargo dans l'espace intracellulaire. Ce mode d'échappement est visualisable avec la détection de molécules de petites et grandes tailles dans le cytosol et l'endosome, respectivement. Il s'agit aussi du mode d'échappement utilisé par le rhinovirus humain de type 2. La fusion vésiculaire fait appel à des peptides fusogéniques qui force la proximité des membranes vésiculaires et endosomales. La fusion relargue le contenu de la vésicule qui fusionne avec l'endosome. Ce type d'échappement endosomal est caractérisé par la dilution dans le cytoplasme du colorant incorporé dans les vésicules. La lyse membranaire relâchent l'entièreté du contenu dans le cytosol, incluant les molécules de grandes tailles. Les adénovirus B et C utilisent ce mode d'échappement. Autrement, des pompes à protons peuvent favoriser l'import d'eau dans l'endosome par osmolarité, jusqu'à la rupture de la membrane endosomale. Adapté de [Mundra & Mahato, 2014](#). Licence obtenue via CCC-RightsLink.

Une autre possibilité à investiguer est la distribution du cargo des ApoExo une fois échappé à la dégradation. Effectivement, les ARNm, nécessitant plusieurs étapes de maturation avant d'être prêts à la traduction en protéines, pourraient être redirigés dans plusieurs compartiments une fois dans le cytosol. Par exemple, les ARNm prêt à la transcription pourraient passer à la traduction par les ribosomes au réticulum endoplasmique. À cette fin, il faudrait cependant que les facteurs d'initiation à la traduction y soient recrutés avant de procéder au recrutement des

ribosomes. Sinon, les ARNm peuvent aussi être stockés dans des structures granulaires appelées corps P - P bodies en anglais - pour utilisation future (Luo, 2018; Chantarachot, 2018). De façon similaire, les autres types d'ARN répertoriés par Hardy *et al*, incluant les miARN et les ARN longs non-codant, sont libres d'interagir avec leurs cibles, jouant sur l'expression de protéines. Des études de fonctions de ces autres types d'ARN seront de mise afin d'identifier leurs rôles sur le phénotype cellulaire des cellules réceptrices.

Bref, des études supplémentaires seront nécessaires afin de caractériser le trafic intracellulaire de ces ARN à la suite de l'internalisation d'ApoExo. Les résultats de ce mémoire montrent clairement le transfert des ARNm enrichis dans les ApoExo vers les cellules endothéliales, ce qui impacte leur patron d'expression protéique. De plus, puisque les ApoExo contiennent un cargo en ARNm distincts des autres vésicules extracellulaire, ils ont le potentiel de moduler de façon distinctive l'expression de protéines, et donc la fonction endothéliale. De plus, les ApoExo augmentent le nombre d'événements de macropinocytose à la surface des cellules endothéliales, suggérant leur capacité à établir une boucle de rétroactivation vis-à-vis leur internalisation, et donc le transfert de leur cargo.

4.2 Les ApoExo exploitent une voie d'endocytose considérée complémentaire et favorisent leur propre internalisation

D'une autre coté, les modes d'endocytose dits classiques sont les voies principales d'internalisation des vésicules extracellulaires. Plusieurs de ces voies sont empruntées par les exosomes, parmi lesquelles celles dépendantes de la clathrine ou des cavéolines sont des mieux définies (Ginini, 2022). Malgré la reconnaissance croissante de la contribution de la macropinocytose à l'internalisation de vésicules, cette voie est généralement considérée comme accessoire aux voies classiques (Javeed, 2015; Kanno, 2020 ; Costa Verdara, 2017; Tu, 2021).

4.2.1 Exploration des limites expérimentales des inhibiteurs spécifiques d'endocytose

De façon intéressante, l'activité de macropinocytose des cellules endothéliales est augmentée lors de l'inhibition de l'endocytose dépendante de la clathrine. Ceci explique l'augmentation

d'internalisation observée à la suite de l'inhibition de la formation des puits enrobés de clathrine par la monodansylcadavérine (Figure 15A). Sinon, malgré leur fonction, les inhibiteurs pharmacologiques sont reconnus pour agir sur plusieurs voies de signalisation. Par exemple, la monodansylcadavérine agit sur la voie de signalisation WNT (Rim, 2020) qui est importante chez les cellules endothéliales, particulièrement pour l'angiogenèse (Manukjan, 2020). Il est connu qu'une communication croisée (cross-talk) en faveur de la CME est établie à la suite de l'inhibition des caveolae. Or, on ne remarque pas d'augmentation de l'internalisation contrairement à l'inhibition de la CME discutée ci-haut. Ceci suggère que le mécanisme de compensation des voies de la clathrine par les caveolae (et vice-versa) n'est pas en cause pour les niveaux stables d'internalisation des ApoExo.

4.2.1.1 La fusion vésiculaire n'est probablement pas impliquée dans le transfert du cargo des ApoExo aux cellules endothéliales

Outre l'endocytose, les vésicules extracellulaires peuvent aussi fusionner avec les cellules réceptrices à l'aide de protéines SNAREs, tel que décrit dans l'introduction. Cependant, les données de séquençage protéique ne contiennent pas de protéines appartenant à cette famille de récepteurs vésiculaires. Malgré l'absence de détection de ces protéines, on ne peut pas éliminer des voies possibles de transfert de cargo. Cependant, la fusion vésiculaire spontanée est un événement extrêmement rare seulement possible sous certaines conditions. Par exemple, les signatures lipidiques des deux membranes se doivent d'être similaires en plus d'être libre d'interagir l'une avec l'autre. C'est donc dire qu'il y aurait une absence de récepteur et autres protéines à la surface cellulaire pouvant empêcher le contact de la vésicule avec la cellule.

De plus, une fusion implique une diffusion du cargo vésiculaire dans l'espace cellulaire. Or, ses essais d'internalisation par transfert de fluorescence démontrent une concentration périnucléaire du signal fluorescent. Ceci concorde avec la voie de transport rétrograde d'endosomes vers le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Afin de le confirmer, des études de maturation et fragmentation des endosomes contenant les ApoExo sont à prévoir. Somme toute, il est improbable que les ApoExo puissent transférer leur contenu en fusionnant avec la cellule réceptrice par ces mécanismes de fusion.

4.2.2 Exploration du rôle de la phosphatidylsérine dans l'internalisation des ApoExo

Les résultats démontrent que non seulement les modes d'endocytose classiques ne sont pas impliqués dans l'internalisation des ApoExo, mais aussi que la macropinocytose en remplit le rôle principal. Ainsi, ces études apportent un point de vue nouveau sur l'internalisation des ApoExo, supportant de même coup la notion que les ApoExo sont différents des autres types de vésicules.

Cela étant dit, les ApoExo ainsi que les corps apoptotiques sont impliqués dans des voies d'internalisation dépendante de la PtdSer. Ces derniers sont éliminés par les phagocytes professionnels à l'aide de récepteurs non-opsoniques de la PtdSer, telle la superfamille de récepteurs TIM (Kobayashi, 2007; Albacker, 2010). La question se pose alors, à savoir si les ApoExo sont internalisés de façon similaire, ou si un mécanisme indépendant de récepteurs est en cause.

D'une part, cette même famille de récepteurs est présente chez les cellules endothéliales. Cependant, l'inhibition de l'expression de ces récepteurs par extinction génique n'a pas réduit l'internalisation des ApoExo (données non affichées). Étant donné leur taille, il se pourrait que le signal de quelques ApoExo soit insuffisant pour recruter les éléments cellulaires nécessaires à la formation d'un phagosome chez un phagocyte non-professionnel comme les cellules endothéliales (Arandjelovic, 2015). Sinon, la liaison des ApoExo aux récepteurs de PtdSer pourrait induire la macropinocytose chez les cellules endothéliales, de manière similaire à l'induction de la phagocytose chez les phagocytes.

D'autre part, le blocage de la PtdSer à la surface des ApoExo via l'AnxV est efficace pour réduire leur internalisation. Cependant ce blocage ne permet que de réduire de moitié le niveau d'internalisation tout au plus. Ceci peut être expliqué en deux temps. D'abord, l'hétérogénéité des ApoExo pourrait être en cause. En effet, ce n'est pas tous les ApoExo qui expriment la PtdSer. Il se peut donc que la proportion dénudée de PtdSer soit internalisée par macropinocytose, ou un autre mécanisme toujours inconnu. Nous pourrions le vérifier en triant les vésicules selon la méthode établie à la figure 13. Les mêmes essais d'inhibition pourraient être effectués en prenant la fraction positive pour l'AnxV, et donc pour la PtdSer. Ainsi, une inhibition plus importante des niveaux d'internalisation supporterait l'hypothèse ici posée. Ensuite, le modèle expérimental a

ses limites par l'ajout même de l'AnxV. Étant donnée la petite taille des ApoExo (<1µM), l'ajout de plusieurs molécules d'annexine V à chaque vésicule augmenterait leur taille de façon considérable. De ce fait, un nombre moins important d'ApoExo sont internalisés à chaque événement de macropinocytose.

4.2.2.1 Exploration de l'action des ApoExo sur l'activité macropinocytique de différents types cellulaires

Les cellules possédant des niveaux de base de macropinocytose seraient en mesure d'internaliser les ApoExo. Il serait donc intéressant de voir l'effet des ApoExo sur différents types cellulaires, plus particulièrement chez ceux potentiellement impliqués dans les effets observés *in vivo*.

Par exemple, les autres cellules du système vasculaire, tels les fibroblastes, sont aussi capables de macropinocytose. De façon intéressante, les fibroblastes déposent moins de collagène dans l'interstitium du système cardiovasculaire (Marchesi, 2011) en absence de PCSK5. L'internalisation d'ApoExo par les fibroblastes pourrait alors mener à une surexpression de PCSK5, et donc d'un dépôt additionnel de collagène, menant à l'installation de fibrose interstitielle.

Autrement, certaines cellules immunitaires, comme les macrophages, performant deux types distincts de macropinocytose (*voir section 1.3.3.4.1*), chacun porté vers une fonction précise. La macropinocytose apicale servant de senseur migratoire, les ApoExo pourraient aider au recrutement des macrophages au site d'injure. D'ailleurs, une des fonctions des termes GO relevés à la Figure 7C est le taxisme positif des monocytes, précurseurs des macrophages. Sinon, la macropinocytose dorsale, orientée vers la signalisation cellulaire, pourrait aider à la production de cytokines pro- ou anti-inflammatoires, ou même à la préparation et la présentation de l'antigène LG3 contenu dans les ApoExo

Néanmoins, l'incapacité d'inhiber complètement cette internalisation en bloquant la macropinocytose justifie de futures études afin d'identifier des voies alternatives au transfert de cargo.

4.2.2.2 Exploration des mécanismes d'action des ApoExo sur l'activité macropinocytaire chez les cellules endothéliales

Même si l'induction de la macropinocytose par les ApoExo est indéniable, il n'en demeure pas moins que le mode d'action de leurs composantes n'est pas encore défini. Des études sur les voies de signalisation menant au recrutement et à l'activation des protéines responsables de la formation des structures ressemblant à des lamellipodes seraient nécessaires. Dans le but de mitiger leurs impacts néfastes sur l'organisme, il sera intéressant de savoir à quelles étapes de la formation de lamellipodes les ApoExo interviennent. Par exemple, les données de protéomique (Dieudé, 2015) montrent que les ApoExo expriment des niveaux élevés de SDF-1 et de EGF, tous deux reconnus pour augmenter l'activité de macropinocytose chez les cellules endothéliales (Tanaka, 2012; Recouvreux, 2017). Cependant, une telle régulation de la macropinocytose par les facteurs SDF-1 et EGF serait possible seulement via des récepteurs intracellulaires favorisant la présence des éléments essentiels de la macropinocytose à la membrane plasmique.

Sinon, l'implication d'un récepteur de la PtdSer dans l'induction de la macropinocytose est à considérer. Même si l'extinction génique de certains récepteurs sensibles à la PtdSer n'a pas diminué les niveaux d'internalisation des ApoExo (section 4.2.2), il se peut que ces mêmes récepteurs soient plutôt reliés à la macropinocytose. Afin de vérifier cette hypothèse, l'expérience rapportée à la figure 17D pourrait être répliquée. Si les niveaux d'induction de la macropinocytose chez les cellules endothéliales ayant subi l'extinction génique sont moindres, leur implication dans l'entrée des ApoExo sera démontrée.

Parallèlement, des molécules mimant la PtdSer pourraient servir à explorer les voies métaboliques sollicitées par la PtdSer des ApoExo. Par exemple, les récepteurs de PtdSer explorés font partie de la famille des RTK, qui peuvent activer les effecteurs de la macropinocytose (Figure 23). Un autre exemple, mentionné au chapitre d'introduction (section 1.3.3.4.1), est l'activation de la PLC γ , un effecteur important dans la cascade de signalisation du PIP₃. En bref, des essais de l'état d'activation de ces effecteurs pourraient pointer vers le type de récepteur de PtdSer potentiellement sollicité par les ApoExo.

Autrement, le gabarit spécifique en ARNm contenus dans les ApoExo pourrait être en cause. En effet, les termes GO relevés à la section résultats (Figure 7C) font référence à certains mécanismes impliqués dans la macropinocytose. Plus particulièrement, les termes « Dépolarisation de la membrane » et « Polymérisation de l'actine » sont intéressants. En effet, l'équilibre électrostatique de l'environnement sous-membranaire permettrait le remodelage du cytosquelette d'actine en faveur de la macropinocytose. Ce phénomène est d'ailleurs l'action contraire de l'inhibiteur de macropinocytose EIPA.

Toujours selon les termes GO, les ApoExo ne semblent pas jouer sur le recrutement de la PI3K à la membrane plasmique via la formation de microdomaines membranaires essentiels à la formation du macropinosome, tel que mentionné à l'introduction. L'action des ApoExo serait donc confinée au cytosol, et donc sur l'action des GTPases comme Ras et Rac (Figure 23). Afin d'explorer ces voies d'activation de la macropinocytose potentiellement modulées par les ApoExos, une référence croisée sur les autres types d'ARN répertoriés dans Hardy *et al*, particulièrement les miARN et ARNlnc, contenus dans les ApoExo serait de mise. Finalement, l'inhibition pharmacologique ou par extinction génique de ces voies (Figure 12) permettrait d'explorer les modes d'action des ApoExo sur la macropinocytose.

En revanche, l'activité macropinocytique de cellules endothéliales est liée à leur survie et prolifération (Kim, 2017). Tel qu'observé, les cellules endothéliales augmentent leur activité de macropinocytose en milieu carencé dans le but de capter des nutriments additionnels de leur environnement. Or, les ApoExo contribuent à cette augmentation, et aident potentiellement les cellules endothéliales à survivre dans un milieu pauvre en nutriments, par exemple lors d'un épisode ischémique. Cela concorde avec les observations de résistance à l'apoptose induite par les ApoExo publiées par l'équipe de Dre. Hébert (Migneault, 2020). En contrepartie, si cette augmentation d'activité de macropinocytose est soutenue ou devient trop importante, les ApoExo pourraient provoquer la mort cellulaire par methuose (Overmeyer, 2008). De plus, [Maltese & Overmeyer](#) proposent que l'activation soutenue de la protéine G Ras, une protéine dont l'activité est potentiellement modulée par les ApoExo, puisse mener à la mort cellulaire par methuose. Par conséquent, il se peut qu'une insulte vasculaire prolongée, comme une ischémie critique chronique des membres, puisse causer la mort de l'endothélium de façon accélérée

pendant un épisode ischémique. Des études complémentaires pourront explorer les mécanismes d'arrêt de la boucle de rétroactivation de la macropinocytose dans le but de prévenir de telles conséquences.

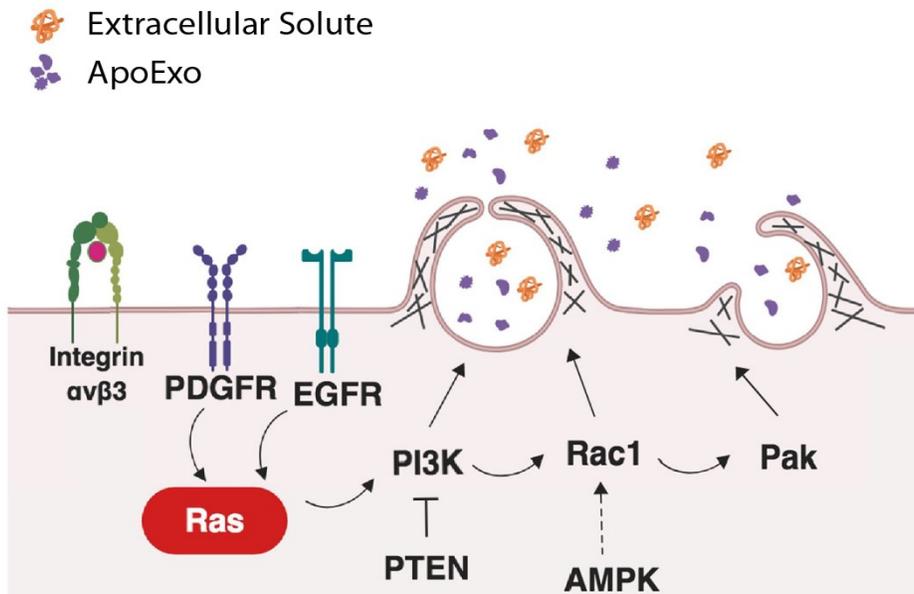


Figure 23. – Schématisation des mécanismes de formation de macropinosome. La formation des structures en lamellipodes sont dépendantes de voies de signalisation intracellulaires et extracellulaires complexes. L'activation de récepteurs par des facteurs de croissance active la petite protéine G Ras, qui à son tour active la PI3K. Cette kinase active directement la formation de macropinosomes, en plus de la protéine G Rac1. Cette protéine peut aussi être activée via l'activité de l'AMPK. Rac1 participe aussi à la formation du macropinosome de manière directe et indirecte. L'augmentation de l'activité macropinocytique favorise l'internalisation du milieu extracellulaire, incluant les ApoExo. Image adaptée de Zhang & Comisso. Licence obtenue via CCC-RightsLink.

4.2.3 Les ApoExo ont un potentiel de modulation de pathogenèse chez l'humain

De son côté, la macropinocytose est bien connue comme un processus constitutif servant à la capture non spécifique d'éléments extracellulaires, tels des nutriments. Cependant, de nouvelles

fonctions liées à la macropinocytose émergent du lot, par exemple la présentation d'antigène aussi bien chez les cellules dendritiques et les macrophages (Canton, 2022) que chez les cellules endothéliales, moins bien reconnues (Wheway, 2013).

De façon traditionnelle, la présentation d'antigène dépend grandement de la capacité de ces cellules professionnelles à apprêter l'antigène et de former des complexes majeurs d'histocompatibilité. De récentes études suggèrent que les exosomes participent aussi à la présentation d'antigènes (Tung, 2018; Lindenbergh, 2018) en transférant des peptides aux cellules réceptrices. Les résultats présentés plus haut, démontrant le rôle primordial de la macropinocytose dans l'internalisation d'ApoExo, suggèrent une contribution de la macropinocytose à l'immunogénéicité des ApoExo. Effectivement, les ApoExo contiennent des autoantigènes incluant le LG3, un fragment du perlecan, et favorise la production d'autoanticorps anti-LG3 qui sont associés au rejet de greffes ainsi qu'à la dysfonction rénale chez la souris et l'humain (Dieudé, 2015 ; Dieudé, 2020, Beillevaire, 2022; Yang, 2016; Cardinal, 2013; Xu, 2021).

De plus, les ApoExo stimulent la macropinocytose ce qui a pour effet d'augmenter leur propre niveau d'internalisation chez les cellules réceptrices. Ce phénomène est aussi présent chez certains pathogènes, comme les virus, par l'activation de voies de signalisation menant à la formation de vagues à la membrane plasmique (Pan, 2021; Pan, 2022). Étant donné la proximité de l'endothélium à la circulation sanguine, un dommage vasculaire menant à la production d'ApoExo aurait le potentiel de favoriser les événements de macropinocytose à l'endothélium. Ce phénomène pourrait soulever l'hypothèse que les ApoExo ont le potentiel de favoriser l'internalisation de certains pathogènes.

4.2.4 Effets potentiels des ApoExo sur différents systèmes cellulaires

Ces multiples fonctions biologiques suggèrent que les ApoExo agissent à plusieurs niveaux non seulement dans le processus de macropinocytose, mais aussi sur d'autres systèmes. En effet, les ApoExo sont produits à la suite d'un dommage vasculaire, et entrent essentiellement dans la circulation sanguine. Or, ils sont donc distribués dans tout le corps via le système cardiovasculaire. Les termes GO pourraient encore une fois servir de pistes dans l'exploration des effets potentiels

des ApoExo sur les différents types cellulaires. Par exemple, les ARNm appartenant au terme « Dépolarisation de la membrane » pourraient moduler les taux d'échange transmembranaire d'ions chlorure, processus important dans la réabsorption au niveau de l'épithélium tubulaire rénal.

Un autre terme GO important est le ciblage vésiculaire (vesicle targeting) à l'appareil de Golgi. En effet, l'appareil de Golgi est un véritable centre de fusion et fission vésiculaire ainsi qu'un point de relais central du système endomembranaire (Bonifacino & Rojas, 2006). La présence d'ARNm dont le produit change la dynamique du transport rétrograde est un indice important dans le processus changement de phénotype observé par Migneault *et al.* Par exemple la traduction de ces ARNm pourrait aider les prochains ApoExo à être plus facilement dirigés vers le Golgi, permettant une distribution plus efficace du cargo protéique et d'acide nucléique avant la fusion avec le lysosome. Ainsi, les protéines libérées dans le Golgi peuvent alors être modifiées au besoin et redistribuées de façon similaire au recyclage de protéines membranaires.

Par conséquent, la modulation du trafic endomembranaire potentiellement induite par les ApoExo devient un bon candidat à étudier sur la dysfonction endothéliale. Par exemple, des études démontrent que les changements phénotypiques en cancer sont en partie causés par la modulation de la dynamique du système endomembranaire (Baschieri & Fahran, 2015; Mironov, 2016). Or, selon Migneault *et al.*, le facteur von Willebrand (von Willebrand Factor, ou vWF) et le regroupement de différenciation 31 (Cluster of Differentiation 31, ou CD31) sont des marqueurs endothéliaux modifiés par le traitement aux ApoExo. De futures expériences sur ce changement de dynamique du système endomembranaire, et du suivi des ApoExo tout au long du transport, pourrait nous aider à mieux comprendre comment les changements phénotypiques des ECs se produisent.

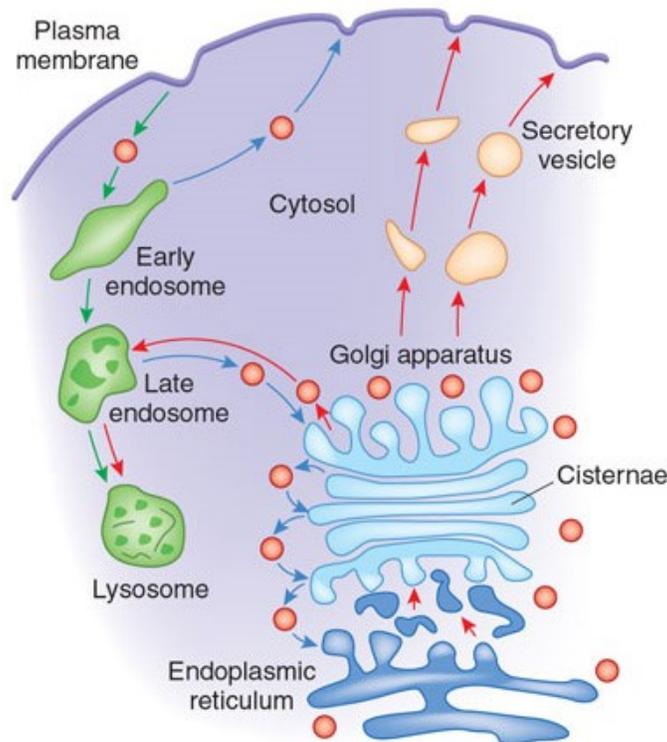


Figure 24. – **Route de transport du système endomembranaire à l'appareil de Golgi.** Après l'endocytose, l'endosome subit des étapes de maturation en route vers le lysosome (flèches vertes). En chemin, l'endosome se fragmente, et ces fragments rejoignent le système endomembranaire au niveau de l'appareil de Golgi. Le contenu endosomal peut alors suivre la route antérograde et se rendre au réticulum endoplasmique (flèches bleues), emprunter la voie de sécrétion via des vésicules de transport (flèches rouges). Du coup, des vésicules originaires de l'appareil de Golgi peuvent rejoindre l'endosome mature afin d'être redirigées vers les lysosomes pour dégradation. Image tirée de Xu & Esko. Licence obtenue via CCC-RightsLink.

4.3 Exploration des impacts de la surexpression de la protéine PCSK5 induite par les ApoExo

La protéine PCSK5, une sérine protéase de la famille des proprotéines convertases, active des précurseurs protéiques de façon post-traductionnelle. Le rôle de PCSK5 exprimé à la suite de l'incorporation des ApoExo par les cellules endothéliales reste encore à déterminer.

Quoique les rôles et cibles de la protéine PCSK5 soient connus depuis quelques décennies, de nouvelles études sont toujours de mises dans l'exploration de ses impacts. Classiquement, cette

protéine peut activer des métalloprotéases de la matrice extracellulaire, et donc participer au remaniement de cette matrice et au dépôt de collagène (Ito, 2021; Hoac, 2018; Marchesi, 2011) dans les tissus. De plus, PCSK5 est capable de cliver plusieurs intégrines essentielles à l'ancrage des cellules dans la matrice extracellulaire.

Afin de vérifier son potentiel sur l'endothélium, d'autres études seront à prévoir, d'abord à savoir si cette enzyme est sécrétée, mais aussi active. En effet, il existe plusieurs isoformes de cette protéine grâce à un épissage alternatif. De ces isoformes, deux classes se dégagent, soit l'isoforme membranaire et l'isoforme sécrétable (Xu & Esko, 2009). Des essais enzymographiques pourraient démontrer l'activité de la protéine induite chez les cellules réceptrices des ApoExo. De plus, cela nous permettrait de voir si une protéine PCSK5 active se retrouve au niveau de la membrane cellulaire ou si elle est excrétée dans le milieu extracellulaire, identifiant du même coup l'isoforme et le lieu d'action de cette enzyme.

Ainsi, la surexpression de cette protéine, couplée à ses cibles affectant l'attachement cellulaire à la matrice, pourrait contribuer à l'établissement du phénotype migratoire auparavant observés chez les CE suivant leur exposition aux ApoExo (Migneault, 2020), ainsi qu'au remodelage vasculaire dans un modèle murin de rejet d'allogreffe (Dieudé, 2015; Dieudé, 2020).

4.3.1 Potentiel modulateur des ApoExo par l'action de la protéine PCSK5

Un des facteurs clés dans la maladie rénale chronique est la raréfaction microvasculaire (Yang, 2018; Doreille, 2019; Lan 2021). L'apoptose des cellules endothéliales, soit au moment du dommage vasculaire aigu ou pendant un dommage soutenu, enclenche la libération d'ApoExo à la suite de l'activation de la caspase-3 (Dieudé, 2015; Beillevaire, 2022). La contribution des ApoExo et de PCSK5 à la transition du dommage rénal aigu à maladie rénale chronique reste encore à évaluer.

Par exemple, au niveau rénal, des études *in silico* du protéome urinaire chez des patients atteints de maladie rénale chronique associent la protéine PCSK5 – et de façon intéressante des métalloprotéases de la matrice (MMP) - à la présence de peptides urinaires (Petra, 2022). Parmi

ces peptides, on dénote l'uromoduline et la microglobuline. D'un point de vue clinique, l'uromoduline est impliquée dans l'inhibition de formation de cristaux de calcium dans le rein (Devuyst, 2017). La microglobuline, quant à elle, fait partie du complexe majeur d'histocompatibilité I (CMH I) impliqué dans la présentation d'antigène intracellulaire (Bjorkman, 1987). Cependant, la microglobuline est détectable dans le sang à la suite d'un dommage cellulaire sévère, et favorise ainsi la formation d'autoanticorps (Gottenberg, 2005), reliés à des maladies autoimmunes du tissu conjonctif (Du, 2022).

Étant donné les nombreux impacts pathologiques de la protéine PCSK5, il sera intéressant d'étudier l'augmentation du niveau de son expression au niveau de l'endothélium modulé par les ApoExo. Par exemple, PCSK5 est reliée au dépôt de différents types de collagène (I, II et III), phénomène important dans l'installation de la fibrose microvasculaire, phénomène exacerbé par l'apoptose endothéliale (Yang, 2018). Parallèlement, les souris soumises à un dommage d'ischémie-reperfusion développent de la fibrose interstitielle rénale (Yang, 2018 ; Lan 2021) avec déposition de collagène et fibrinogène. La protéine PCSK5 est donc un joueur potentiel à évaluer dans l'installation de la fibrose suivant un dommage vasculaire.

De plus, le groupe de Suur et al propose une association entre les membres de la famille des PCSK et des pathologies du système cardiovasculaire (Suur, 2022). Plus particulièrement, la protéine PCSK5 semble être sous-exprimée en contexte d'athérosclérose de la carotide et d'anévrisme de l'aorte abdominale. Ce groupe identifie aussi PCSK5 comme nouvelle cible thérapeutique potentielle dans la prévention de maladies cardiovasculaires. Sachant que les ApoExo induisent la surexpression de la protéine PCSK5, on pourrait formuler l'hypothèse selon laquelle les ApoExo agiraient comme agents protecteurs contre ces maladies cardiovasculaires. Des études complémentaires sur l'impact des ApoExo sur le système vasculaire dans les modèles mentionnés ci-haut seraient alors d'intérêt particulier.

Parallèlement, il est aussi important de considérer les impacts de l'expression de cette protéine chez les autres types cellulaires, et ce dans plusieurs organes. Comme précédemment mentionné, les ApoExo peuvent se retrouver en circulation par leur proximité du système cardiovasculaire, leur conférant un potentiel d'interaction dans tout l'organisme. Afin de mieux cibler les efforts et

d'identifier les organes les plus susceptibles d'interagir avec les ApoExo, des études de distribution d'ApoExo dans différents organes sont de mise. Par exemple, la métaplasie de l'épithélium respiratoire (Lee, 2014), le métabolisme des lipoprotéines à haute densité par l'endothélium vasculaire (Choi, 2013) et le remaniement osseux via l'ostéopontine (Hoac, 2018) sont tous des mécanismes impliquant la protéine PCSK5. Les ApoExo ont donc le potentiel d'agir sur ces processus.

Chapitre 5 – Conclusion et perspectives

Ensembles, les résultats répertoriés dans le présent ouvrage suggèrent que les ApoExo font partie intégrante d'une nouvelle voie des cellules mourantes pour transférer un cargo d'ARNm actif et spécifique aux cellules avoisinantes. L'internalisation des ApoExo est intrinsèquement liée à la macropinocytose dépendante de la phosphatidylsérine chez les cellules réceptrices, un phénomène amplifié par cette même internalisation.

En particulier, nous avons démontré que l'ARNm codant pour PCSK5, soit le plus abondant dans les ApoExo, est transféré aux cellules réceptrices, menant à une expression protéique accrue de la proprotéine convertase PCSK5. Collectivement, ces résultats identifient les ApoExo comme nouveaux régulateurs de la fonction endothéliale via la modulation des patrons d'expression d'ARNm et de protéines aux sites de dommage vasculaire.

Il est à noter que l'inhibition de la macropinocytose, et donc de l'internalisation des ApoExo, prévient la modulation du protéome et du transcriptome des cellules endothéliales. L'exploitation d'inhibiteur de macropinocytose en contexte clinique offrirait ainsi une méthode efficace de prévenir les effets néfastes des ApoExo sur l'organisme, telle la fibrose rénale et la raréfaction microvasculaire.

De plus, ces travaux identifient l'enzyme PCSK5, dont les niveaux d'expression sont modulés par les ApoExo, comme un candidat dans l'installation de la fibrose rénale et du remodelage vasculaire. Ce faisant, la protéine PCSK5 devient une cible thérapeutique potentielle à explorer dans la prévention de pathologies rénales et cardiovasculaires.

D'un autre côté, l'étude de l'internalisation et des effets des ApoExo a été concentrée autour des cellules endothéliales vasculaires. Or, la protéine PCSK5 se retrouve naturellement dans plusieurs organes. Cela, couplé à la présence d'ApoExo en circulation via le système cardiovasculaire, étend la portée des travaux présentés ici à plusieurs organes et pathologies. Il sera donc intéressant d'explorer l'effet des ApoExo et de la protéine PCSK5 dans d'autres organes et types cellulaires.

Références bibliographiques

1. Abeliovich H. Cytoplasm to vacuole trafficking of aminopeptidase I requires a t-SNARE-Sec1p complex composed of Tlg2p and Vps45p. *The EMBO Journal*. 1999 Nov 1;18(21):6005–16.
2. Albacker LA, Karisola P, Chang YJ, Umetsu SE, Zhou M, Akbari O, et al. TIM-4, a Receptor for Phosphatidylserine, Controls Adaptive Immunity by Regulating the Removal of Antigen-Specific T Cells. *Jl*. 2010 Dec 1;185(11):6839–49.
3. Anderson RGW. THE CAVEOLAE MEMBRANE SYSTEM. *Annu Rev Biochem*. 1998 Jun; 67(1):199–225.
4. Andree HA. Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. :6.
5. Arandjelovic S, Ravichandran KS. Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis. *Nat Immunol*. 2015 Sep; 16(9):907–17.
6. Atkin-Smith GK, Tixeira R, Paone S, Mathivanan S, Collins C, Liem M, et al. A novel mechanism of generating extracellular vesicles during apoptosis via a beads-on-a-string membrane structure. *Nat Commun*. 2015 Nov 3; 6(1):7439.
7. Badimon L, Vilahur G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J Intern Med*. 2014 Dec; 276(6):618–32.
8. Baschieri F, Farhan H. Endomembrane control of cell polarity: Relevance to cancer. *Small GTPases*. 2015 Apr 3; 6(2):104–7.
9. Battistelli M, Falcieri E. Apoptotic Bodies: Particular Extracellular Vesicles Involved in Intercellular Communication. *Biology*. 2020 Jan 20; 9(1):21.
10. Beillevaire D, Migneault F, Turgeon J, Gingras D, Rimbaud AK, Marcoux G, et al. Autolysosomes and caspase-3 control the biogenesis and release of immunogenic apoptotic exosomes. *Cell Death Dis*. 2022 Feb; 13(2):145.
11. Bernard M, Yang B, Migneault F, Turgeon J, Dieudé M, Olivier MA, et al. Autophagy drives fibroblast senescence through MTORC2 regulation. *Autophagy*. 2020 Nov 1; 16(11):2004–16.
12. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*. 1987 Oct 1; 329(6139):506–12.
13. Bonifacino JS, Rojas R. Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Aug; 7(8):568–79.
14. Brown-Suedel AN, Bouchier-Hayes L. Caspase-2 Substrates: To Apoptosis, Cell Cycle Control, and Beyond. *Front Cell Dev Biol*. 2020 Dec 23; 8:610022.

15. Brunetti RM, Kockelkoren G, Raghavan P, Bell GRR, Britain D, Puri N, et al. WASP integrates substrate topology and cell polarity to guide neutrophil migration. *Journal of Cell Biology*. 2022 Feb 7; 221(2):e202104046.
16. Buckley CM, King JS. Drinking problems: mechanisms of macropinosome formation and maturation. *FEBS J*. 2017 Nov; 284(22):3778–90.
17. Bui TM, Wiesolek HL, Sumagin R. ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis. *J Leukoc Biol*. 2020 Sep; 108(3):787–99.
18. Canton J. Macropinocytosis in Phagocyte Function and Immunity. In: Commisso C, editor. *Macropinocytosis* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2022 [cited 2022 Aug 31]. p. 103–16. (Subcellular Biochemistry; vol. 98). Available from: https://link.springer.com/10.1007/978-3-030-94004-1_6
19. Canton J, Neculai D, Grinstein S. Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013 Sep; 13(9):621–34.
20. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011 May;473(7347):298–307.
21. Cauvin C, Rosendale M, Gupta-Rossi N, Rocancourt M, Larraufie P, Salomon R, et al. Rab35 GTPase Triggers Switch-like Recruitment of the Lowe Syndrome Lipid Phosphatase OCRL on Newborn Endosomes. *Current Biology*. 2016 Jan; 26(1):120–8.
22. Chang P, Jacobson MK, Mitchison TJ. Poly(ADP-ribose) is required for spindle assembly and structure. *Nature*. 2004 Dec 1; 432(7017):645–9.
23. Chantarachot T, Bailey-Serres J. Polysomes, Stress Granules, and Processing Bodies: A Dynamic Triumvirate Controlling Cytoplasmic mRNA Fate and Function. *Plant Physiol*. 2018 Jan; 176(1):254–69.
24. Chaudhary N, Gomez GA, Howes MT, Lo HP, McMahon KA, Rae JA, et al. Endocytic Crosstalk: Cavins, Caveolins, and Caveolae Regulate Clathrin-Independent Endocytosis. Schmid SL, editor. *PLoS Biol*. 2014 Apr 8; 12(4):e1001832.
25. Chmurska A, Matczak K, Marczak A. Two Faces of Autophagy in the Struggle against Cancer. *IJMS*. 2021 Mar 15;22(6):2981.
26. Cho E, Nam GH, Hong Y, Kim YK, Kim DH, Yang Y, et al. Comparison of exosomes and ferritin protein nanocages for the delivery of membrane protein therapeutics. *Journal of Controlled Release*. 2018 Jun; 279:326–35.
27. Choi S, Korstanje R. Proprotein convertases in high-density lipoprotein metabolism. *Biomark Res*. 2013 Dec;1(1):27.
28. Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol*. 2001 Apr;3(4):339–45.

29. Commisso C, Davidson SM, Soydaner-Azeloglu RG, Parker SJ, Kamphorst JJ, Hackett S, et al. Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells. *Nature*. 2013 May 30;497(7451):633–7.
30. Costa Verdera H, Gitz-Francois JJ, Schiffelers RM, Vader P. Cellular uptake of extracellular vesicles is mediated by clathrin-independent endocytosis and macropinocytosis. *Journal of Controlled Release*. 2017 Nov;266:100–8.
31. Dagbay KB, Hardy JA. Multiple proteolytic events in caspase-6 self-activation impact conformations of discrete structural regions. *Proc Natl Acad Sci USA* [Internet]. 2017 Sep 19 [cited 2022 Aug 30];114(38). Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1704640114>
32. De Bie I, Marcinkiewicz M, Malide D, Lazure C, Nakayama K, Bendayan M, et al. The isoforms of proprotein convertase PC5 are sorted to different subcellular compartments. *Journal of Cell Biology*. 1996 Dec 1;135(5):1261–75.
33. Demos C, Tamargo I, Jo H. Biomechanical regulation of endothelial function in atherosclerosis. In: *Biomechanics of Coronary Atherosclerotic Plaque* [Internet]. Elsevier; 2021 [cited 2022 Aug 30]. p. 3–47. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128171950000019>
34. Denecker G, Ovaere P, Vandenabeele P, Declercq W. Caspase-14 reveals its secrets. *Journal of Cell Biology*. 2008 Feb 11; 180(3):451–8.
35. Denes A, Lopez-Castejon G, Brough D. Caspase-1: is IL-1 just the tip of the ICEberg? *Cell Death Dis*. 2012 Jul; 3(7):e338–e338.
36. Department of Internal Medicine, Zhou JX, Li X, Department of Internal Medicine, Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Kidney Institute, University of Kansas Medical Center, Kansas City, KS 66160, USA. Apoptosis in Polycystic Kidney Disease: From Pathogenesis to Treatment. In: Department of Internal Medicine, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Kansas Medical Center, Kansas City, KS 66160, USA, Li X, editors. *Polycystic Kidney Disease* [Internet]. Codon Publications; 2015 [cited 2022 Nov 24]. p. 197–230. Available from: <https://exonpublications.com/index.php/exon/article/view/77>
37. Dieudé M, Bell C, Turgeon J, Beillevaire D, Pomerleau L, Yang B, et al. The 20 S proteasome core, active within apoptotic exosome-like vesicles, induces autoantibody production and accelerates rejection. *Sci Transl Med* [Internet]. 2015 Dec 16 [cited 2022 Aug 30]; 7(318). Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.aac9816>
38. Dieudé M, Kaci I, Hébert MJ. The Impact of Programmed Cell Death on the Formation of Tertiary Lymphoid Structures. *Front Immunol*. 2021 Jul 15; 12:696311.
39. Dieudé M, Turgeon J, Karakeussian Rimbaud A, Beillevaire D, Qi S, Patey N, et al. Extracellular vesicles derived from injured vascular tissue promote the formation of tertiary lymphoid structures in vascular allografts. *Am J Transplant*. 2020 Mar; 20(3):726–38.
40. Doherty GJ, McMahon HT. Mechanisms of Endocytosis. *Annu Rev Biochem*. 2009 Jun 1; 78(1):857–902.

41. Doodnauth SA, Grinstein S, Maxson ME. Constitutive and stimulated macropinocytosis in macrophages: roles in immunity and in the pathogenesis of atherosclerosis. *Phil Trans R Soc B*. 2019 Feb 4; 374(1765):20180147.
42. Doreille A, Azzi F, Larivière-Beaudoin S, Karakeussian-Rimbaud A, Trudel D, Hébert MJ, et al. Acute Kidney Injury, Microvascular Rarefaction, and Estimated Glomerular Filtration Rate in Kidney Transplant Recipients. *CJASN*. 2021 Mar 8; 16(3):415–26.
43. Dorstyn L, Akey CW, Kumar S. New insights into apoptosome structure and function. *Cell Death Differ*. 2018 Jul; 25(7):1194–208.
44. Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, et al. Loss of Caveolae, Vascular Dysfunction, and Pulmonary Defects in Caveolin-1 Gene-Disrupted Mice. *Science*. 2001 Sep 28; 293(5539):2449–52.
45. Du AX, Gniadecki R, Osman M. Biomarkers of B cell activation in autoimmune connective tissue diseases: More than markers of disease activity. *Clinical Biochemistry*. 2022 Feb 1; 100:1–12.
46. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 2007 Jun; 35(4):495–516.
47. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages That Have Ingested Apoptotic Cells In Vitro Inhibit Proinflammatory Cytokine Production Through Autocrine/Paracrine Mechanisms Involving TGF- β , PGE $_2$, and PAF. : 9.
48. Flannagan RS, Jaumouillé V, Grinstein S. The Cell Biology of Phagocytosis. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2012 Feb 28; 7(1):61–98.
49. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*. 2012 Apr 1; 33(7):829–37.
50. Fotin A, Cheng Y, Grigorieff N, Walz T, Harrison SC, Kirchhausen T. Structure of an auxilin-bound clathrin coat and its implications for the mechanism of uncoating. *Nature*. 2004 Dec; 432(7017):649–53.
51. Fredj NB, Burrone J. A resting pool of vesicles is responsible for spontaneous vesicle fusion at the synapse. *Nat Neurosci*. 2009 Jun;12(6):751–8.
52. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*. 2018 Mar; 25(3):486–541.
53. Gambin Y, Ariotti N, McMahan KA, Bastiani M, Sierrecki E, Kovtun O, et al. Single-molecule analysis reveals self assembly and nanoscale segregation of two distinct cavin subcomplexes on caveolae. *eLife*. 2014 Jan 28; 3:e01434.
54. Ginini L, Billan S, Fridman E, Gil Z. Insight into Extracellular Vesicle-Cell Communication: From Cell Recognition to Intracellular Fate. *Cells*. 2022 Apr 19; 11(9):1375.

55. Gottenberg JE. Correlation of serum B lymphocyte stimulator and 2 microglobulin with autoantibody secretion and systemic involvement in primary Sjogren's syndrome. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2005 Jul 1; 64(7):1050–5.
56. Grimmer S, van Deurs B, Sandvig K. Membrane ruffling and macropinocytosis in A431 cells require cholesterol. *J Cell Sci* 15 July 2002; 115 (14): 2953–2962.
doi: <https://doi.org/10.1242/jcs.115.14.2953>
57. Gross JC, Parbin S. Crossroads of the endosomal machinery: Multivesicular bodies, small extracellular vesicles and autophagy. *TEV*. 2020 Sep 2; 2(1):48–53.
58. Grove J, Marsh M. The cell biology of receptor-mediated virus entry. *Journal of Cell Biology*. 2011 Dec 26; 195(7):1071–82.
59. Guo S, Zhang X, Zheng M, Zhang X, Min C, Wang Z, et al. Selectivity of commonly used inhibitors of clathrin-mediated and caveolae-dependent endocytosis of G protein-coupled receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2015 Oct; 1848(10):2101–10.
60. Gurung S, Perocheau D, Touramanidou L, Baruteau J. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. *Cell Commun Signal*. 2021 Dec; 19(1):47.
61. Häcker G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res*. 2000 Jul; 301(1):5–17.
62. Hankins HM, Baldrige RD, Xu P, Graham TR. Role of Flippases, Scramblases and Transfer Proteins in Phosphatidylserine Subcellular Distribution. *Traffic*. 2015 Jan; 16(1):35–47.
63. Haraga A, Ohlson MB, Miller SI. Salmonellae interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol*. 2008 Jan; 6(1):53–66.
64. Hardy MP, Audemard É, Migneault F, Feghaly A, Brochu S, Gendron P, et al. Apoptotic endothelial cells release small extracellular vesicles loaded with immunostimulatory viral-like RNAs. *Sci Rep*. 2019 Dec; 9(1):7203.
65. Hesketh EE, Czopek A, Clay M, Borthwick G, Ferenbach D, Kluth D, et al. Renal Ischaemia Reperfusion Injury: A Mouse Model of Injury and Regeneration. *JoVE*. 2014 Jun 7; (88):51816.
66. Hoac B, Susan-Resiga D, Essalmani R, Marcinkiewicz E, Seidah NG, McKee MD. Osteopontin as a novel substrate for the proprotein convertase 5/6 (PCSK5) in bone. *Bone*. 2018 Feb; 107:45–55.
67. Horibe S, Tanahashi T, Kawauchi S, Murakami Y, Rikitake Y. Mechanism of recipient cell-dependent differences in exosome uptake. *BMC Cancer*. 2018 Dec; 18(1):47.
68. Idrissi FZ, Blasco A, Espinal A, Geli MI. Ultrastructural dynamics of proteins involved in endocytic budding. *Proc Natl Acad Sci USA* [Internet]. 2012 Sep 25 [cited 2022 Aug 30]; 109(39). Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1202789109>
69. Idrissi FZ, Grötsch H, Fernández-Golbano IM, Presciatto-Baschong C, Riezman H, Geli MI. Distinct acto/myosin-I structures associate with endocytic profiles at the plasma membrane. *Journal of Cell Biology*. 2008 Mar 24; 180(6):1219–32.

70. Ito H, Nozaki K, Sakimura K, Abe M, Yamawaki S, Aizawa H. Activation of proprotein convertase in the mouse habenula causes depressive-like behaviors through remodeling of extracellular matrix. *Neuropsychopharmacol.* 2021 Jan; 46(2):442–54.
71. Ivanov AI. Pharmacological Inhibition of Endocytic Pathways: Is It Specific Enough to Be Useful? In: Ivanov AI, editor. *Exocytosis and Endocytosis* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2008 [cited 2022 Aug 31]. p. 15–33. (Walker J, editor. *Methods in Molecular Biology*; vol. 440). Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-178-9_2
72. Javeed N, Sagar G, Dutta SK, Smyrk TC, Lau JS, Bhattacharya S, et al. Pancreatic Cancer–Derived Exosomes Cause Paraneoplastic β -cell Dysfunction. *Clinical Cancer Research.* 2015 Apr 1; 21(7):1722–33.
73. Jin J, Shen Y, Zhang B, Deng R, Huang D, Lu T, et al. In situ exploration of characteristics of macropinocytosis and size range of internalized substances in cells by 3D-structured illumination microscopy. *IJN.* 2018 Sep; Volume 13:5321–33.
74. John Hopkins Medicine, Overview of the Vascular System, [Accédé à partir de <https://www.hopkinsmedicine.org/health/conditions-and-diseases/overview-of-the-vascular-system>]. En date du 24 novembre 2022
75. Julien O, Wells JA. Caspases and their substrates. *Cell Death Differ.* 2017 Aug; 24(8):1380–9.
76. Julien O, Zhuang M, Wiita AP, O'Donoghue AJ, Knudsen GM, Craik CS, et al. Quantitative MS-based enzymology of caspases reveals distinct protein substrate specificities, hierarchies, and cellular roles. *Proc Natl Acad Sci USA* [Internet]. 2016 Apr 5 [cited 2022 Aug 30]; 113(14). Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1524900113>
77. Kaksonen M, Roux A. Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018 May; 19(5):313–26.
78. Kale J, Osterlund EJ, Andrews DW. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ.* 2018 Jan; 25(1):65–80.
79. Kanno S, Hirano S, Sakamoto T, Furuyama A, Takase H, Kato H, et al. Scavenger receptor MARCO contributes to cellular internalization of exosomes by dynamin-dependent endocytosis and macropinocytosis. *Sci Rep.* 2020 Dec; 10(1):21795.
80. Keller S, Sanderson MP, Stoeck A, Altevogt P. Exosomes: From biogenesis and secretion to biological function. *Immunology Letters.* 2006 Nov; 107(2):102–8.
81. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer.* 1972 Aug; 26(4):239–57.
82. Kim B, Li J, Jang C, Arany Z. Glutamine fuels proliferation but not migration of endothelial cells. *EMBO J.* 2017 Aug 15; 36(16):2321–33.
83. Kimbrough TG, Miller SI. Assembly of the type III secretion needle complex of *Salmonella typhimurium*. *Microbes and Infection.* 2002 Jan; 4(1):75–82.

84. Kobayashi N, Karisola P, Peña-Cruz V, Dorfman DM, Jinushi M, Umetsu SE, et al. TIM-1 and TIM-4 Glycoproteins Bind Phosphatidylserine and Mediate Uptake of Apoptotic Cells. *Immunity*. 2007 Dec; 27(6):927–40.
85. Kopp F, Mendell JT. Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs. *Cell*. 2018 Jan; 172(3):393–407.
86. Koumangoye RB, Sakwe AM, Goodwin JS, Patel T, Ochieng J. Detachment of Breast Tumor Cells Induces Rapid Secretion of Exosomes Which Subsequently Mediate Cellular Adhesion and Spreading. Srivastava RK, editor. *PLoS ONE*. 2011 Sep 6; 6(9):e24234.
87. Kriel J, Loos B. The good, the bad and the autophagosome: exploring unanswered questions of autophagy-dependent cell death. *Cell Death Differ*. 2019 Apr; 26(4):640–52.
88. Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. Silent Cleanup of Very Early Apoptotic Cells by Macrophages. *J Immunol*. 2003 Nov 1; 171(9):4672–9.
89. Lajoie P, Nabi IR. Regulation of raft-dependent endocytosis. *J Cellular Mol Med*. 2007 Jul; 11(4):644–53.
90. Lan S, Yang B, Migneault F, Turgeon J, Bourgault M, Dieudé M, et al. Caspase-3-dependent peritubular capillary dysfunction is pivotal for the transition from acute to chronic kidney disease after acute ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2021 Sep 1; 321(3):F335–51.
91. Latifkar A, Hur YH, Sanchez JC, Cerione RA, Antonyak MA. New insights into extracellular vesicle biogenesis and function. *Journal of Cell Science*. 2019 Jul 1; 132(13):jcs222406.
92. Lavrik IN. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *Journal of Clinical Investigation*. 2005 Oct 1; 115(10):2665–72.
93. Lee C, Goldberg J. Structure of Coatamer Cage Proteins and the Relationship among COPI, COPII, and Clathrin Vesicle Coats. *Cell*. 2010 Jul; 142(1):123–32.
94. Lee SN, Lee DH, Lee MG, Yoon JH. Proprotein Convertase 5/6A Is Associated with Bone Morphogenetic Protein-2–Induced Squamous Cell Differentiation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2015 Jun; 52(6):749–61.
95. Lin XP, Mintern JD, Gleeson PA. Macropinocytosis in Different Cell Types: Similarities and Differences. *Membranes*. 2020 Aug 3; 10(8):177.
96. Lindenbergh MFS, Stoorvogel W. Antigen Presentation by Extracellular Vesicles from Professional Antigen-Presenting Cells. *Annu Rev Immunol*. 2018 Apr 26; 36(1):435–59.
97. Lindenboim L, Zohar H, Worman HJ, Stein R. The nuclear envelope: target and mediator of the apoptotic process. *Cell Death Discov*. 2020 Dec; 6(1):29.
98. Luo Y, Na Z, Slavoff SA. P-Bodies: Composition, Properties, and Functions. *Biochemistry*. 2018 May 1; 57(17):2424–31.

99. MacKenzie SH, Clark AC. Death by Caspase Dimerization. In: Matthews JM, editor. Protein Dimerization and Oligomerization in Biology [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2012 [cited 2022 Aug 30]. p. 55–73. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 747). Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-3229-6_4
100. Maltese WA, Overmeyer JH. Methuosis. *The American Journal of Pathology*. 2014 Jun;184(6):1630–42.
101. Marchesi C, Essalmani R, Lemarié CA, Leibovitz E, Ebrahimian T, Paradis P, et al. Inactivation of endothelial proprotein convertase 5/6 decreases collagen deposition in the cardiovascular system: role of fibroblast autophagy. *J Mol Med*. 2011 Nov; 89(11):1103–11.
102. Markiewicz A, Sigorski D, Markiewicz M, Owczarczyk-Saczonek A, Placek W. Caspase-14—From Biomolecular Basics to Clinical Approach. A Review of Available Data. *IJMS*. 2021 May 25; 22(11):5575.
103. Marques PE, Grinstein S, Freeman SA. SnapShot:Macropinocytosis. *Cell*. 2017 May; 169(4):766-766.e1.
104. Martin P, Pardo J, Schill N, Jöckel L, Berg M, Froelich CJ, et al. Granzyme B-induced and Caspase 3-dependent Cleavage of Gelsolin by Mouse Cytotoxic T Cells Modifies Cytoskeleton Dynamics. *Journal of Biological Chemistry*. 2010 Jun; 285(24):18918–27.
105. Maruoka M, Zhang P, Mori H, Imanishi E, Packwood DM, Harada H, et al. Caspase cleavage releases a nuclear protein fragment that stimulates phospholipid scrambling at the plasma membrane. *Molecular Cell*. 2021 Apr; 81(7):1397-1410.e9.
106. Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G, Théry C. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat Cell Biol*. 2019 Jan; 21(1):9–17.
107. Matthaues C, Taraska JW. Energy and Dynamics of Caveolae Trafficking. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Jan 21; 8:614472.
108. McCloy RA, Rogers S, Caldon CE, Lorca T, Castro A, Burgess A. Partial inhibition of Cdk1 in G 2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell Cycle*. 2014 May; 13(9):1400–12.
109. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2013 Apr 1; 5(4):a008656–a008656.
110. McNew JA, Parlati F, Fukuda R, Johnston RJ, Paz K, Paumet F, et al. Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. 2000; 407:7.
111. Mercer J, Helenius A. Gulping rather than sipping: macropinocytosis as a way of virus entry. *Current Opinion in Microbiology*. 2012 Aug; 15(4):490–9.
112. Mettlen M, Loerke D, Yazar D, Danuser G, Schmid SL. Cargo- and adaptor-specific mechanisms regulate clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Cell Biology*. 2010 Mar 22; 188(6):919–33.

113. Migneault F, Boncoeur É, Morneau F, Pascariu M, Dagenais A, Berthiaume Y. Cycloheximide and lipopolysaccharide downregulate α ENaC mRNA via different mechanisms in alveolar epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2013 Nov 15; 305(10):L747–55.
114. Migneault F, Dieudé M, Turgeon J, Beillevaire D, Hardy MP, Brodeur A, et al. Apoptotic exosome-like vesicles regulate endothelial gene expression, inflammatory signaling, and function through the NF- κ B signaling pathway. *Sci Rep*. 2020 Dec; 10(1):12562.
115. Minshall RD, Tiruppathi C, Vogel SM, Niles WD, Gilchrist A, Hamm HE, et al. Endothelial Cell-Surface Gp60 Activates Vesicle Formation and Trafficking via Gi-Coupled Src Kinase Signaling Pathway. *Journal of Cell Biology*. 2000 Sep 4; 150(5):1057–70.
116. Montecalvo A, Shufesky WJ, Beer Stolz D, Sullivan MG, Wang Z, Divito SJ, et al. Exosomes As a Short-Range Mechanism to Spread Alloantigen between Dendritic Cells during T Cell Allorecognition. *J Immunol*. 2008 Mar 1; 180(5):3081–90.
117. Muhsin-Sharafaldine MR, McLellan AD. Tumor-Derived Apoptotic Vesicles: With Death They Do Part. *Front Immunol*. 2018 May 7; 9:957.
118. Mulcahy LA, Pink RC, Carter DRF. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2014 Jan; 3(1):24641.
119. Mundra V, Mahato RI. Design of nanocarriers for efficient cellular uptake and endosomal release of small molecule and nucleic acid drugs: learning from virus. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*. 2014 Dec 1; 8(4):387–404.
120. Muro S, Wiewrodt R, Thomas A, Koniaris L, Albelda SM, Muzykantov VR, et al. A novel endocytic pathway induced by clustering endothelial ICAM-1 or PECAM-1. *Journal of Cell Science*. 2003 Apr 15; 116(8):1599–609.
121. Naim S, Kaufmann T. The Multifaceted Roles of the BCL-2 Family Member BOK. *Front Cell Dev Biol*. 2020 Sep 15; 8:574338.
122. Nicholson D. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*. 1999 Nov; 6(11):1028–42.
123. Nishio M, Teranishi Y, Morioka K, Yanagida A, Shoji A. Real-time assay for exosome membrane fusion with an artificial lipid membrane based on enhancement of gramicidin A channel conductance. *Biosensors and Bioelectronics*. 2020 Feb; 150:111918.
124. O'Brien K, Breyne K, Ughetto S, Laurent LC, Breakefield XO. RNA delivery by extracellular vesicles in mammalian cells and its applications. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020 Oct; 21(10):585–606.
125. Oliver TG, Meylan E, Chang GP, Xue W, Burke JR, Humpton TJ, et al. Caspase-2-Mediated Cleavage of Mdm2 Creates a p53-Induced Positive Feedback Loop. *Molecular Cell*. 2011 Jul; 43(1):57–71.
126. Opferman JT. Apoptosis in the development of the immune system. *Cell Death Differ*. 2008 Feb; 15(2):234–42.

127. Overmeyer JH, Kaul A, Johnson EE, Maltese WA. Active Ras Triggers Death in Glioblastoma Cells through Hyperstimulation of Macropinocytosis. *Molecular Cancer Research*. 2008 Jun 1; 6(6):965–77.
128. Pallet N, Sirois I, Bell C, Hanafi LA, Hamelin K, Dieudé M, et al. A comprehensive characterization of membrane vesicles released by autophagic human endothelial cells. *Proteomics*. 2013 Apr; 13(7):1108–20.
129. Palm W. Metabolic functions of macropinocytosis. *Phil Trans R Soc B*. 2019 Feb 4; 374(1765):20180285.
130. Pan W, Hui N, Wang H, He H. Entry of bovine parainfluenza virus type 3 into MDBK cells occurs via clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis in an acid-dependent manner. *Veterinary Microbiology*. 2021 Aug; 259:109148.
131. Pan W, Xia Y, Wang H, He H. Epidermal growth factor receptor (EGFR) promotes uptake of bovine parainfluenza virus type 3 into MDBK cells. *Veterinary Microbiology*. 2022 Aug; 271:109488.
132. Paone S, Baxter AA, Hulett MD, Poon IKH. Endothelial cell apoptosis and the role of endothelial cell-derived extracellular vesicles in the progression of atherosclerosis. *Cell Mol Life Sci*. 2019 Mar; 76(6):1093–106.
133. Paul A, Krelin Y, Arif T, Jeger R, Shoshan-Barmatz V. A New Role for the Mitochondrial Pro-apoptotic Protein SMAC/Diablo in Phospholipid Synthesis Associated with Tumorigenesis. *Molecular Therapy*. 2018 Mar; 26(3):680–94.
134. Pelkmans L, Helenius A. Endocytosis Via Caveolae: Endocytosis via Caveolae. *Traffic*. 2002 May; 3(5):311–20.
135. Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol*. 2001 May; 3(5):473–83.
136. Petra E, Siwy J, Vlahou A, Jankowski J. Urine peptidome in combination with transcriptomics analysis highlights MMP7, MMP14 and PCSK5 for further investigation in chronic kidney disease. Wu Q, editor. *PLoS ONE*. 2022 Jan 19; 17(1):e0262667.
137. Phuyal S, Hessvik NP, Skotland T, Sandvig K, Llorente A. Regulation of exosome release by glycosphingolipids and flotillins. *FEBS J*. 2014 May; 281(9):2214–27.
138. Pober JS, Min W, Bradley JR. Mechanisms of Endothelial Dysfunction, Injury, and Death. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2009 Feb 1; 4(1):71–95.
139. Poreba M, Rut W, Groborz K, Snipas SJ, Salvesen GS, Drag M. Potent and selective caspase-2 inhibitor prevents MDM-2 cleavage in reversine-treated colon cancer cells. *Cell Death Differ*. 2019 Dec; 26(12):2695–709.
140. Puccini J, Kumar S. Caspases. In: Bradshaw RA, Stahl PD, editors. *Encyclopedia of Cell Biology* [Internet]. Waltham: Academic Press; 2016. p. 364–73. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123944474300499>

141. Qian Y, Wang X, Liu Y, Li Y, Colvin RA, Tong L, et al. Extracellular ATP is internalized by macropinocytosis and induces intracellular ATP increase and drug resistance in cancer cells. *Cancer Letters*. 2014 Sep; 351(2):242–51.
142. Rabinovitch M. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends in Cell Biology*. 1995 Mar; 5(3):85–7.
143. Raghunandan S, Ramachandran S, Ke E, Miao Y, Lal R, Chen ZB, et al. Heme Oxygenase-1 at the Nexus of Endothelial Cell Fate Decision Under Oxidative Stress. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Sep 14; 9:702974.
144. Rano TA, Timkey T, Peterson EP, Rotonda J, Nicholson DW, Becker JW, Chapman KT, Thornberry NA. A combinatorial approach for determining protease specificities: application to interleukin-1beta converting enzyme (ICE). *Chem Biol*. 1997 Feb;4(2):149-55.
145. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*. 2013 Feb 18; 200(4):373–83.
146. Redka DS, Gütschow M, Grinstein S, Canton J. Differential ability of proinflammatory and anti-inflammatory macrophages to perform macropinocytosis. Gruenberg JE, editor. *MBoC*. 2018 Jan; 29(1):53–65.
147. Ringstad N, Gad H, Löw P, Di Paolo G, Brodin L, Shupliakov O, et al. Endophilin/SH3p4 Is Required for the Transition from Early to Late Stages in Clathrin-Mediated Synaptic Vesicle Endocytosis. *Neuron*. 1999 Sep; 24(1):143–54.
148. Roberts JZ, Crawford N, Longley DB. The role of Ubiquitination in Apoptosis and Necroptosis. *Cell Death Differ*. 2022 Feb; 29(2):272–84.
149. Rosales C, Uribe-Querol E. Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. *BioMed Research International*. 2017; 2017:1–18.
150. Sánchez-Mejorada G, Rosales C. Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors. *J Leukoc Biol*. 1998 May; 63(5):521–33.
151. Sánchez-Osuna M, Garcia-Belinchón M, Iglesias-Guimaraes V, Gil-Guiñón E, Casanelles E, Yuste VJ. Caspase-activated DNase Is Necessary and Sufficient for Oligonucleosomal DNA Breakdown, but Not for Chromatin Disassembly during Caspase-dependent Apoptosis of LN-18 Glioblastoma Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2014 Jul; 289(27):18752–69.
152. Saric A, Freeman SA. Endomembrane Tension and Trafficking. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Jan 8; 8:611326.
153. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*. 2000 Oct; 407(6805):784–8.
154. Schroeder GN, Hilbi H. Molecular Pathogenesis of *Shigella* spp.: Controlling Host Cell Signaling, Invasion, and Death by Type III Secretion. *Clin Microbiol Rev*. 2008 Jan; 21(1):134–56.

155. Seaman M. Recycle your receptors with retromer. *Trends in Cell Biology*. 2005 Feb; 15(2):68–75.
156. Seidah NG, Prat A. The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2012 May 1; 11(5):367–83.
157. Seyrek K, Richter M, Lavrik IN. Decoding the sweet regulation of apoptosis: the role of glycosylation and galectins in apoptotic signaling pathways. *Cell Death Differ*. 2019 Jun; 26(6):981–93.
158. Shields HJ, Traa A, Van Raamsdonk JM. Beneficial and Detrimental Effects of Reactive Oxygen Species on Lifespan: A Comprehensive Review of Comparative and Experimental Studies. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Feb 11; 9:628157.
159. Shin H, Haga JH, Kosawada T, Kimura K, Li YS, Chien S, et al. Fine control of endothelial VEGFR-2 activation: caveolae as fluid shear stress shelters for membrane receptors. *Biomech Model Mechanobiol*. 2019 Feb; 18(1):5–16.
160. Shrestha S, Clark AC. Evolution of the folding landscape of effector caspases. *Journal of Biological Chemistry*. 2021 Nov; 297(5):101249.
161. Sirois I, Raymond MA, Brassard N, Cailhier JF, Fedjaev M, Hamelin K, et al. Caspase-3-dependent export of TCTP: a novel pathway for antiapoptotic intercellular communication. *Cell Death Differ*. 2011 Mar; 18(3):549–62.
162. Sirois I, Groleau J, Pallet N, Brassard N, Hamelin K, Londono I, et al. Caspase activation regulates the extracellular export of autophagic vacuoles. *Autophagy*. 2012 Jun 23; 8(6):927–37.
163. Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Curry WT, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol*. 2008 Dec; 10(12):1470–6.
164. Smith SM, Baker M, Halebian M, Smith CJ. Weak Molecular Interactions in Clathrin-Mediated Endocytosis. *Front Mol Biosci*. 2017 Nov 14; 4:72.
165. Söllner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P, et al. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*. 1993 Mar 25; 362(6418):318–24.
166. Sousa R, Lafer EM. The role of molecular chaperones in clathrin mediated vesicular trafficking. *Front Mol Biosci* [Internet]. 2015 May 19 [cited 2022 Aug 30]; 2. Available from: http://www.frontiersin.org/Protein_Folding%2c_Misfolding_and_Degradation/10.3389/fmolb.2015.00026/abstract
167. Strlic B, Yang L, Albarrán-Juárez J, Wachsmuth L, Han K, Müller UC, et al. Tumour-cell-induced endothelial cell necroptosis via death receptor 6 promotes metastasis. *Nature*. 2016 Aug; 536(7615):215–8.

168. Suetsugu S, Yamazaki D, Kurisu S, Takenawa T. Differential Roles of WAVE1 and WAVE2 in Dorsal and Peripheral Ruffle Formation for Fibroblast Cell Migration. *Developmental Cell*. 2003 Oct; 5(4):595–609.
169. Sun Y, Leong NT, Wong T, Drubin DG. A Pan1/End3/Sla1 complex links Arp2/3-mediated actin assembly to sites of clathrin-mediated endocytosis. Pollard TD, editor. *MBoC*. 2015 Nov; 26(21):3841–56.
170. Suur BE, Chemaly M, Lindquist Liljeqvist M, Djordjevic D, Stenemo M, Bergman O, et al. Therapeutic potential of the Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin family in vascular disease. *Front Pharmacol*. 2022 Sep 15;13:988561.
171. Svensson KJ, Christianson HC, Wittrup A, Bourseau-Guilmain E, Lindqvist E, Svensson LM, et al. Exosome Uptake Depends on ERK1/2-Heat Shock Protein 27 Signaling and Lipid Raft-mediated Endocytosis Negatively Regulated by Caveolin-1. *Journal of Biological Chemistry*. 2013 Jun; 288(24):17713–24.
172. Swanson JA. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Aug; 9(8):639–49.
173. Swanson JA, King JS. The breadth of macropinocytosis research. *Phil Trans R Soc B*. 2019 Feb 4; 374(1765):20180146.
174. Syn N, Wang L, Sethi G, Thiery JP, Goh BC. Exosome-Mediated Metastasis: From Epithelial–Mesenchymal Transition to Escape from Immunosurveillance. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2016 Jul; 37(7):606–17.
175. Takei K, Slepnev VI, Haucke V, De Camilli P. Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nat Cell Biol*. 1999 May; 1(1):33–9.
176. Tanaka G, Nakase I, Fukuda Y, Masuda R, Oishi S, Shimura K, et al. CXCR4 Stimulates Macropinocytosis: Implications for Cellular Uptake of Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides and HIV. *Chemistry & Biology*. 2012 Nov; 19(11):1437–46.
177. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Mar; 9(3):231–41.
178. Teng F, Fussenegger M. Shedding Light on Extracellular Vesicle Biogenesis and Bioengineering. *Adv Sci*. 2021 Jan; 8(1):2003505.
179. Thomsen ARB, Plouffe B, Cahill TJ, Shukla AK, Tarrasch JT, Dosey AM, et al. GPCR-G Protein- β -Arrestin Super-Complex Mediates Sustained G Protein Signaling. *Cell*. 2016 Aug; 166(4):907–19.
180. Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, et al. A Combinatorial Approach Defines Specificities of Members of the Caspase Family and Granzyme B. *Journal of Biological Chemistry*. 1997 Jul; 272(29):17907–11.
181. Tian T, Zhu YL, Hu FH, Wang YY, Huang NP, Xiao ZD. Dynamics of exosome internalization and trafficking. *J Cell Physiol*. 2013 Jul; 228(7):1487–95.

182. Tian T, Zhu YL, Zhou YY, Liang GF, Wang YY, Hu FH, et al. Exosome Uptake through Clathrin-mediated Endocytosis and Macropinocytosis and Mediating miR-21 Delivery. *Journal of Biological Chemistry*. 2014 Aug; 289(32):22258–67.
183. Toda S, Hanayama R, Nagata S. Two-Step Engulfment of Apoptotic Cells. *Mol Cell Biol*. 2012 Jan;32(1):118–25.
184. Torgersen ML, Skretting G, van Deurs B, Sandvig K. Internalization of cholera toxin by different endocytic mechanisms. *J Cell Sci* 15 October 2001; 114 (20): 3737–3747.
doi: <https://doi.org/10.1242/jcs.114.20.3737>
185. Tu C, Du Z, Zhang H, Feng Y, Qi Y, Zheng Y, et al. Endocytic pathway inhibition attenuates extracellular vesicle-induced reduction of chemosensitivity to bortezomib in multiple myeloma cells. *Theranostics*. 2021; 11(5):2364–80.
186. Tung SL, Boardman DA, Sen M, Letizia M, Peng Q, Cianci N, et al. Regulatory T cell-derived extracellular vesicles modify dendritic cell function. *Sci Rep*. 2018 Dec; 8(1):6065.
187. Ungewickell A, Ward ME, Ungewickell E, Majerus PW. The inositol polyphosphate 5-phosphatase Ocr1 associates with endosomes that are partially coated with clathrin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 Sep 14; 101(37):13501–6.
188. Uribe-Querol E, Rosales C. Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process. *Front Immunol*. 2020 Jun 2; 11:1066.
189. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007 Jun; 9(6):654–9.
190. van der Pol E, Böing AN, Gool EL, Nieuwland R. Recent developments in the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles. *J Thromb Haemost*. 2016 Jan; 14(1):48–56.
191. van Niel G, D’Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018 Apr; 19(4):213–28.
192. Varkouhi AK, Scholte M, Storm G, Haisma HJ. Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *Journal of Controlled Release*. 2011 May; 151(3):220–8.
193. Varlamov O, Fricker LD. Intracellular trafficking of metalloproteinase D in AtT-20 cells: localization to the trans-Golgi network and recycling from the cell surface. *J Cell Sci*. 1998 Apr;111 (Pt 7):877-85.
194. Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Mittelbrunn M, Fernández-Delgado I, Torralba D, Moreno-Gonzalo O, et al. ISGylation controls exosome secretion by promoting lysosomal degradation of MVB proteins. *Nat Commun*. 2016 Dec; 7(1):13588.
195. Webb AM, Francis CR, Webb JM, Kincross H, Lundy KM, Judson R, et al. EHBP1 and EHD2 regulate Dll4 caveolin-mediated endocytosis during blood vessel development [Internet]. *Cell*

Biology; 2020 May [cited 2022 Aug 30]. Available from: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.05.19.104547>

196. Wejda M, Impens F, Takahashi N, Van Damme P, Gevaert K, Vandenaabeele P. Degradomics Reveals That Cleavage Specificity Profiles of Caspase-2 and Effector Caspases Are Alike. *Journal of Biological Chemistry*. 2012 Oct; 287(41):33983–95.

197. Wheway J, Obeid S, Couraud PO, Combes V, Grau GER. The Brain Microvascular Endothelium Supports T Cell Proliferation and Has Potential for Alloantigen Presentation. Bourgeois C, editor. *PLoS ONE*. 2013 Jan 8; 8(1):e52586.

198. Williams AB, Schumacher B. p53 in the DNA-Damage-Repair Process. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016 May; 6(5):a026070.

199. Xu Q, McAlister VC, House AA, Molinari M, Leckie S, Zeevi A. Autoantibodies to LG3 are associated with poor long-term survival after liver retransplantation. *Clin Transplant* [Internet]. 2021 Jul [cited 2022 Aug 31]; 35(7). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ctr.14318>

200. Xue C, Sowden M, Berk BC. Extracellular Cyclophilin A, Especially Acetylated, Causes Pulmonary Hypertension by Stimulating Endothelial Apoptosis, Redox Stress, and Inflammation. *ATVB*. 2017 Jun; 37(6):1138–46.

201. Yang B, Lan S, Dieudé M, Sabo-Vatesescu JP, Karakeussian-Rimbaud A, Turgeon J, et al. Caspase-3 Is a Pivotal Regulator of Microvascular Rarefaction and Renal Fibrosis after Ischemia-Reperfusion Injury. *JASN*. 2018 Jul; 29(7):1900–16.

202. Yatim N, Cullen S, Albert ML. Dying cells actively regulate adaptive immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2017 Apr; 17(4):262–75.

203. Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, Denecke B, et al. Delivery of MicroRNA-126 by Apoptotic Bodies Induces CXCL12-Dependent Vascular Protection. *Sci Signal* [Internet]. 2009 Dec 8 [cited 2022 Aug 30]; 2(100). Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/scisignal.2000610>

204. Zeziulia M, Blin S, Schmitt FW, Lehmann M, Jentsch TJ. Proton-gated anion transport governs macropinosome shrinkage. *Nat Cell Biol*. 2022 Jun; 24(6):885–95.

205. Zhang N, Hartig H, Dzhagalov I, Draper D, He YW. The role of apoptosis in the development and function of T lymphocytes. *Cell Res*. 2005 Oct; 15(10):749–69.

206. Zhang Y, Zhang L, Li Y, Sun S, Tan H. Different Contributions of Clathrin- and Caveolae-Mediated Endocytosis of Vascular Endothelial Cadherin to Lipopolysaccharide-Induced Vascular Hyperpermeability. Keen J, editor. *PLoS ONE*. 2014 Sep 2; 9(9):e106328.

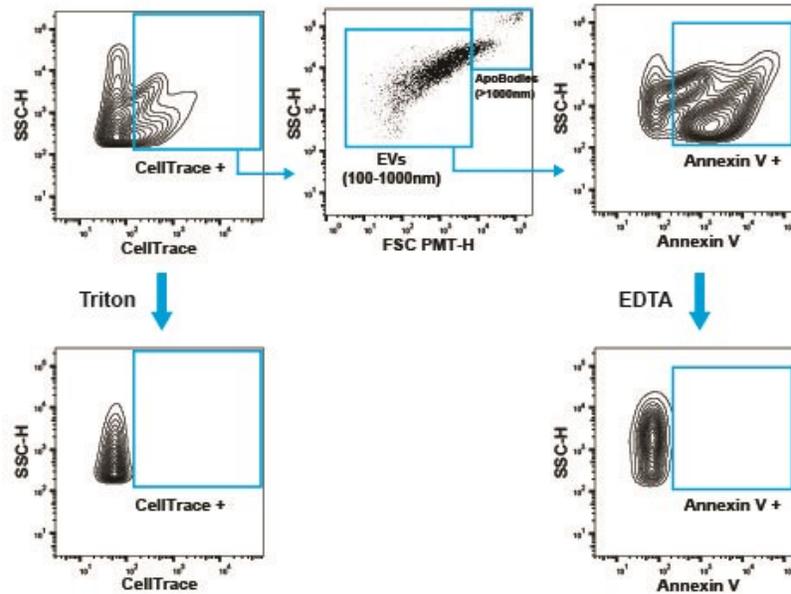
207. Zhao H, Michelot A, Koskela EV, Tkach V, Stamou D, Drubin DG, et al. Membrane-Sculpting BAR Domains Generate Stable Lipid Microdomains. *Cell Reports*. 2013 Sep; 4(6):1213–23.

208. Zoller V, Funcke JB, Roos J, Dahlhaus M, Abd El Hay M, Holzmann K, et al. Trail (TNF-related apoptosis-inducing ligand) induces an inflammatory response in human adipocytes. *Sci Rep.* 2017 Dec;7(1):5691.

Annexes

Annexe 1

A



B

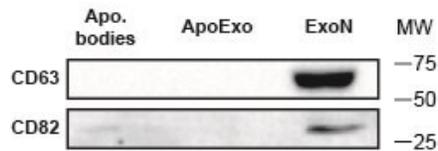


Figure S1 - Les vésicules apoptotiques apparentées aux exosomes sont différentes des exosomes classiques et des corps apoptotiques. (A) La stratégie des guérites pour l'analyse de cytométrie de flux à petites particules pour l'analyse de la présence de phosphatidylsérine et protéasome sur les vésicules colorées au CellTrace dans un milieu modulé par les cellules endothéliales. (B) Immunobuvardage de type Western montrant les tétraspanines CD63 et CD82 chez les exosomes classiques (ExoN), les corps apoptotiques (ApoBodies) et le ApoExo. Les poids moléculaires sont exprimés en kDa. Des immunobuvardages représentatifs sont montrés.

Chaque condition contient au moins 3 réplicats ($n \geq 3$)

Annexe 2

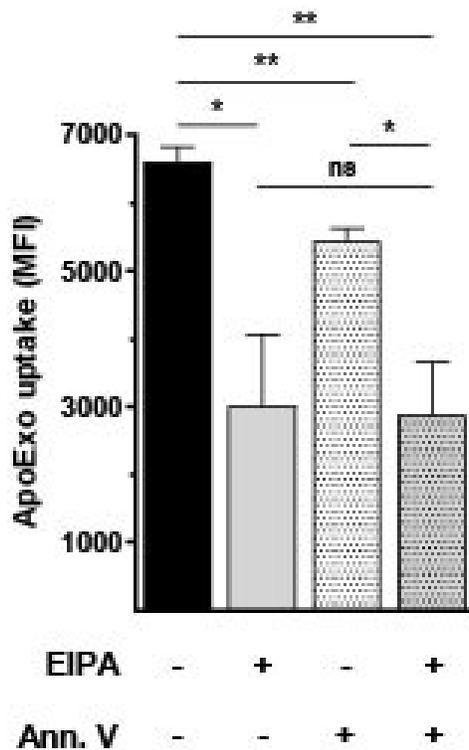


Figure S2 - L'internalisation des vésicules apoptotiques apparentés aux exosomes est médiée par la macropinocytose dépendante de la phosphatidylsérine. Quantification par cytométrie de flux de l'internalisation des ApoExo prétraité avec le véhicule (Ctrl) ou l'annexine V à une concentration de 10 µg/mL par les cellules endothéliales carencées en serum prétraitées pendant 30 m avec le véhicule (Ctrl) ou l'EIPA à 50µM suivi d'un traitement d'une heure. Au moins trois réplicats ($n \geq 3$) ont été effectués pour chaque condition. Les expériences de cytométrie de flux sont exprimées en tant qu'intensité de fluorescence médiane (MFI) (30,000 événements/échantillon) \pm SEM. Les valeurs P ont été obtenues par test ANOVA unidirectionnel avec test de Bonferroni post hoc. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$).

Annexe 3

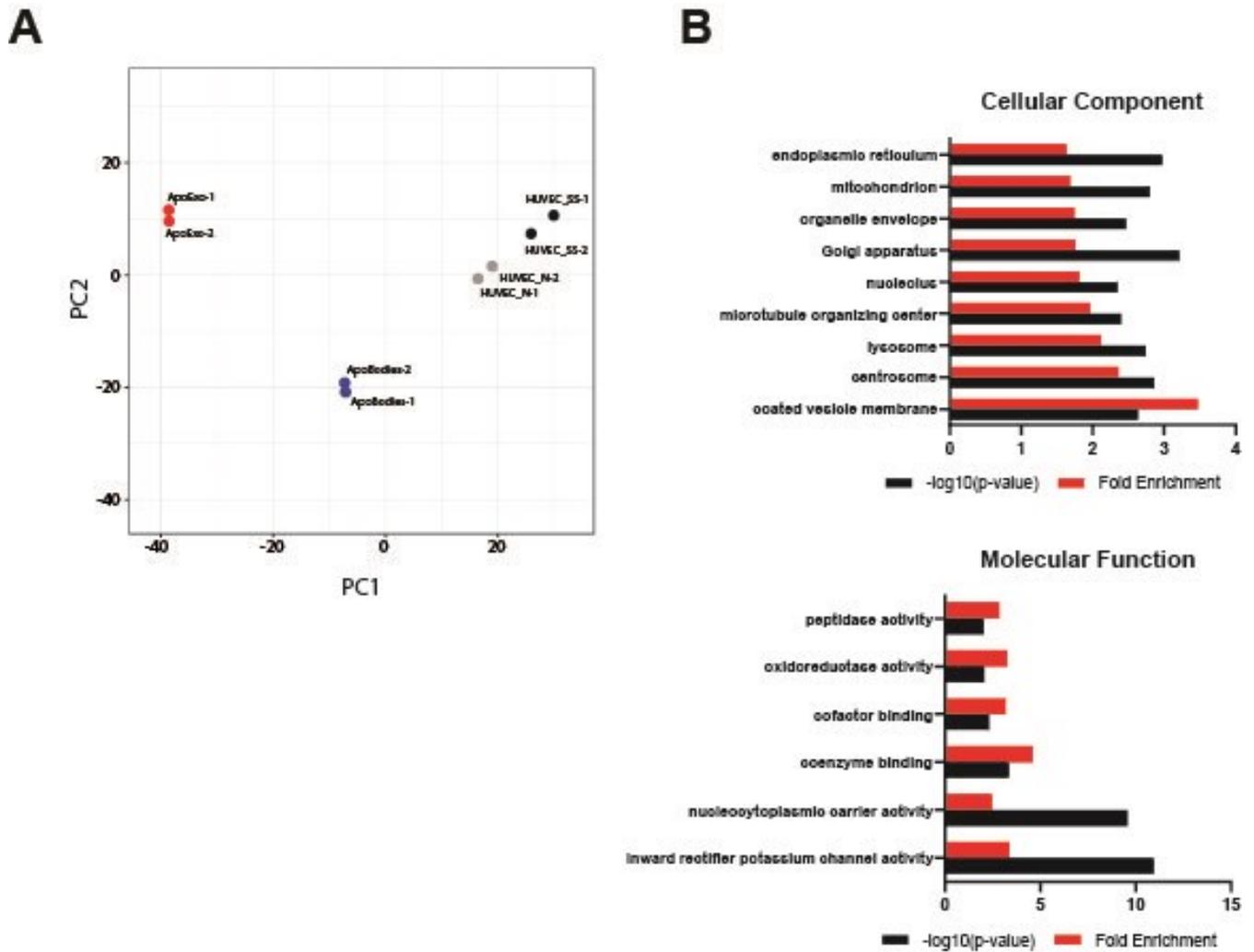


Figure S3 - Les ApoExo exeriment un profil spécifique d'ARNm. (A) Analyse de composantes principales (PCA) à partir de ARNm codants dans les vésicules extracellulaire et les cellules. (B) Analyse Gene Ontology des composantes cellulaires et fonctions moléculaires des des ARNm enrichis chez les ApoExo.

Annexe 4

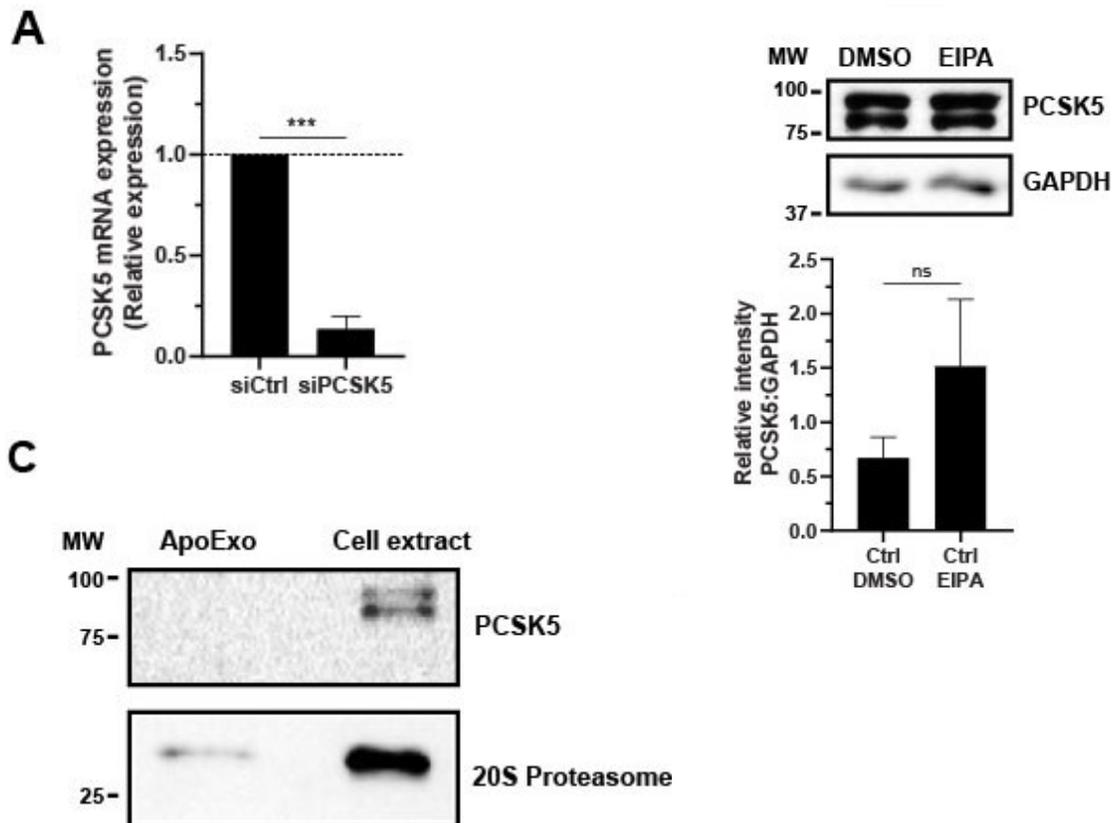


Figure S4 - Les ApoExo transfèrent l'ARNm codant fonctionnel pour PCSK5 aux cellules endothéliales et augmentent les niveaux d'expression protéique.

(A) Les cellules endothéliales ont été transfectées avec le siARN contrôle (Ctrl) ou contre PCSK5 à 90 nM. Quarante-huit heures post-transfection, les cellules ont été carencées en serum pendant 4 heures pour produire les ApoExo déplétés en PCSK5. L'expression de l'ARNm de PCSK5 a été mesurée par RT-PCR quantitative et présentée en tant qu'expression relative comparativement aux cellules transfectée avec le siARN contrôle (siCtrl) \pm SEM après normalisation avec HPRT1. Au moins 3 réplicats ont été effectués pour chaque condition ($n \geq 3$). (B) L'expression protéique endogène de PCSK5 n'est pas modifiée par l'inhibiteur EIPA. Les cellules endothéliales ont été exposées au véhicule (DMSO) ou à l'EIPA 30 μ M (EIPA) pendant 24 h. L'expression de PCSK5 a été quantifiée par densitométrie et a été exprimée en tant qu'unité arbitraire \pm SEM; $n \geq 3$. (C) La protéine PCSK5 n'est pas exprimée dans les ApoExo. Des immunobuvardages de type Western montrant PCSK5 and et le protéasome 20S dans les ApoExo et des extraits cellulaires. Les poids moléculaires sont exprimés en kDa. Des immunobuvardages représentatifs sont montrés. Au moins trois réplicats ont été effectués ($n \geq 3$) pour chaque condition. Les valeurs P ont été obtenue par test de Student non-jumelé (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$).

Annexe 5

Tableau 1. – Liste des 25 premiers transcrits codants enrichis dans les ApoExo, les corps apoptotiques et cellules endothéliales en conditions normales et carencées en sérum

transcript ID	Gene ID	Transcript name	Gene Name	N-HUVEC_1	N-HUVEC_2	SS-HUVEC_1	SS-HUVEC_2	ApoBodies_1	ApoBodies_2	ApoExo_1	ApoExo_2
6767.7	ENSG000000099										
6767.7	139.13	PCSK5-003	PCSK5	1	0	1	1	558	2594	47050	24632
6753.5	ENSG00000104	BLOC1S6-002	BLOC1S6	4	4	5	6	16	73	1139	1518
1681.2	ENSG00000198	MT-ND6-201	MT-ND6	59	61	78	74	197	565	1025	1225
1851.1	ENSG00000228	MT-ATP8-201	MT-ATP8	643	769	1094	882	1647	3523	865	964
4604.1	ENSG00000133	MORC4-004	MORC4	1	2	2	2	11	48	819	924
7837.1	ENSG00000118	FGF23-001	FGF23	3	4	4	3	16	59	612	784
6722.5	ENSG00000166	ATP9B-006	ATP9B	1	2	2	2	9	36	578	686
6501.1	ENSG00000150	KIAA1328-007	KIAA1328	2	2	3	2	9	38	562	658
1899.2	ENSG00000198	MT-ATP6-201	MT-ATP6	438	471	612	522	1082	2341	592	589
8183.1	ENSG00000197	PIGN-035	PIGN	2	2	2	2	8	37	489	539
1381.2	ENSG00000198	MT-ND4-201	MT-ND4	339	384	458	410	909	2135	477	532
1335.1	ENSG00000212	MT-ND4L-201	MT-ND4L	433	478	557	493	898	2107	359	507
1739.1	ENSG00000198	MT-CO2-201	MT-CO2	441	487	663	576	1188	2250	442	442
2079.2	ENSG00000198	MT-CO3-201	MT-CO3	440	510	688	594	1323	2499	426	421
1624.2	ENSG00000198	MT-CO1-201	MT-CO1	405	457	609	539	1391	2188	364	410
1789.2	ENSG00000198	MT-CYB-201	MT-CYB	246	275	357	316	615	1514	335	377
1453.3	ENSG00000198	MT-ND2-201	MT-ND2	188	213	335	293	447	1053	345	350
1227.2	ENSG00000198	MT-ND3-201	MT-ND3	216	235	331	289	561	1255	313	337
1567.2	ENSG00000198	MT-ND5-201	MT-ND5	190	215	292	245	382	969	284	336
1390.2	ENSG00000198	MT-ND1-201	MT-ND1	231	259	455	394	592	1138	301	325
1617.6	ENSG00000133	TBC1D8B-003	TBC1D8B	1	1	1	1	4	16	245	320
8637.4	ENSG00000148	ASTN2-004	ASTN2	0	1	0	1	5	20	311	306
0670.5	ENSG00000132	TRIM22-008	TRIM22	0	1	1	1	4	13	230	288
9733.5	ENSG00000174	C4orf32-001	C4orf32	1	2	2	2	5	22	318	284