



HAL
open science

Rôle des vésicules extracellulaires dans la propagation de l'inflammation et du stress oxydant au cours de la calcification vasculaire

Linda Yaker

► **To cite this version:**

Linda Yaker. Rôle des vésicules extracellulaires dans la propagation de l'inflammation et du stress oxydant au cours de la calcification vasculaire. Médecine humaine et pathologie. Université de Picardie Jules Verne, 2021. Français. NNT : 2021AMIE0075 . tel-03941262

HAL Id: tel-03941262

<https://theses.hal.science/tel-03941262v1>

Submitted on 16 Jan 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Thèse de Doctorat

*Mention Biologie-Santé
Spécialité Physiopathologie Humaine*

présentée à l'École Doctorale en Sciences Technologie et Santé (ED 585)

de l'Université de Picardie Jules Verne

par

Linda YAKER

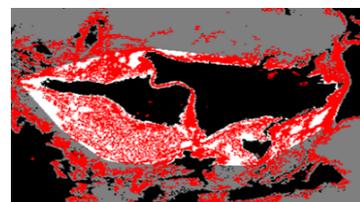
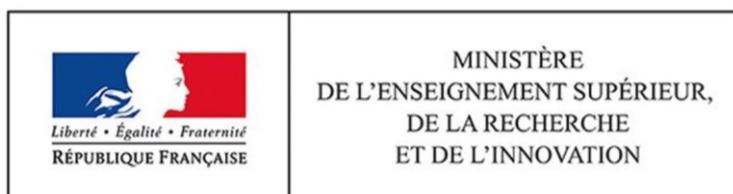
pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Picardie Jules Verne

*Rôle des vésicules extracellulaires dans la propagation de
l'inflammation et du stress oxydant au cours de la
calcification vasculaire*

Soutenue le 03/12/2021 après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

Pr. Soumeya BEKRI, PU-PH, Université de Rouen
Pr. David MAGNE, PU, Université Claude Bernard Lyon 1
Dr. Cécile MALNOU, MCF, HDR, Université Paul Sabatier
Dr. Carole AMANT, MCU-PH, HDR, UPJV
Dr. Abdellah TEBANI, MCU-PH, Université de Rouen
Pr. Saïd KAMEL, PU-PH, UPJV
Pr. Jérôme AUSSEIL, PU-PH, Université Paul Sabatier
Dr. Agnès BOULLIER, MCU-PH, UPJV

Présidente
Rapporteur
Rapporteuse
Examinatrice
Examinateur
Examinateur
Co-directeur de thèse
Co-directrice de thèse



*« L'éducation est l'arme la plus puissante
pour changer le monde. »*

Nelson Mandela

Remerciements

Mesdames, Messieurs, les membres du jury

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail : le Pr. Soumeya BEKRI, le Pr. David MAGNE, le Dr. Cécile MALNOU, le Dr. Carole AMANT ainsi que le Dr. Abdellah TEBANI.

Le directeur du laboratoire MP3CV

Je remercie le Pr. Saïd KAMEL, directeur du laboratoire UR UPJV 7517 MP3CV « Mécanismes physiopathologiques et conséquences des calcifications cardiovasculaires », d'avoir accepté de m'accueillir dans son laboratoire de recherche. Je vous remercie sincèrement pour votre bienveillance et votre disponibilité tout au long de ma thèse.

Les collaborateurs

Je souhaite remercier l'ensemble des collaborateurs qui ont permis de mener à bien ce projet de recherche. Le Pr. Soumeya BEKRI, le Dr. Abdellah TEBANI ainsi que Céline LESUEUR du laboratoire de biochimie médicale du CHU de Rouen, qui nous ont permis de réaliser l'analyse par multiplex de nos échantillons. Le Dr. Ida Chiara GUERRERA et le Dr. Vincent JUNG de la plateforme protéomique Necker à Paris pour l'analyse protéomique par spectrométrie de masse. Le Dr. Stéphanie BALOR de la plateforme de microscopie électronique de Toulouse pour l'analyse de nos échantillons. Chloé DIAS, doctorante en 2^{ème} année sous la direction du Pr. Jérôme AUSSEIL, pour son aide précieuse lors des différentes expérimentations (préparations des échantillons pour la TEM, la cryo-EM et le NTA) pendant mon séjour à Toulouse. Le Dr. Carole AMANT et Barbara DOMANGE pour l'utilisation de différents équipements dans leur laboratoire.

Mes directeurs de thèse

Je remercie très chaleureusement mes deux directeurs de thèse : le Pr. Jérôme AUSSEIL ainsi que le Dr. Agnès BOULLIER qui m'ont fait confiance durant mes trois années de thèse. Je vous remercie de m'avoir choisie pour travailler avec vous, de m'avoir transmis une partie de vos connaissances et de m'avoir formée au métier d'enseignant-chercheur. Sans vous, ce projet n'aurait pas vu le jour.

Jérôme, merci pour votre disponibilité malgré la distance, votre aide et votre soutien tout au long de ce travail. J'espère que nous aurons l'occasion de nous revoir à Toulouse, pour un autre repas au bord de la piscine avec l'ensemble de l'équipe ainsi que Stéphanie ! Agnès, je tiens également à vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi pendant ces trois années. Je n'ai pas suffisamment de mots pour vous exprimer toute ma gratitude. Merci pour votre patience, votre bienveillance, votre gentillesse et votre soutien tout au long de ma thèse. Merci encore de m'avoir encouragée dans tous les projets que je souhaitais entreprendre durant et après mon doctorat. Et puis je suis sûre que je n'aurais pas trouvé meilleure encadrante à Clermont-Ferrand !

Les membres du laboratoire MP3CV

Je remercie l'ensemble des membres du laboratoire MP3CV (enseignants-chercheurs, post-doctorants, ingénieurs, techniciens et doctorants) et plus particulièrement :

- ❖ Le Pr. Romuald MENTAVERRI pour m'avoir fait confiance lors des travaux pratiques auprès des étudiants de pharmacie.
- ❖ Le Dr. Marlène GALLET pour son rire si communicatif.
- ❖ L'ensemble des ingénieurs et techniciens (Cédric, Gaëlle, Carine et Sabrina) pour leurs précieux conseils et leur implication dans le bon déroulement des activités du laboratoire.
- ❖ Les post-doctorants (Lucie et Mickael) qui m'ont aidé à y voir plus clair quant à mon avenir professionnel. Une mention spéciale pour Lucie, ma coéquipière de body balance et body combat.
- ❖ Les différents doctorants présents actuellement dans le laboratoire (Camille, Nadia, Kawthar, Isabelle) et ceux qui nous ont quittés (Ali, Souvik, Thibault, Maria). Big up à Camil' et toutes nos soirées resto!
- ❖ La secrétaire du laboratoire : Chantal. Merci à toi pour ton aide dans toutes les démarches administratives. Nos petites conversations à travers nos bureaux vont me manquer !
- ❖ Le « Gang » : Cathy, Loïc et Nissrine.
 - Cathy, merci de m'avoir formée sur les différentes techniques utilisées au sein du laboratoire. Je te remercie sincèrement pour tes conseils, ta bienveillance, ta gentillesse et ta disponibilité tout au long de ma thèse.

- Loïc, ma peluche grandeur nature, merci pour toutes les discussions scientifiques, les conseils, mais également tous nos fous rires. J'espère que tu réussiras à trouver un souffre-douleur aussi gentil que moi !
- Nissrine, il va être très difficile pour moi de te décrire toute ma profonde et sincère gratitude. Je ne sais pas comment j'aurais pu mener à bien cette thèse sans ta présence. Merci pour ton soutien et je suis tellement heureuse d'avoir croisé ton chemin. Tu as été une collègue formidable et maintenant une véritable amie. A bientôt, à Montréal !

Merci à tous pour tous les moments agréables passés ensemble au laboratoire et en dehors !

Ma famille, une force inébranlable

Je tiens à remercier mes parents, Kamel et Nacéra YAKER, pour tout ce qu'ils ont fait pour moi depuis ma naissance. Je les remercie d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir toujours encouragée dans mes projets professionnels. Sans vous, je ne serais pas devenue la personne que je suis aujourd'hui et je n'aurais jamais été capable de mener à bien ce projet de thèse. Papa, tu m'as appris, entre autres, le sens de la rigueur et le sérieux, deux qualités indispensables pour réaliser un doctorat. Maman, mon pilier depuis toujours, cette thèse est pour toi, tu le mérites tant. Mes chers parents, je vous aime du plus profond de mon cœur.

A ma sœur Chanez, merci pour tout. Tu as été un véritable soutien durant cette thèse. Tu as su supporter mes angoisses, mes peurs et mes inquiétudes tout au long de ces trois années. Et pour ça, je sais qu'il faut du courage ! Merci pour tous tes conseils si sincères et ta patience sans faille. Car, oui, il en faut de la patience quand je me mets à parler de mes vésicules extracellulaires ! Je souhaite sincèrement à tout le monde d'avoir une sœur aussi formidable que toi.

A mon petit frère Adel, ma petite tête en l'air. Toujours présent, je sais que tu as suivi de près mon projet. Merci pour ton soutien et ton écoute précieuse.

A ma petite Sarah, merci pour ta folie, tes danses et tous nos fous rires. Tu as été une véritable bouffée d'air frais durant ces trois années de thèse.

A mon petit bébé Nazim, mon petit nuage de douceur et de tendresse dans cette bulle si stressante qu'est la thèse.

Et pour finir, une pensée à ma Mémé qui nous a quittés trop tôt et qui je l'espère est fière de moi, de là où elle est.

Table des matières

Introduction	22
I. Physiologie des vésicules extracellulaires (EVs)	23
1. Définition et classification des EVs	23
2. Biogenèse des EVs	25
2.1. Biogenèse des exosomes	25
2.2. Biogenèse des microvésicules	27
2.3. Biogenèse des corps apoptotiques.....	28
3. Sécrétion et devenir des EVs.....	28
4. Rôle de l'autophagie dans la biogenèse et la sécrétion des EVs	29
5. Fonctions biologiques des EVs	30
5.1. Rôles physiologiques des EVs en fonction de leur origine cellulaire	31
5.2. Rôles des EVs dans les systèmes immunitaire et cardiovasculaire	33
a) EVs et système immunitaire.....	33
b) EVs et système cardiovasculaire	35
II. Les EVs dans un contexte pathologique : l'insuffisance rénale chronique (IRC)	36
1. L'insuffisance rénale chronique (IRC).....	36
1.1. Épidémiologie et facteurs de risque	36
1.2. Définition, classification	36
1.3. Symptômes	39
1.4. Physiopathologie	39
a) Généralités.....	39
b) Focus sur les mécanismes d'inflammation et de stress oxydant dans l'IRC	41
c) Toxines urémiques	43
❖ L'indoxyl sulfate (IS).....	44
❖ L'homocystéine	47
2. Les calcifications vasculaires (CV) au cours de l'IRC.....	49
2.1. Épidémiologie	49
2.2. Définition, classification	50
2.3. Facteurs de risque.....	53
2.4. Physiopathologie	54
a) Généralités.....	54
b) Différents types cellulaires impliqués	55
❖ Les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).....	55
❖ Les macrophages.....	56
❖ Les cellules endothéliales	57
c) Microcalcification vs macrocalcification	57

3.	Rôles des EVs dans l'IRC et la CV	58
3.1.	Rôles des EVs dans l'IRC	58
a)	Rôles des EVs en fonction de leur origine cellulaire	59
❖	EVs sécrétées par les cellules endothéliales	59
❖	EVs sécrétées par les plaquettes sanguines.....	61
❖	EVs sécrétées par les neutrophiles.....	61
b)	EVs et toxines urémiques.....	61
3.2.	Rôles des EVs dans la CV.....	63
a)	Rôle pro-calcifiant des EVs.....	63
b)	Rôles des EVs dérivées de CMLV dans la CV	67
c)	Régulation de la balance calcium-phosphate	68
4.	Diagnostic et traitement de l'IRC et des CV	69
4.1.	Diagnostic classique de l'IRC	69
4.2.	EVs comme biomarqueurs d'IRC	70
4.3.	Traitements.....	71
a)	Traitements classiques de l'IRC.....	71
b)	Traitements classiques de la CV	72
c)	Potentiel thérapeutique des EVs.....	73
	Hypothèses & Objectifs	75
I.	Rationnel de l'étude.....	76
II.	Objectifs de l'étude.....	77
	Matériels & Méthodes.....	78
I.	Culture cellulaire.....	79
1.	Les macrophages	79
2.	Les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV)	80
II.	Test de viabilité cellulaire (WST-1)	81
III.	Étude de l'expression génique	82
1.	Extraction des ARN totaux.....	82
2.	Dosage des ARN totaux	82
3.	Synthèse de l'ADNc par <i>reverse transcription</i> (RT).....	83
4.	Amplification des ADNc par <i>quantitative polymerase chain reaction</i> (qPCR)	83
IV.	Étude de l'expression protéique.....	85
1.	Extraction protéique	85
2.	Dosage protéique.....	85
3.	Précipitation des protéines.....	87
4.	<i>Western Blot</i>	87
V.	Préparation des vésicules extracellulaires (EVs).....	89
1.	Isolation des EVs.....	89

2.	Caractérisation des EVs.....	90
2.1.	Analyse des EVs par microscopie électronique en transmission (TEM)	90
2.2.	Analyse des EVs par cryo-microscopie électronique (cryo-EM).....	91
2.3.	Analyse du suivi individuel de particules (NTA).....	92
2.4.	Analyse de l'activité acétylcholinestérase (AChE)	93
2.5.	Analyse de l'expression de molécules spécifiques des EVs	94
VI.	Étude du stress oxydant.....	95
1.	Étude de la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS).....	95
2.	Étude de la production de l'anion superoxyde (O ₂ ^{•-}).....	96
VII.	Étude de la production du monoxyde d'azote (NO).....	97
VIII.	Étude de la calcification	98
IX.	Étude de l'expression des cytokines pro-inflammatoires.....	99
X.	Analyse protéomique par spectrométrie de masse	100
1.	Digestion protéique	100
2.	Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) couplée à la spectrométrie de masse	100
3.	Analyse des données	101
XI.	Analyses statistiques.....	101
Résultats	102	
Partie I : LPS-EK	103	
I.	Effets du LPS-EK sur les macrophages.....	104
1.	Effets du LPS-EK sur la viabilité cellulaire des macrophages.....	104
2.	Le LPS-EK induit une réponse inflammatoire dans les macrophages	105
3.	Le LPS-EK induit un stress oxydant dans les macrophages	108
3.1.	Le LPS-EK augmente la production de ROS.....	108
3.2.	Le LPS-EK diminue la production d'O ₂ ^{•-}	109
3.3.	Le LPS-EK diminue la production de NO	110
4.	Le LPS-EK diminue l'autophagie dans les macrophages	111
II.	Étude de la biogenèse des EVs sécrétées en conditions pro-inflammatoires et pro-oxydantes.....	114
III.	Caractérisation des EVs de macrophages	116
IV.	Rôles et mécanismes d'action des EVs sécrétées par les macrophages.....	120
1.	Effets des EVs dérivées de macrophages sur la viabilité cellulaire des CMLV.....	120
2.	Les EV LPS induisent une réponse inflammatoire dans les CMLV	120
3.	Les EV LPS induisent un stress oxydant dans les CMLV	121
4.	Les EV LPS augmentent la calcification induite par le Pi <i>via</i> un switch ostéogénique des CMLV	123
5.	Analyse du contenu protéique des EVs dérivées de macrophages après traitement avec du LPS-EK	129

Partie II : Homocystéine	133
I. Effets de l'homocystéine sur les macrophages	134
1. Effets de l'homocystéine sur la viabilité cellulaire des macrophages	134
2. Effets de l'homocystéine sur l'inflammation des macrophages	135
3. L'homocystéine induit un stress oxydant dans les macrophages	138
3.1. L'homocystéine augmente la production de ROS	138
3.2. L'homocystéine diminue la production d'O ₂ ⁻	139
3.3. L'homocystéine diminue la production de NO	141
4. L'homocystéine diminue l'autophagie dans les macrophages	142
II. Effets de l'homocystéine sur la biogenèse des EVs de macrophages	145
III. Caractérisation des EVs de macrophages	146
IV. Rôles et mécanismes d'action des EVs sécrétées par les macrophages.....	150
1. Effets des EVs dérivées de macrophages sur la viabilité cellulaire des CMLV	150
2. Effets des EVs de macrophages traités avec de l'homocystéine sur l'inflammation de CMLV	151
3. Effets des EVs de macrophages traités avec de l'homocystéine sur le stress oxydant de CMLV	152
4. Les EV Hu augmentent la calcification induite par le Pi <i>via</i> un switch ostéogénique des CMLV	154
5. Analyse du contenu protéique des EVs sécrétées par les macrophages après traitement avec l'homocystéine	158
Discussion	161
Conclusion & Perspectives	174
Valorisation du travail de thèse	178
Annexes	180
Bibliographie.....	182

Table des abréviations

AChE : acétylcholinestérase
ACN : acétonitrile
ACP : analyse en composantes principales
ADN : acides désoxyribonucléiques
ADNc : ADN complémentaire
AGEs : produits de glycation avancés
Ago2 : protéine argonaute 2
AhR : *aryl hydrocarbon receptor*
Alix : *ALG-2 interacting protein X*
ALP : phosphatase alcaline
ARN : acides ribonucléiques
ATG : *autophagy-related protein*
BMP : protéines morphogénétiques osseuses
BSA : *bovine serum albumin*
Ca²⁺ : calcium
CAA : chloracétamide
CAC : calcifications des artères coronariennes
CAD : cis-aconitate décarboxylase
CaSR : récepteur sensible au calcium
CCL2 : *C-C motif chemokine ligand 2*
CD2AP : *CD2-associated protein*
CIT : *citron rho-interacting serine/threonine kinase*
CKD-EPI : *Chronic Kidney Disease - Epidemiology Collaboration*
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CMLV : cellules musculaires lisses vasculaires
CRP : protéine C-réactive
CSM : cellules souches mésenchymateuses
CTC : 2-chlorotriptyl chloride
CV : calcifications vasculaires
DAF-FM : diacétate de fluorescéine
DCFH-DA : diacétate de dichlorodihydrofluorescéine 2',7'
DFG : débit de filtration glomérulaire
DGK α : *diacyl glycerol kinase α*
DHE : dihydroéthidium
DMEM : *dulbecco's modified Eagle's medium*
DMSO : diméthylsulfoxyde
DNTB : *5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoic acid*
dNTP : désoxyribonucléotides triphosphate
DOC : désoxycholate de sodium
ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*
EMMPRIN : *ECM metalloproteinase inducer*
EndMT : transition endothélio-mésenchymateuse
EPCs : cellules progénitrices endothéliales
ESCRT : *endosomal sorting complex required for transport*
EUTox : *European Uremic Toxin Work Group*
EV CT : EVs dérivées de macrophages non traités

EV Hn : EVs dérivées de macrophages traités avec de l'homocystéine à la concentration normale
 EV Hu : EVs dérivées de macrophages traités avec de l'homocystéine à la concentration urémique
 EV LPS : EVs dérivées de macrophages traités avec du LPS-EK
 EVs : vésicules extracellulaires
 FDR : taux de fausses découvertes
 FGF23 : *fibroblast growth factor 23*
 H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène
 HAS : Haute Autorité de Santé
 HCl : acide chlorhydrique
 HDL : lipoprotéines de haute densité
 HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance
 HRP : peroxidase de raifort
 HUVECs : cellules endothéliales de la veine de cordon ombilical
 ICAM : molécules d'adhésion intercellulaires
 IGFBP-6 : *insulin-like growth factor-binding protein-6*
 IL : interleukine
 iNOS : *inductible NO synthase*
 IRC : insuffisance rénale chronique
Irg1 : *immunoresponsive gene 1*
 IS : indoxyl sulfate
 ISEV : *International Society for Extracellular Vesicles*
 LC3 : *microtubule-associated protein 1 light chain 3*
 LDL : lipoprotéines de faible densité
 LPS-EK : lipopolysaccharide-EK
 MDA : malondialdéhyde
 MESA : *Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis*
 MGP : protéine Gla de la matrice
 MMP : métalloprotéases matricielles
 MyD88 : réponse primaire de différenciation myéloïde 88
 N₂O₃ : trioxyde de diazote
 NaCl : chlorure de sodium
 NaF : fluorure de sodium
 NaOH : hydroxyde de sodium
 NDMVs : *neutrophil-derived microvesicles*
 NDTRs : *neutrophil-derived trails*
 NF-κB : *nuclear factor-kappa B*
 NKF-KDOQI : *National Kidney Foundation–Kidney Disease Outcomes Quality Initiative*
 NLRP3 : *NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*
 NO⁻ : anion nitroxyl
 NO : monoxyde d'azote
 NO₂ : dioxyde d'azote
 Nox : NADPH oxydase
 Nrf2/Keap1 : *nuclear factor (erythroid-2-related factor)-2/Kelch-like ECH associating protein-1*
 NTA : analyse du suivi individuel de particules
 O₂⁻ : anion superoxyde
 ONOO⁻ : peroxydinitrite
 OPG : ostéoprotégérine

Osx : osterix
 PAI-1 : inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1
 PAMP : motif moléculaire associé aux pathogènes
 PASEF : méthode de fragmentation accumulation-séquentielle parallèle
 PBS : *phosphate buffered saline*
 pCS : p-crésyl sulfate
 phospho-1 : phosphatase phosphoéthanolamine-phosphocholine
 Pi : phosphate inorganique
 PTH : parathormone
 qPCR : *quantitative polymerase chain reaction*
 R.E.I.N. : Réseau Épidémiologique et Information en Néphrologie
 Rab : *Ras-related proteins in brain*
 RIPA : *Radio-ImmunoPrecipitation Assay*
 ROS : espèces réactives de l'oxygène
 RT : *reverse transcription*
 Runx2 : facteur de transcription lié à Runt 2
 Saa3 : protéine sérum amyloïde A-3
 SDS : sodium dodécyl sulfate
 SEM : erreur standard à la moyenne
 Sema4D : *Transmembrane Semaphorin 4D*
 SMAD : *mothers against decapentaplegic homolog*
 SMemb : *smooth muscle myosin heavy chain*
 SMPD3 : sphingomyéline phosphodiesterase 3
 SNAREs : *soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein (SNAP) receptors*
 SOD : superoxydes dismutases
 SQSTM : séquestome-1
 TBST : *Tris Buffered Saline Tween*
 TCEP : tris (2-carboxyéthyl) phosphine
 TEAB : bromure de tétraéthylammonium
 TEM : microscopie électronique en transmission
 TGF- β : *transforming growth factor- β*
 TIMP : *tissue inhibitor of metalloproteinase*
 TLRs : récepteurs *toll-like*
 TNAP : phosphatase alcaline tissu non-spécifique
 TNF- α : *tumor necrosis factor- α*
 TSG101 : *tumor susceptibility gene 101*
 ULK1 : *UNC51-like kinase 1*
 VCAM-1 : molécule d'adhésion vasculaire-1
 VIM : vimentine
 Vps4 : *vacuolar protein sorting-associated protein 4*
 YBX-1 : protéine de liaison Y-box 1
 α -SMA : *α -smooth muscle actin*

Table des figures

Figure 1 : Classification des vésicules extracellulaires (EVs) selon leur mode de biogenèse, adapté de [4].	23
Figure 2 : Composition biomoléculaire des vésicules extracellulaires (EVs) [7].	24
Figure 3 : Représentation schématique de la biogenèse des différentes sous-catégories de vésicules extracellulaires (EVs) : exosomes, microvésicules et corps apoptotiques [10]. ..	25
Figure 4 : Rôle clé du complexe <i>endosomal sorting complex required for transport</i> (ESCRT) dans la biogenèse des exosomes [13].	26
Figure 5 : Rôle de la sphingomyéline phosphodiesterase 3 (SMPD3) dans la biogenèse des exosomes [17].	27
Figure 6 : Différents types d'interaction des vésicules extracellulaires (EVs) avec la cellule réceptrice [5].	29
Figure 7 : Schéma des principales protéines impliquées dans les mécanismes d'autophagie [26].	30
Figure 8 : Fonctions biologiques des vésicules extracellulaires (EVs), adapté de [4].	31
Figure 9 : Rôle des vésicules extracellulaires (EVs) dans la présentation antigénique [46].	34
Figure 10 : Effets protecteurs des vésicules extracellulaires (EVs) sur le système cardiovasculaire [48].	35
Figure 11 : Localisation et structure anatomique du rein chez l'Homme.	37
Figure 12 : Différents stades de maladies rénales définis en fonction du débit de filtration glomérulaire (DFG) et de l'albuminurie [55].	38
Figure 13 : Les principales phases physiopathologiques de l'insuffisance rénale chronique (IRC).	40
Figure 14 : Endotoxémie et insuffisance rénale chronique (IRC) [64].	42
Figure 15 : Stress oxydant et insuffisance rénale chronique (IRC) [61].	43
Figure 16 : Effets de l'indoxyl sulfate (IS) sur la perte de fonction rénale observée au cours de l'insuffisance rénale chronique (IRC) [71].	44
Figure 17 : Corrélation négative entre la concentration d'indoxyl sulfate (IS) et le débit de filtration glomérulaire (DFG) [72].	45
Figure 18 : Représentation schématique des différentes voies du métabolisme de l'homocystéine [84].	47
Figure 19 : Effets de l'hyperhomocystéinémie sur la fonction des podocytes [85].	48
Figure 20 : Prévalence des calcifications vasculaires (CV) chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique (IRC) [88].	49
Figure 21 : Principales étapes menant à l'apparition d'une calcification vasculaire (CV) [90].	50
Figure 22 : Principaux facteurs activateurs et inhibiteurs impliqués dans la calcification vasculaire (CV) [92].	51
Figure 23 : Représentation schématique des calcifications retrouvées au niveau de la média (à gauche) et de l'intima (à droite) des vaisseaux sanguins [92].	52
Figure 24 : Valve aortique saine (a) et calcifiée (b) [94].	53
Figure 25 : Mécanismes physiopathologiques impliqués dans les calcifications vasculaires (CV) observées chez les patients atteints d'IRC [92].	55

Figure 26 : Différents phénotypes possibles des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) [102].	56
Figure 27 : Lien entre inflammation, microcalcification et macrocalcification [104].	58
Figure 28 : Induction de la production de microvésicules de cellules endothéliales (EMP) par les toxines urémiques [134].	62
Figure 29 : Rôle du miR-92a transporté par les microvésicules dans la dysfonction endothéliale chez les patients insuffisants rénaux chroniques [147].	63
Figure 30 : Rôle des vésicules extracellulaires (EVs) dérivées de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) dans la calcification vasculaire (CV) [172].	67
Figure 31 : Composition des vésicules extracellulaires (EVs) impliquées dans la formation de dépôts minéralisants calcifiants [169].	69
Figure 32 : Biogenèse des exosomes par les podocytes et recueil dans l'urine [178].	70
Figure 33 : Agents pharmacologiques inhibant (A) la sécrétion des vésicules extracellulaires (EVs) ou (B) leur interaction avec la cellule réceptrice [108].	73
Figure 34 : Schéma du mécanisme de réduction du WST-1 en formazan [214].	81
Figure 35 : Schéma du dosage protéique par la méthode BCA [215].	86
Figure 36 : Protocole d'extraction des vésicules extracellulaires (EVs) de macrophages.	90
Figure 37 : Protocole de coloration négative pour une analyse par microscopie électronique en transmission (TEM).	90
Figure 38 : Principales étapes pour l'analyse d'échantillons biologiques par cryo-microscopie électronique (cryo-EM) [218].	91
Figure 39 : Illustration schématique du dispositif d'analyse du suivi individuel de particules (NTA) (a) et les différents résultats obtenus après analyse (b)(c)(d) [220].	93
Figure 40 : Étude de l'activité acétylcholinestérase (AChE) par la méthode colorimétrique d'Ellman <i>et al.</i> [222].	94
Figure 41 : Schéma de la réaction d'oxydation du diacétate de dichlorodihydrofluorescéine 2',7' (DCFH-DA).	95
Figure 42 : Schéma de la réaction d'oxydation du dihydroéthidium (DHE) [223].	96
Figure 43 : Détection du monoxyde d'azote (NO) intracellulaire par le diacétate de fluorescéine (DAF-FM) [224].	97
Figure 44 : Principe général de la technologie MSD.	99
Figure 45 : Effets du lipopolysaccharide (LPS-EK) sur la viabilité cellulaire des macrophages.	104
Figure 46 : Observation des macrophages au microscope optique inversé après traitement au lipopolysaccharide-EK (LPS-EK).	105
Figure 47 : Le lipopolysaccharide-EK (LPS-EK) induit une réponse inflammatoire dans les macrophages.	106
Figure 48 : Effets du lipopolysaccharide-EK (LPS-EK) sur l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans les macrophages.	107
Figure 49 : Effets du lipopolysaccharide-EK (LPS-EK) sur la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les macrophages.	108
Figure 50 : Effets du lipopolysaccharide-EK (LPS-EK) sur l'expression génique de Nrf2 et Keap1 dans les macrophages.	109
Figure 51 : Effets du lipopolysaccharide-EK (LPS-EK) sur la production d'anion superoxyde (O₂⁻) par les macrophages.	109

Figure 52 : Effets du lipopolysaccharide-EK (LPS-EK) sur l'expression génique de Nox-2 et SOD-2 dans les macrophages.	110
Figure 53 : Effets du lipopolysaccharide-EK (LPS-EK) sur la production de monoxyde d'azote (NO) et l'expression génique de l'inductible NO synthase (iNOS) dans les macrophages.	111
Figure 54 : Effets du lipopolysaccharide-EK (LPS-EK) sur l'expression des marqueurs d'autophagie des macrophages.	112
Figure 55 : Effets du lipopolysaccharide-EK (LPS-EK) sur l'expression génique et protéique de p62 dans les macrophages.	113
Figure 56 : Effets du lipopolysaccharide-EK (LPS-EK) sur l'expression des gènes de la biogenèse des EVs dans les macrophages.	114
Figure 57 : Effets du lipopolysaccharide-EK (LPS-EK) sur l'expression protéique de SMPD3 dans les macrophages.	115
Figure 58 : Analyse des vésicules extracellulaires (EVs) sécrétées par les macrophages en microscopie électronique en transmission (TEM).	116
Figure 59 : Analyse des vésicules extracellulaires (EVs) sécrétées par les macrophages en cryo-microscopie électronique (cryo-EM).	116
Figure 60 : Analyse de la distribution des vésicules extracellulaires (EVs) sécrétées par les macrophages selon la taille à l'aide de la technique par analyse du suivi individuel de particules (NTA).	117
Figure 61 : Analyse de la concentration des vésicules extracellulaires (EVs) sécrétées par les macrophages à l'aide de la technique par analyse du suivi individuel de particules (NTA).	118
Figure 62 : Étude de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase (AChE) de vésicules extracellulaires (EVs) de macrophages.	119
Figure 63 : Analyse par <i>Western Blot</i> de l'expression protéique de CD9, CD81 et β-actine de vésicules extracellulaires (EVs) sécrétées par les macrophages.	119
Figure 64 : Effets des vésicules extracellulaires (EVs) de macrophages sur la viabilité cellulaire des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).	120
Figure 65 : Effets des vésicules extracellulaires (EVs) de macrophages sur l'expression génique de marqueurs d'inflammation des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).	121
Figure 66 : Effets des vésicules extracellulaires (EVs) dérivées de macrophages sur la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).	122
Figure 67 : Effets des vésicules extracellulaires (EVs) de macrophages sur l'expression génique des marqueurs du stress oxydant des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).	123
Figure 68 : Effets des vésicules extracellulaires (EVs) de macrophages sur la calcification de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).	124
Figure 69 : Effets du lipopolysaccharide-EK (LPS-EK) sur la calcification des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).	125
Figure 70 : Effets des vésicules extracellulaires (EVs) de macrophages sur l'expression génique de la protéine Gla de la matrice (MGP) dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).	126
Figure 71 : Effets du phosphate inorganique (Pi) sur l'expression génique de marqueurs ostéogéniques et contractile des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).	127

Figure 72 : Effets des vésicules extracellulaires (EVs) de macrophages sur l'expression génique de marqueurs ostéogéniques et contractile des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).	128
Figure 73 : Volcano Plot représentant les effets du lipopolysaccharide-EK (LPS-EK) sur le contenu protéique des vésicules extracellulaires (EVs) dérivées des macrophages. ..	130
Figure 74 : Effets du lipopolysaccharide-EK (LPS-EK) sur l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans les vésicules extracellulaires (EVs) dérivées des macrophages. ...	131
Figure 75 : Analyse en composantes principales (ACP) des effets du lipopolysaccharide-EK (LPS-EK) sur l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans les vésicules extracellulaires (EVs) dérivées de macrophages.	132
Figure 76 : Effets de l'homocystéine sur la viabilité cellulaire des macrophages.	134
Figure 77 : Observation des macrophages au microscope optique inversé après traitement avec de l'homocystéine.	135
Figure 78 : Effets de l'homocystéine sur l'expression génique des cytokines pro-inflammatoires dans les macrophages.	136
Figure 79 : Effets de l'homocystéine sur l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans les macrophages.	137
Figure 80 : Effets de l'homocystéine sur la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les macrophages.	138
Figure 81 : Effets des antioxydants N-acétyl-L-cystéine (NAC) et α-tocophérol (vitamine E) sur l'induction de ROS par l'homocystéine.	139
Figure 82 : Effets de l'homocystéine sur la production d'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) par les macrophages.	140
Figure 83 : Effets de l'homocystéine sur l'expression génique de SOD-1, SOD-2 et Nox-2 dans les macrophages.	141
Figure 84 : Effets de l'homocystéine sur la production de monoxyde d'azote (NO) et l'expression génique de l'<i>inductible NO synthase</i> (iNOS) dans les macrophages.	142
Figure 85 : Effets de l'homocystéine sur l'expression génique des marqueurs d'autophagie dans les macrophages.	143
Figure 86 : Effets de l'homocystéine sur l'expression génique et protéique de p62 dans les macrophages.	144
Figure 87 : Effets de l'homocystéine sur l'expression des gènes de la biogenèse des vésicules extracellulaires (EVs) dans les macrophages.	145
Figure 88 : Analyse des vésicules extracellulaires (EVs) sécrétées par les macrophages en microscopie électronique en transmission (TEM).	146
Figure 89 : Analyse de la distribution des vésicules extracellulaires (EVs) sécrétées par les macrophages selon la taille à l'aide de la technique par analyse du suivi individuel de particules (NTA).	147
Figure 90 : Analyse de la concentration des vésicules extracellulaires (EVs) sécrétées par les macrophages à l'aide de la technique par analyse du suivi individuel de particules (NTA).	148
Figure 91 : Étude de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase (AChE) de vésicules extracellulaires (EVs) de macrophages.	148
Figure 92 : Analyse par <i>Western Blot</i> de l'expression protéique de CD9, CD81 et β-actine de vésicules extracellulaires (EVs) de macrophages.	149
Figure 93 : Effets des vésicules extracellulaires (EVs) de macrophages sur la viabilité cellulaire des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).	150

Figure 94 : Effets des vésicules extracellulaires (EVs) de macrophages sur l'expression génique de marqueurs d'inflammation des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).	151
Figure 95 : Effets des vésicules extracellulaires (EVs) dérivées de macrophages sur la production de ROS dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).	152
Figure 96 : Effets des vésicules extracellulaires (EVs) de macrophages sur l'expression génique des marqueurs du stress oxydant des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).	153
Figure 97 : Effets des vésicules extracellulaires (EVs) de macrophages sur la calcification de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).	154
Figure 98 : Effets de l'homocystéine sur la calcification des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).	155
Figure 99 : Effets des vésicules extracellulaires (EVs) de macrophages sur l'expression génique de la protéine Gla de la matrice (MGP) dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).	156
Figure 100 : Effets des vésicules extracellulaires (EVs) de macrophages sur l'expression génique de marqueurs ostéogéniques, contractile et synthétiques des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).	157
Figure 101 : Heatmap et dendrogramme montrant l'expression relative des 23 protéines les plus discriminantes et le clustering respectif des protéines quantifiées.	159
Figure 102 : Effets de l'homocystéine sur l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans les vésicules extracellulaires (EVs) dérivées des macrophages.	160
Figure 103 : Représentation schématique des rôles et mécanismes d'action des vésicules extracellulaires (EVs) de macrophages traités avec du lipopolysaccharide (LPS-EK) dans l'aggravation de la calcification vasculaire.	176
Figure 104 : Représentation schématique des rôles et mécanismes d'action des vésicules extracellulaires (EVs) de macrophages traités avec de l'homocystéine (Hcy) dans l'aggravation de la calcification vasculaire.	177

Table des tableaux

Tableau 1 : Effets de l'indoxyl sulfate (IS) dans des modèles expérimentaux d'insuffisance rénale chronique (IRC).....	46
Tableau 2 : Rôles des microvésicules endothéliales chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique (IRC), adapté de [4].....	60
Tableau 3 : Rôles des vésicules extracellulaires (EVs) dans la calcification vasculaire (CV), adapté de [4].....	66
Tableau 4 : Liste des séquences d'amorces utilisées lors de la <i>quantitative polymerase chain reaction</i> (qPCR).	84
Tableau 5 : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour le <i>Western Blot</i>.....	88
Tableau 6 : Détection par spectrométrie de masse de protéines spécifiques de vésicules extracellulaires (EVs) et impliquées dans la physiopathologie des EVs.....	129

Table des annexes

❖ Annexe 1 : Résultat obtenu après lecture de la plaque du kit V-plex de chez <i>Meso Scale Diagnostics</i> [®] (MSD).....	181
---	-----

Résumé

La calcification vasculaire (CV) est un facteur de risque de morbi-mortalité notamment chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique (IRC). Lors de la CV, les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) changent de phénotype et sécrètent des vésicules extracellulaires (EVs) pro-calcifiantes. L'objectif de notre étude est de déterminer le rôle et le mécanisme d'action des EVs dans la propagation de l'inflammation et du stress oxydant au cours de la CV. Pour cela, une lignée murine de macrophages (RAW 264.7) a été traitée soit avec du lipopolysaccharide (LPS-EK) soit avec de l'homocystéine, toxine urémique accumulée chez les patients atteints d'IRC. Les EVs sécrétées par ces macrophages ont été isolées par ultracentrifugation et caractérisées en utilisant différentes techniques (TEM, cryo-EM, NTA, activité AChE, *Western Blot* CD9, CD81). Puis, une lignée murine de CMLV (MOVAS-1) a été incubée avec ces EVs afin d'étudier la CV en présence de phosphate inorganique (Pi 4 mM, 7 ou 14 jours). Nous avons montré que les EVs sécrétées par les macrophages traités avec du LPS-EK sont capables d'aggraver le processus de CV *via* l'induction d'un switch ostéogénique des CMLV et d'une réponse pro-inflammatoire et pro-oxydante. Par une étude protéomique, nous avons montré que ces EVs sont enrichies en cytokines pro-inflammatoires et en protéines impliquées dans l'inflammation (cis-aconitate décarboxylase, CAD), le stress oxydant (inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1, PAI-1) et la CV (protéine sérum amyloïde A-3, Saa3). Les EVs sécrétées après traitement par l'homocystéine augmentent également la calcification des CMLV mais leur composition protéique indique que le mécanisme d'action est indépendant du stress oxydant et vraisemblablement dépendante de l'IL-6. En conclusion, les EVs pourraient être une cible thérapeutique intéressante afin de limiter la CV chez les patients atteints d'IRC.

Mots clés : vésicules extracellulaires, calcification vasculaire, cellules musculaires lisses vasculaires, inflammation, stress oxydant, toxines urémiques.

Abstract

Role of extracellular vesicles in the propagation of inflammation and oxidative stress during vascular calcification

Vascular calcification (VC) is a cardiovascular complication in patients with diseases such as chronic kidney disease (CKD). During VC, vascular smooth muscle cells (VSMCs) undergo an osteogenic switch and secrete a heterogeneous population of extracellular vesicles (EVs). The objective of our study is to determine the role and the mechanism of action of EVs in the propagation of inflammation and oxidative stress during the VC process. A macrophage murine cell line (RAW 264.7) was treated either with lipopolysaccharide-EK (LPS-EK) or homocysteine, a uremic toxin that accumulated in body fluids of CKD patients. EVs secreted by these macrophages were then collected by ultracentrifugation and characterized using several techniques (TEM, cryo-EM, NTA, AChE activity, *Western Blot* CD9, CD81). A murine VSMCs cell line (MOVAS-1) was incubated with these EVs to assess calcification in presence of inorganic phosphate (Pi 4mM, 7 or 14 days). We showed that EVs secreted by LPS-EK-treated macrophages were able to aggravate the VC process *via* the VSMC osteogenic switch and a pro-inflammatory and pro-oxidative response. Using MS-based proteomic, we demonstrated that these EVs were enriched in pro-inflammatory cytokines and in proteins involved in inflammation (cis-aconitate decarboxylase, CAD), oxidative stress (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1), and VC (serum amyloid A-3 protein, Saa3). EVs derived from homocysteine-treated macrophages were also able to aggravate VSMC calcification but their protein content demonstrated that the mechanism of action is independent of oxidative stress and probably dependant of IL-6. In conclusion, EVs could therefore be an interesting therapeutic target to limit VC in CKD patients.

Keywords: extracellular vesicles, vascular calcification, vascular smooth muscle cells, inflammation, oxidative stress, uremic toxins.

Introduction

I. Physiologie des vésicules extracellulaires (EVs)

1. Définition et classification des EVs

Depuis quelques années, les vésicules extracellulaires (EVs) font l'objet de nombreuses études et ce, dans des contextes physiopathologiques différents. Ces particules, délimitées par une bicouche lipidique, sont sécrétées par divers types cellulaires eucaryotes dont les plantes mais également procaryotes tels que les bactéries [1]. Ces EVs sont également retrouvées dans différents fluides biologiques chez l'Homme tels que le plasma, l'urine, la salive, la bile, le lait maternel ou encore le liquide amniotique [2].

Les EVs sont regroupées en trois catégories selon leur mode de biogenèse : les exosomes, les microvésicules et les corps apoptotiques [3] (**Figure 1**). Les exosomes ont un diamètre compris entre 30 et 150 nm et sont formés à partir du système endosomal [3]. Les microvésicules, appelées également microparticules ou ectosomes, ont un diamètre intermédiaire (100 à 1000 nm) et sont produites suite à un bourgeonnement de la membrane plasmique [3]. Enfin, les corps apoptotiques, d'un diamètre de 50 à 5000 nm, sont sécrétés lors de l'apoptose [3].

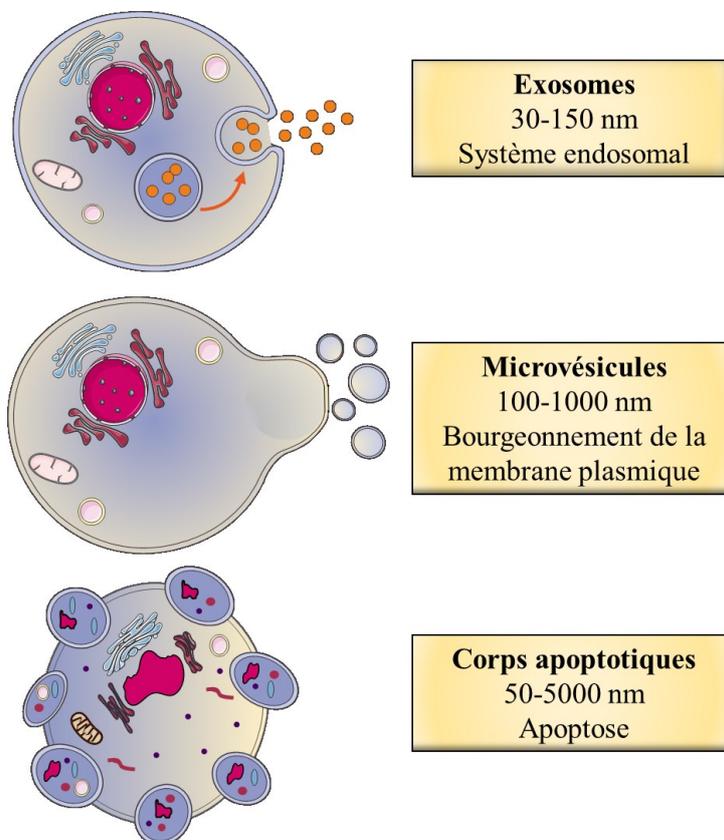


Figure 1 : Classification des vésicules extracellulaires (EVs) selon leur mode de biogenèse, adapté de [4].

Les EVs sont indispensables pour assurer la communication intercellulaire *via* le transport de biomolécules telles que des protéines, des acides nucléiques ou des lipides [5] (**Figure 2**). Les EVs contiennent également des micro-acides ribonucléiques (ARN) [6]. En effet, des protéines de liaison à l'ARN comme la protéine argonaute 2 (Ago2) ou la protéine de liaison Y-box 1 (YBX-1) permettent le recrutement de micro-ARN dans les EVs [6].

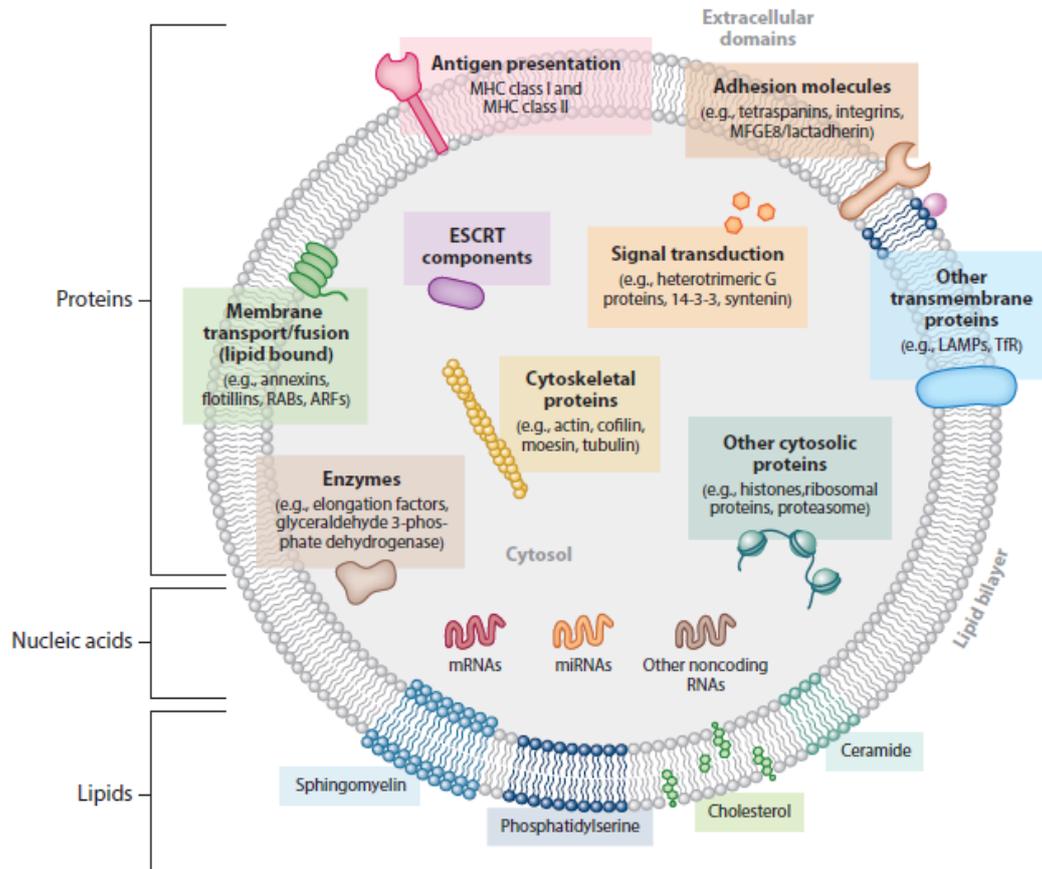


Figure 2 : Composition biomoléculaire des vésicules extracellulaires (EVs) [7].

Chaque classe d'EVs est caractérisée par la présence de marqueurs spécifiques membranaires ou intra vésiculaires. Ainsi, les exosomes peuvent être caractérisés par la présence de tétraspanines transmembranaires telles que CD63, CD81 ou CD9, des protéines *ALG-2 interacting protein X* (Alix) et *tumor susceptibility gene 101* (TSG101) ou encore certaines protéines de choc thermique (HSPA8, HSP90AA1) [8]. L'*International Society for Extracellular Vesicles* (ISEV) a d'ailleurs publié récemment des recommandations pour la caractérisation de chaque sous-catégorie d'EVs [9].

2. Biogenèse des EVs

Chaque sous-catégorie d'EVs va être produite à partir d'une cellule sécrétrice par un mécanisme cellulaire spécifique (**Figure 3**).

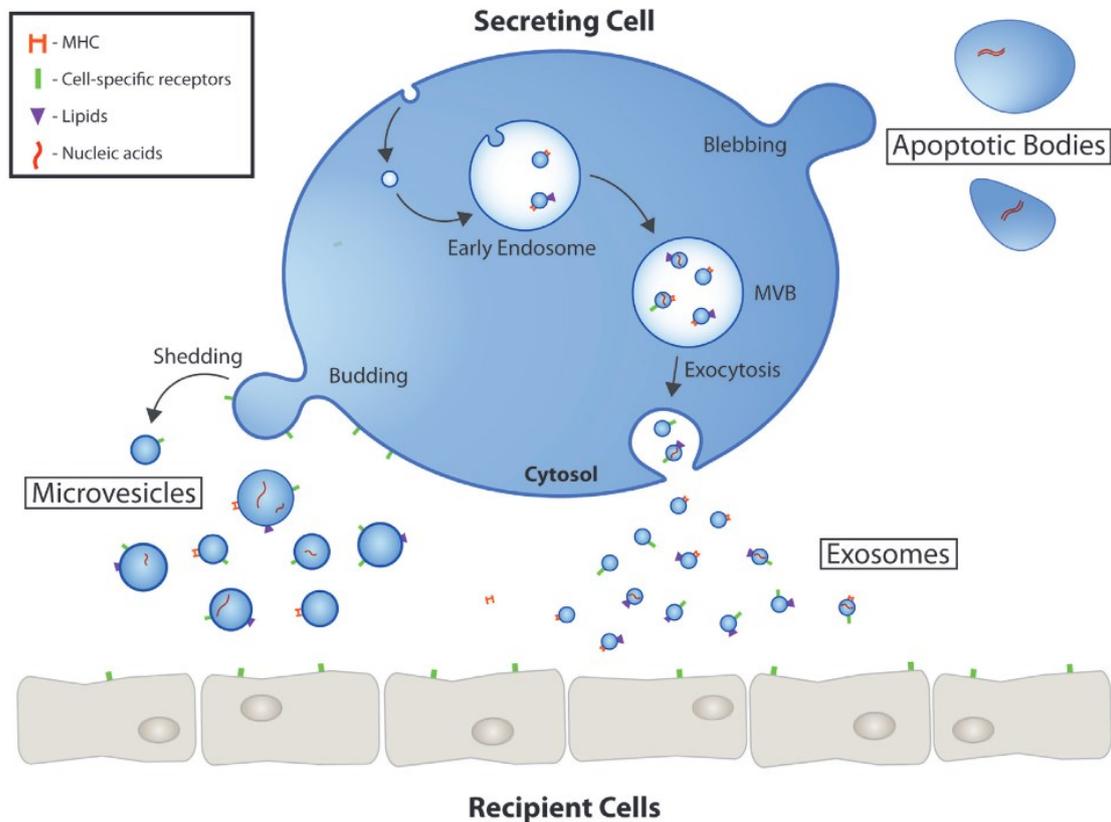


Figure 3 : Représentation schématique de la biogenèse des différentes sous-catégories de vésicules extracellulaires (EVs) : exosomes, microvésicules et corps apoptotiques [10].

2.1. Biogenèse des exosomes

Les exosomes sont produits à partir du système endosomal impliquant différentes protéines. De façon simplifiée, les exosomes vont être formés à partir d'endosomes tardifs : la membrane endosomale s'invagine permettant ainsi la formation de vésicules intraluminales au sein de corps multivésiculaires [11]. La fusion de ces corps multivésiculaires avec la membrane plasmique permet ensuite la libération des exosomes dans l'espace extracellulaire (**Figure 3**) [11].

De façon plus spécifique, deux voies de production des exosomes existent à partir du système endosomal : une voie dépendante d'un complexe protéique appelé *endosomal sorting complex required for transport* (ESCRT) et une voie indépendante de l'ESCRT mais céramide dépendante [12].

La voie dépendante de l'ESCRT implique quatre complexes protéiques (ESCRT-0, I, II, III) associés au complexe ATPase-*vacuolar protein sorting-associated protein 4* (Vps4) permettant ainsi de fournir l'énergie nécessaire à la biogenèse des exosomes (**Figure 4**) [11]. Une courbure négative de la membrane endosomale permet d'initier la formation des vésicules intraluminales *via* la reconnaissance de protéines endosomales ubiquitinylées par le complexe protéique ESCRT-0 [12]. Puis, ESCRT-0 recrute le complexe ESCRT-I composé entre autres des protéines TSG101 et Vps28 [12]. ESCRT-II et -III interagissent ensuite avec ESCRT-0 et ESCRT-I ce qui permet le bourgeonnement des vésicules intraluminales dans les corps multivésiculaires [12]. Enfin, le complexe AAA ATPase Vps4 va permettre la séparation d'ESCRT-III de la membrane endosomale et le recyclage du complexe ESCRT [12].

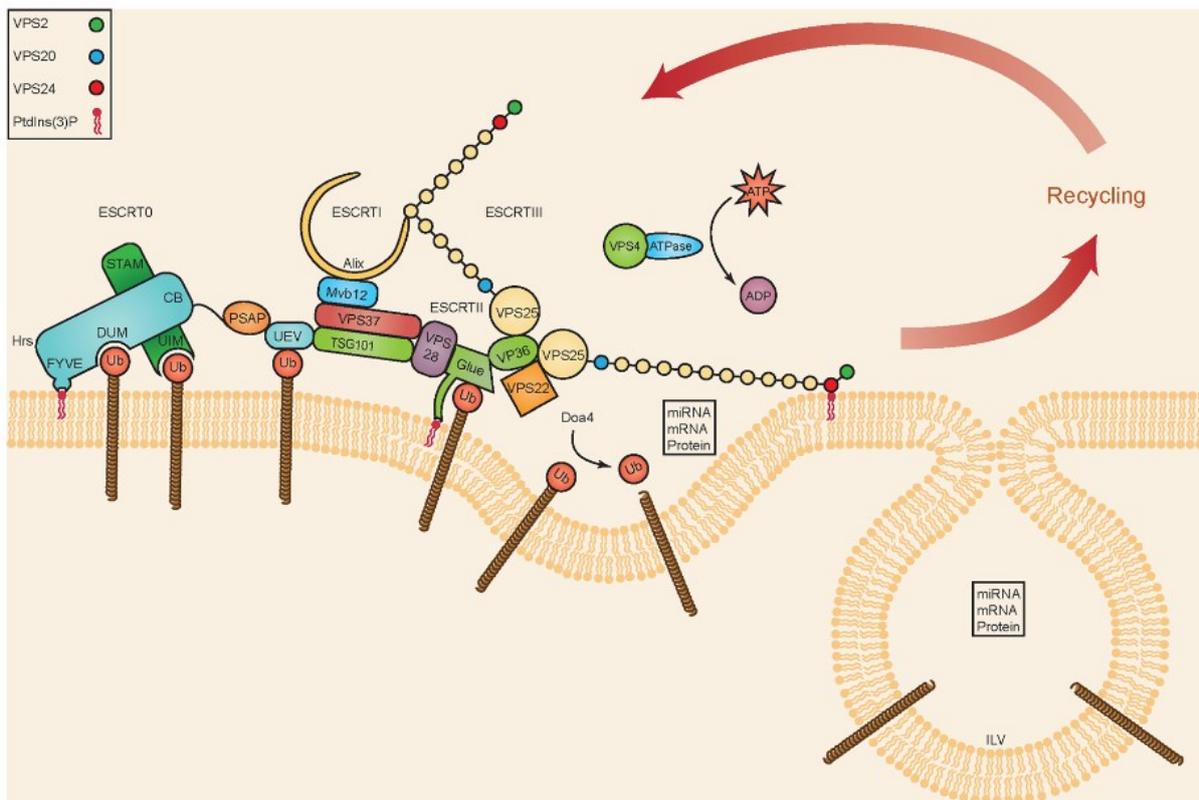


Figure 4 : Rôle clé du complexe *endosomal sorting complex required for transport* (ESCRT) dans la biogenèse des exosomes [13].

La voie indépendante de l'ESCRT nécessite la présence de radeaux (« *rafts* ») lipidiques au sein de la membrane de l'endosome tardif induisant ainsi une courbure négative de la membrane endosomale [3]. En effet, ces micro domaines sont enrichis en molécules coniques telles que des céramides ou des acides lysophosphatidiques [14] mais également en cholestérol et en protéines enzymatiques telles que la sphingomyéline phosphodiesterase 3 (SMPD3) [15]. L'enzyme SMPD3 va notamment permettre l'hydrolyse de la sphingomyéline en céramide qui s'accumule alors et favorise ainsi le bourgeonnement des vésicules intraluminales (**Figure 5**) [15]. Kapustin *et al.* ont d'ailleurs mis en évidence un rôle clé de cette enzyme dans la biogenèse et la sécrétion d'exosomes [16]. En effet, une inhibition de SMPD3 par un agent pharmacologique (GW4869) réduit significativement la sécrétion d'exosomes de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) [16].

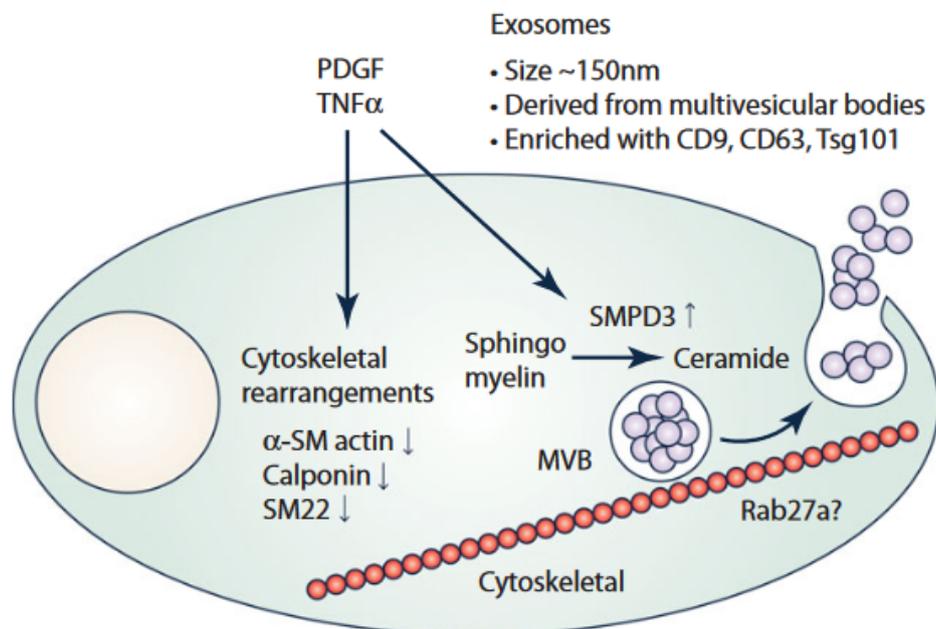


Figure 5 : Rôle de la sphingomyéline phosphodiesterase 3 (SMPD3) dans la biogenèse des exosomes [17].

2.2. Biogenèse des microvésicules

Les microvésicules sont produites directement à partir d'un bourgeonnement de la membrane plasmique de la cellule sécrétrice (**Figure 3**). Différentes protéines sont activées telles que des calpaïnes ou des translocases lipidiques entraînant une perturbation de l'interaction entre le cytosquelette et la membrane plasmique [3]. Une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium va également permettre l'externalisation de la phosphatidylsérine, le bourgeonnement membranaire et la libération des microvésicules dans l'espace extracellulaire [18].

2.3. Biogenèse des corps apoptotiques

La biogenèse des corps apoptotiques est très similaire à celle des microvésicules. En revanche, les corps apoptotiques sont produits uniquement lors de l'apoptose [3], mort cellulaire génétiquement programmée, permettant d'assurer un état d'homéostasie cellulaire.

3. Sécrétion et devenir des EVs

Différentes biomolécules sont impliquées dans la sécrétion des EVs et plus particulièrement des exosomes. Par exemple, les membres de la famille des *Ras-related proteins in brain* (Rab) sont des régulateurs essentiels de la sécrétion des exosomes [7]. Cette famille regroupe plus de 60 GTPases impliquées dans le bourgeonnement vésiculaire, l'interaction avec le cytosquelette ou le transport vers la membrane plasmique [7]. La première protéine Rab reconnue pour être impliquée dans la sécrétion des exosomes est la protéine Rab11 [19]. Il a ainsi été montré que son inhibition entraîne une diminution de la sécrétion d'exosomes d'une lignée cellulaire de leucémie myéloïde immortalisée humaine K-562 [19].

D'autres molécules sont impliquées dans la sécrétion des EVs. Par exemple, les *soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein (SNAP) receptors* (SNAREs) forment un complexe avec les protéines SNAP entre les membranes de deux organites intracellulaires permettant ainsi leur fusion [7]. Une autre protéine, la *diacyl glycerol kinase α* (DGK α), régule négativement la sécrétion des exosomes et plus spécifiquement la formation des corps multivésiculaires [20]. En effet, Alonso *et al.* ont montré qu'une surexpression de cette protéine entraîne une inhibition de la sécrétion d'exosomes CD63/LAMP1 de lymphocytes T [21]. A l'inverse, son inhibition augmente la sécrétion d'exosomes [21]. Une autre kinase, la *citron rho-interacting serine/threonine kinase* (CIT), est également impliquée dans l'exocytose des endosomes tardifs [22] ainsi que la sous-unité V0 de l'ATPase-V qui permet la fusion des corps multivésiculaires avec la membrane plasmique [23].

Une fois sécrétées, les EVs vont interagir avec la cellule réceptrice *via* différents mécanismes [5] (**Figure 6**) et induire différentes réponses intracellulaires. Les EVs peuvent ainsi médier leurs effets en se liant à la surface de la cellule réceptrice soit par une interaction entre un récepteur et un ligand spécifique [5] soit en se liant à la membrane plasmique *via* des protéoglycanes, des composants de la matrice extracellulaire tels que la fibronectine ou la laminine mais aussi *via* des intégrines [5]. En effet, les EVs expriment à leur surface des molécules d'adhésion intercellulaires (ICAM) qui peuvent interagir avec les intégrines membranaires de la cellule réceptrice [5].

La membrane des EVs peut également fusionner avec la membrane cellulaire permettant ainsi la libération du contenu des EVs dans le cytoplasme de la cellule réceptrice [5]. Les biomolécules d'EVs (protéines, peptides, acides nucléiques, micro-ARN) ainsi libérées vont alors induire de multiples réponses intracellulaires qui seront différentes selon l'origine cellulaire des EVs mais également le type de la cellule réceptrice [5].

Les EVs peuvent également être internalisées par macropinocytose, phagocytose ou endocytose [24]. Par exemple, une interaction entre la phosphatidylsérine de la membrane des exosomes et la protéine lactadhérine présente à la surface de cellules immunitaires induira l'internalisation des exosomes et l'activation de la cellule immunitaire [25].

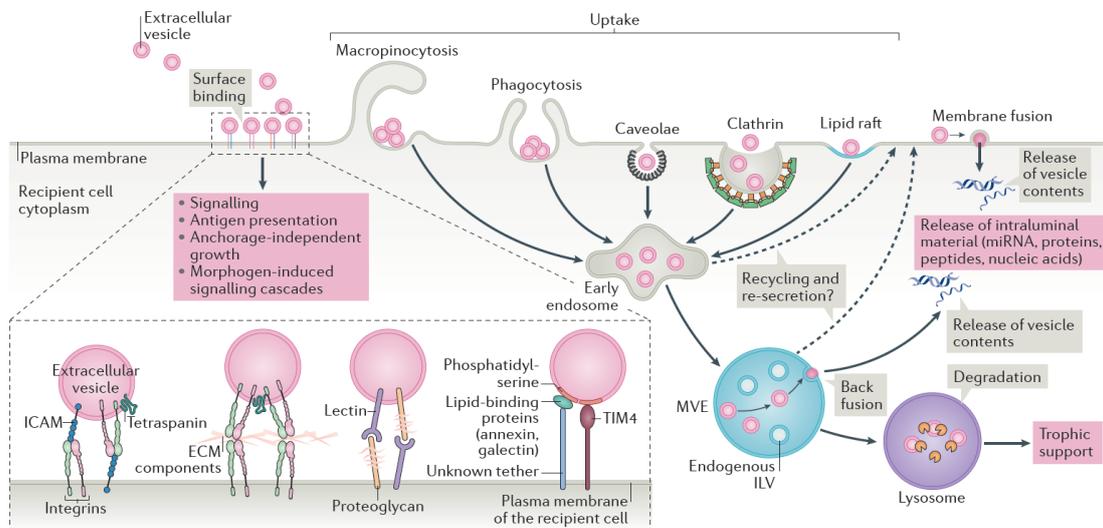


Figure 6 : Différents types d'interaction des vésicules extracellulaires (EVs) avec la cellule réceptrice [5].

4. Rôle de l'autophagie dans la biogenèse et la sécrétion des EVs

L'autophagie est un processus physiologique d'autoprotection mis en place par la cellule afin de permettre la dégradation de composants intracellulaires [26]. De nombreux complexes protéiques sont impliqués dans les mécanismes d'autophagie et notamment dans la macroautophagie, principale forme d'autophagie de la cellule (**Figure 7**) [26]. L'étape d'initiation permet la formation du site d'assemblage du phagophore grâce notamment à la protéine *UNC51-like kinase 1* (ULK1) [26]. L'étape de nucléation fait intervenir entre autres la protéine beclin-1 [26]. Puis, l'élongation de la membrane du phagophore a lieu grâce aux protéines ATG (*autophagy-related protein*) et LC3 (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*) [26]. La membrane de l'autophagosome ainsi formé fusionne avec celle du lysosome permettant ainsi la formation de l'autolysosome et la dégradation de différents composants intracellulaires [26].

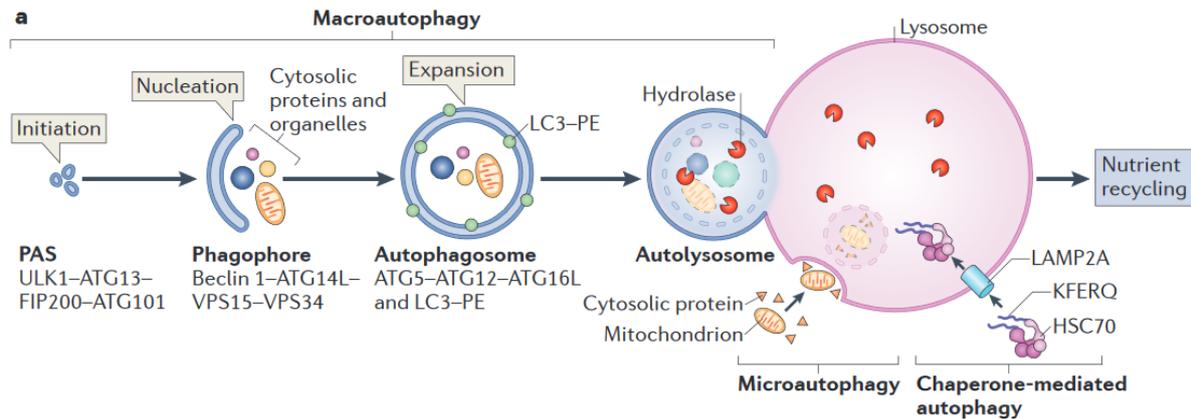


Figure 7 : Schéma des principales protéines impliquées dans les mécanismes d'autophagie [26].

Des études récentes ont montré qu'il existait un lien entre la biogenèse, la sécrétion des EVs et les mécanismes d'autophagie. En effet, la formation de l'autolysosome et la biogenèse des EVs partagent des voies moléculaires similaires [27]. Ainsi, les protéines ATG et LC3 sont capables de réguler la biogenèse des EVs et leur sécrétion [27]. Par exemple, ATG5 permet la dissociation de la pompe à proton ATPase Vps4 des corps multivésiculaires ce qui favorise la fusion de la membrane du corps multivésiculaire avec la membrane plasmique et la sécrétion des exosomes dans le milieu extracellulaire [27].

5. Fonctions biologiques des EVs

Les EVs ont différentes fonctions biologiques selon leur origine cellulaire, leur sous-type mais également l'hétérogénéité de leur contenu. Ces EVs sont ainsi capables de transmettre différents signaux aux cellules environnantes, qui en retour induisent des réponses intracellulaires multiples. Dans des conditions physiologiques, ces EVs permettent de maintenir un état d'homéostasie cellulaire. De par leur rôle dans la communication intercellulaire, les EVs sont impliquées dans différents mécanismes physiologiques : l'angiogenèse, la coagulation, le stress oxydant, la réparation tissulaire, l'apoptose ou encore l'immunité [2] (**Figure 8**).

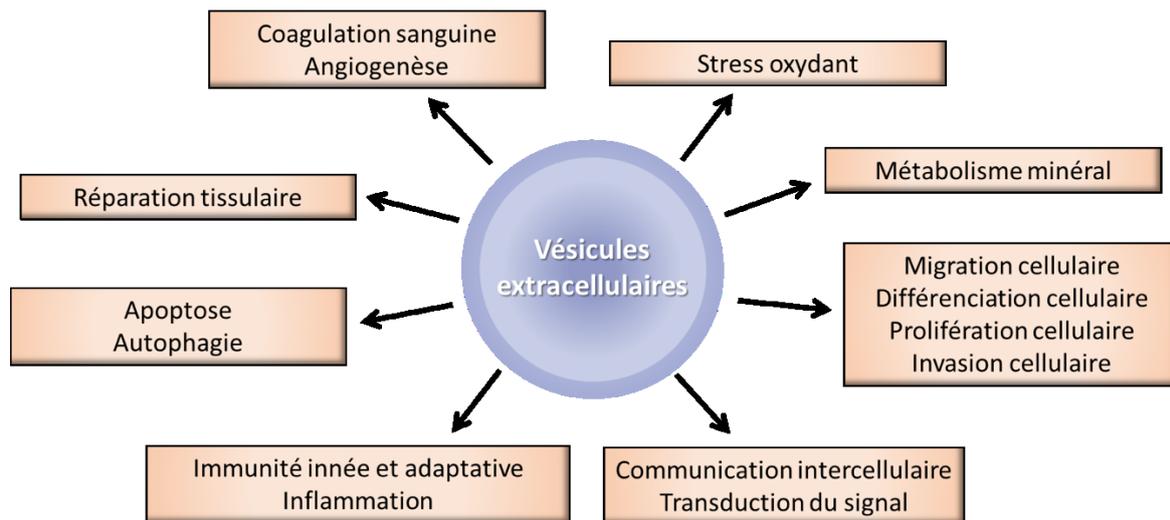


Figure 8 : Fonctions biologiques des vésicules extracellulaires (EVs), adapté de [4].

5.1. Rôles physiologiques des EVs en fonction de leur origine cellulaire

Les EVs sont sécrétées par de nombreux types cellulaires (cellules endothéliales, sanguines, immunitaires, osseuses) mais également par des cellules progénitrices telles que les cellules souches mésenchymateuses (CSM). Par conséquent, des fonctions biologiques différentes sont observées en fonction de l'origine cellulaire des EVs.

Les EVs provenant de **cellules endothéliales** sont essentielles pour assurer l'homéostasie vasculaire et notamment l'angiogenèse, la néo-vascularisation ou encore la régénération des tissus vasculaires [28–30]. De plus, ces EVs sont capables d'augmenter la perméabilité vasculaire en régulant les jonctions intercellulaires *via* le cytosquelette [29]. En effet, ces EVs induisent la phosphorylation des chaînes légères de la myosine entraînant ainsi une réorganisation des fibres contractiles [29].

Les EVs sécrétées par les **plaquettes sanguines** vont être impliquées également dans l'angiogenèse mais aussi dans la coagulation, les réponses immunitaires, la régénération cellulaire et tissulaire [31,32]. Ces EVs sont les plus abondantes dans la circulation sanguine [31]. Elles possèdent également un rôle dans l'apoptose [32] car elles peuvent notamment encapsuler la caspase-3, protéine essentielle de l'apoptose, assurant ainsi l'homéostasie cellulaire en évitant l'induction d'un stress cellulaire [32].

Les **CMLV** sécrètent également des EVs qui seront, quant à elles, impliquées dans les processus de remodelage vasculaire mais également dans la migration et la prolifération cellulaire [33,17]. Les exosomes sécrétés par les CMLV sont notamment enrichis en micro-ARN tels que le miR-143 permettant ainsi la régulation de l'adhésion cellulaire [17].

Différentes **cellules immunitaires** sécrètent également des EVs telles que les neutrophiles ou les leucocytes. Ces EVs ont un rôle majeur dans le maintien de la perméabilité de la barrière endothéliale [34,35]. Deux classes d'EVs de neutrophiles existent : les *neutrophil-derived trails* (NDTRs) et les *neutrophil-derived microvesicles* (NDMVs) [36]. Les NDTRs sont sécrétés par des neutrophiles adhérant à l'endothélium et exercent des fonctions pro-inflammatoires en guidant les cellules immunitaires vers les foyers inflammatoires [36]. A l'inverse, les NDMVs qui sont produits par des neutrophiles circulants ont plutôt des effets anti-inflammatoires en inhibant notamment l'activation des macrophages [36].

Les EVs sécrétées par les **cellules osseuses** régulent différents mécanismes physiologiques tels que le remodelage et la régénération osseuse [37,38]. Ces EVs permettent notamment d'assurer la communication intercellulaire entre les ostéoblastes et les ostéoclastes [38]. En effet, les ostéoclastes sécrètent des exosomes contenant un micro-ARN, le miR-214-3p, capable d'inhiber l'activité ostéoblastique [39,40]. En utilisant une lignée cellulaire précurseur d'ostéoblastes (MC3T3), Cui *et al.* ont montré que des exosomes sécrétés par ces cellules contiennent différents micro-ARN ostéogéniques qui favorisent la différenciation ostéoblastique d'une lignée de cellules stromales mésenchymateuses ST2 [41].

De nombreuses études se sont également intéressées aux rôles physiologiques des EVs produites par les **cellules progénitrices** telles que les CSM. En effet, les CSM possèdent de nombreux intérêts thérapeutiques en médecine régénérative ou dans le traitement de diverses pathologies humaines mais impliquent également de nombreuses limites en pratique clinique en termes notamment d'immunogénicité et de compatibilité donneur-receveur. Les EVs sécrétées par ces cellules sont donc d'un grand intérêt car elles permettraient de s'affranchir de ces limites thérapeutiques [42]. Diverses études ont ainsi mis en évidence des effets immuno modulateurs, anti-inflammatoires et régénérateurs des EVs de CSM [42].

Ainsi, l'origine cellulaire des EVs est extrêmement importante, car différents effets biologiques peuvent être observés au niveau de la cellule réceptrice. De plus, il est important de rappeler que les EVs sécrétées par une cellule peuvent exercer leurs fonctions physiologiques sur cette même cellule sécrétrice permettant ainsi une autorégulation cellulaire.

5.2. Rôles des EVs dans les systèmes immunitaire et cardiovasculaire

a) EVs et système immunitaire

Les EVs ont un rôle majeur dans le système immunitaire que ce soit dans l'immunité innée ou adaptative [2]. En effet, ces EVs agissent comme messagers paracrines et permettent d'induire des réponses pro- ou anti-inflammatoires en fonction du contexte physiopathologique [2].

De nombreuses études ont mis en évidence la capacité de ces EVs à transporter une grande variété de cytokines telles que le *transforming growth factor- β* (TGF- β), l'interleukine-1 β (IL-1 β) ou le *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) [43,44]. Les EVs peuvent également contenir des agonistes aux récepteurs *toll-like* (TLRs) impliqués dans différentes voies de signalisation, telles que la voie *nuclear factor-kappa B* (NF- κ B), essentielle à la régulation du système immunitaire [2]. De plus, différentes études indiquent un lien entre la sécrétion d'EVs et l'activation de l'inflammasome, complexe protéique intracellulaire régulant les réponses inflammatoires de cellules immunitaires telles que les macrophages ou les cellules dendritiques [45]. Les EVs ont aussi un rôle dans la présentation antigénique *via* l'expression à leur surface de peptides du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II [46] (**Figure 9**).

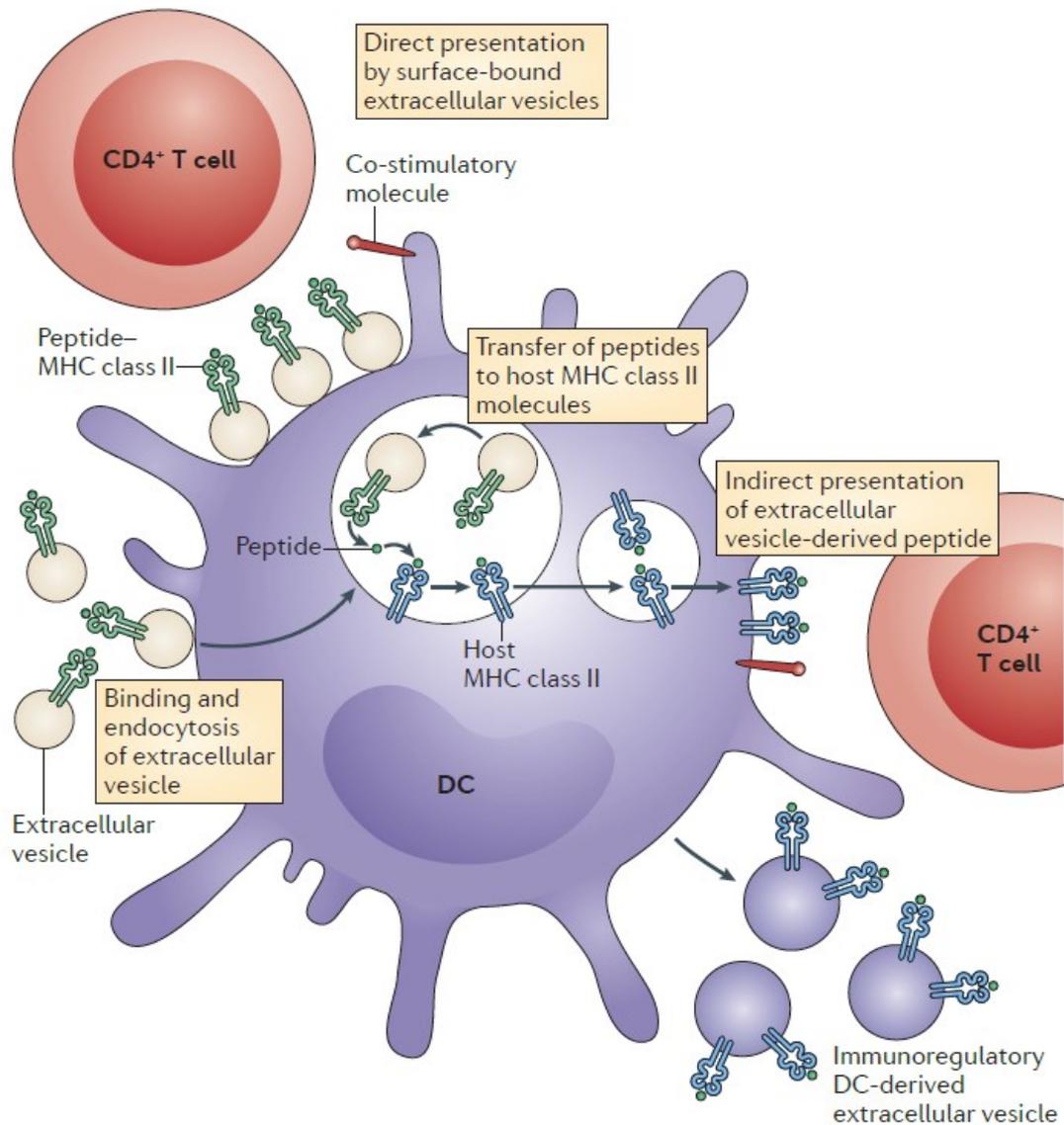


Figure 9 : Rôle des vésicules extracellulaires (EVs) dans la présentation antigénique [46].

Les EVs sont également médiatrices de réponses anti-inflammatoires [2]. Une étude de Hiemstra *et al.* a mis en évidence un rôle majeur des exosomes dans l'immunité innée [47]. Les auteurs ont ainsi montré la présence de protéines antimicrobiennes, de récepteurs viraux et bactériens au sein d'exosomes urinaires humains [47]. Ces exosomes sont capables notamment d'inhiber le développement de bactéries pathogènes et commensales comme *Escherichia coli* et d'induire la lyse bactérienne [47].

b) EVs et système cardiovasculaire

De nombreuses études ont démontré un rôle essentiel des EVs dans la régulation de la physiologie du système cardiovasculaire [48]. En effet, les EVs sont sécrétées par divers types cellulaires du système cardiovasculaire tels que les plaquettes, les cardiomyocytes, les cellules progénitrices cardiaques, les cellules endothéliales, les monocytes ou encore les CMLV [48]. Ces EVs sont impliquées dans différents mécanismes physiologiques tels que la maturation réticulocytaire, l'angiogenèse ou la coagulation sanguine [2]. Elles peuvent être à la fois médiatrices de réponses pro- ou anticoagulantes en fonction de leur origine cellulaire mais également de leur contenu [2]. De plus, les EVs sont capables d'exercer des effets protecteurs sur le système cardiovasculaire [48] (**Figure 10**). En effet, elles contiennent de nombreuses biomolécules et sont particulièrement enrichies en micro-ARN qui régulent différents mécanismes au niveau vasculaire tels que l'apoptose, le stress oxydant ou encore la prolifération cellulaire [48].

Origin cells	Model(s)	Mediator(s)	Biological Effects
Mouse CPCs	Mouse I/R; H9c2	miRNA-451	Reduction of apoptosis; protection from oxidative stress
Mouse CPCs	H9c2	miRNA-21; PDCD4	Protection from apoptosis
Human CPCs	Rat I/R;	PAPP-A; IGF-1; Akt-ERK1/2 signaling	Reduction of apoptosis; reduction of scar size; improvement of cardiac function
Human CPCs	Rat I/R	GATA4/MESP1	Reduction of apoptosis; improvement of cardiac function; angiogenesis
Human CDCs	Mouse MI	miRNA-146a	Inhibition of apoptosis; increased vital mass
Human CDCs	Rat and Pig I/R	miRNA-181b	Reduction of infarct size; improvement of cardiac function
Human CDCs	Pig acute and chronic MI	Alterations of pro-inflammatory and pro-fibrotic pathways	Reduction of infarct size; reduction of scar size; improvement of cardiac function
Rat MSCs	Rat I/R; H9c2	AMPK/mTOR and Akt/mTOR pathway	Increase autophagy; reduction of apoptosis; reduction of infarct size
Rat MSCs	Rat I/R	miRNA-26a; Cx43 expression; GSK3 β inactivation	Reduction of infarct size
Human P-EVs	Rat I/R; ECs	VEGF-PDGF-bFGF; RISK pathway	EC proliferation; angiogenesis
Rat P-EVs	Rat I/R	Increase of circulating EVs	Improved cardiac function
Rat P-EVs	Rat I/R	Decrease of caspase-3, 12	Reduction of infarct size
Human ECs	Mouse	miRNA-143; miRNA-145	Reduction of atherosclerosis
Human ECs	ECs	miRNA-214	Stimulation of angiogenesis and migration
ECs	Mouse I/R	miRNA-210; miRNA-126	Improvement of cardiac function
Human ECs	Primary cardiomyocytes	ERK1/2 pathway	Reduction of cell death

Figure 10 : Effets protecteurs des vésicules extracellulaires (EVs) sur le système cardiovasculaire [48].

CPCs : cellules progénitrices cardiaques, CDCs : cellules dérivées de cardiosphère, MSCs : cellules souches mésenchymateuses, P-EVs : vésicules extracellulaires dérivées des plaquettes, ECs : cellules endothéliales, I/R : ischémie/reperfusion.

II. Les EVs dans un contexte pathologique : l'insuffisance rénale chronique (IRC)

1. L'insuffisance rénale chronique (IRC)

1.1. Épidémiologie et facteurs de risque

L'insuffisance rénale chronique (IRC) est devenu un réel problème de santé publique dans le monde. En effet, en France, les dépenses de santé pour les patients atteints d'IRC représentent 2 % des dépenses totales de santé, soit presque 2 milliards d'euros [49].

La prévalence de la maladie est de plus en plus importante dans la population générale [50]. Une méta-analyse réalisée au sein de l'Université d'Oxford a mis en évidence une prévalence mondiale de 13,4 % (11,7 – 15,1 %) tous stades confondus [50]. En France, environ 5 % de la population est atteinte d'IRC, soit plus de 3 millions de Français [51]. Selon le rapport annuel 2019 du Réseau Épidémiologique et Information en Néphrologie (R.E.I.N.), 11 437 nouveaux patients atteints d'IRC ont été recensés et 8 826 décès ont été enregistrés, soit 9,8 % des patients, avec un âge médian de 76 ans [52].

Différents facteurs de risque augmentent la probabilité de développer une IRC [53] : l'âge, le sexe, l'ethnicité, l'obésité, le diabète, l'hypertension, le tabac, les naissances prématurées, le statut socioéconomique ... Identifier et comprendre les facteurs de risques sous-jacents à cette pathologie reste indispensable car cela permettrait d'améliorer le diagnostic et la prise en charge des patients.

1.2. Définition, classification

L'IRC est une pathologie se caractérisant par une perte progressive et irréversible des fonctions rénales avec des conséquences majeures pour la santé du patient.

Les reins jouent un rôle essentiel dans le bon fonctionnement de l'organisme. En effet, leur principale fonction est la filtration du sang et l'épuration des déchets *via* l'urine. Les reins sont formés de deux régions anatomiques distinctes : le cortex rénal et la médullaire rénale (**Figure 11**). Le rein est constitué d'un million de néphrons où la filtration du sang et la production de l'urine ont lieu.

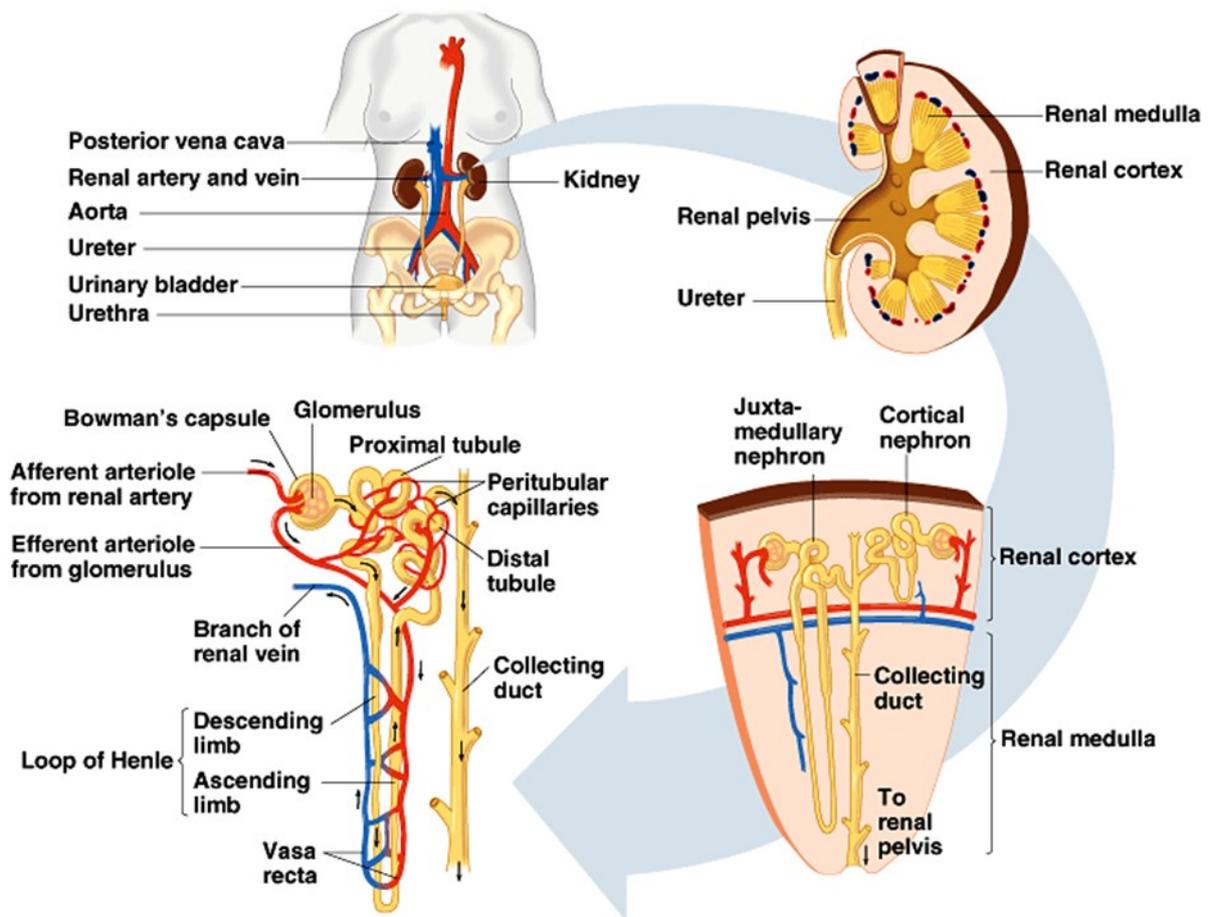


Figure 11 : Localisation et structure anatomique du rein chez l'Homme.

(<https://nephro.unistra.fr/84>)

Le rein permet également le maintien de l'équilibre électrolytique et la régulation de différentes fonctions biologiques grâce à la sécrétion d'hormones spécifiques. Les reins sécrètent la rénine, hormone impliquée dans le contrôle de la pression artérielle, l'érythropoïétine permettant la production d'hématies ou encore le calcitriol régulant les concentrations sanguines de calcium et de phosphate.

Au vu du rôle majeur du rein dans différentes fonctions de l'organisme, les patients atteints d'IRC vont présenter une accumulation importante de déchets métaboliques ce qui va aboutir à l'apparition de nombreuses complications comme des troubles cardiovasculaires, osseux ou neurologiques.

Il existe différents stades de maladies rénales définis en fonction du débit de filtration glomérulaire (DFG) et de l'albuminurie (**Figure 12**) [54]. Le DFG correspond au volume de plasma filtré par le rein par unité de temps. L'albuminurie est définie par la présence d'albumine dans les urines. L'IRC est caractérisée par un DFG inférieur à 60 ml/min/1,73 m² depuis plus de 3 mois ainsi que des taux élevés d'albuminurie (stade 3 à 5) [54].

				Persistent Albuminuria Categories, Description and Range		
				Normal to mildly increased	Moderately increased	Severely increased
				<30 mg/g (<3 mg/mmol)	30-300 mg/g (3-30 mg/mmol)	>300 mg/g (>30 mg/mmol)
GFR Categories (mL/min/1.73 m ²) Stage, Description, and Range	1	Normal or high	≥90	1 if CKD	1	2
	2	Mildly decreased	60–89	1 if CKD	1	2
	3a	Mildly to moderately decreased	45–59	1	2	3
	3b	Moderately to severely decreased	30–44	2	3	3
	4	Severely decreased	15–29	3	3	4+
	5	Kidney failure	<15	4+	4+	4+

Figure 12 : Différents stades de maladies rénales définis en fonction du débit de filtration glomérulaire (DFG) et de l'albuminurie [55].

1.3. Symptômes

L'apparition des symptômes chez les patients atteints d'IRC survient à un stade avancé ce qui complique le dépistage de la pathologie. Ces patients vont présenter différents symptômes peu caractéristiques (liste non-exhaustive) [56] : nausée, vomissements, perte d'appétit et de poids, pollakiurie, polyurie, oligurie, anurie, urines plus foncées, troubles, fatigue à l'effort, troubles du sommeil, hypertension, crampes musculaires, anémie ...

1.4. Physiopathologie

a) Généralités

La physiopathologie de l'IRC est complexe du fait de l'implication de différents mécanismes dans la progression de la maladie. De façon simplifiée, la progression de l'IRC peut être définie en trois grandes phases (**Figure 13**) [57]. La première phase est l'induction d'une lésion ischémique au niveau rénal dont les principales causes sont le diabète et l'hypertension artérielle [58]. Puis, la deuxième phase est l'apparition d'une fibrose rénale définie par une accumulation excessive de matrice extracellulaire dans le rein [57]. Enfin, la dernière phase correspond à une perte de la majorité des néphrons fonctionnels entraînant ainsi une insuffisance rénale et donc la nécessité de mettre en place un traitement de suppléance chez le patient [57].

Le volume sanguin et les apports en oxygène sont diminués entraînant ainsi l'apparition de lésions ischémiques au niveau rénal. Des infiltrats de cellules immunitaires telles que des macrophages sont retrouvés favorisant ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires et de facteurs de croissance tels que le TGF- β [59]. Ces facteurs de croissance favorisent la différenciation des cellules mésangiales en mésangioblastes. Ces cellules activées vont alors entraîner une production importante de matrice extracellulaire au niveau rénal [60]. Différentes voies de signalisation intracellulaire sont impliquées telles que la voie *Mothers against decapentaplegic homolog* (SMAD)-TGF- β qui joue un rôle majeur dans les mécanismes de fibrose [60].

Puis, des lésions tissulaires sont observées menant à une glomérulosclérose caractérisée par une diminution importante du nombre de néphrons fonctionnels, une diminution de la filtration sanguine et une accumulation de toxines urémiques.

D'autres causes de l'IRC existent telles que les glomérulonéphrites, la maladie rénale polykystique ou certaines maladies auto-immunes comme le lupus, la polyarthrite rhumatoïde ou la maladie de Crohn. La prise de médicaments à long terme ou certaines chimiothérapies peuvent également favoriser l'apparition d'une IRC.

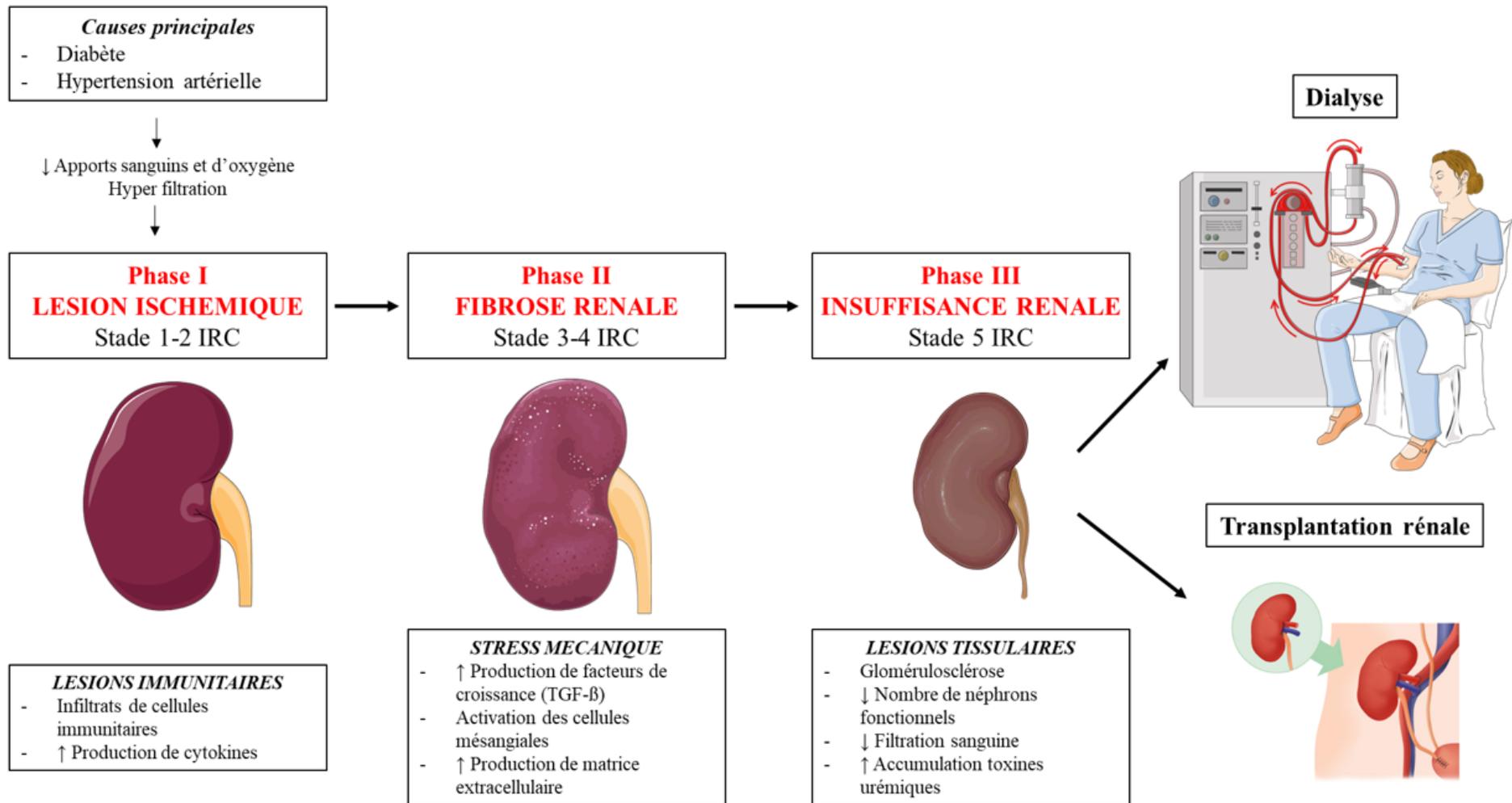


Figure 13 : Les principales phases physiopathologiques de l'insuffisance rénale chronique (IRC).

b) Focus sur les mécanismes d'inflammation et de stress oxydant dans l'IRC

La progression de l'IRC est fortement associée à un état pro-inflammatoire et pro-oxydant, responsable de nombreuses complications chez les patients telles que l'athérosclérose, les troubles cardiovasculaires, mais également la malnutrition, l'anémie ou encore les désordres du métabolisme osseux [61].

Chez les patients atteints d'IRC, la production importante de cytokines pro-inflammatoires, l'acidose, les infections à répétitions, la dysbiose intestinale et l'altération du métabolisme du tissu adipeux favorisent l'apparition d'une inflammation persistante de bas grade [62]. Les principaux marqueurs d'inflammation impliqués dans la progression de la maladie sont l'IL-1, l'IL-6, le TNF- α , les adipokines, l'ICAM-1, la molécule d'adhésion vasculaire-1 (VCAM-1), le CD40 ligand et la protéine C-réactive (CRP) [61]. Les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- α sont corrélées positivement avec la sévérité de l'IRC. En effet, ces molécules favorisent l'état pro-inflammatoire chez les patients [61].

Les patients atteints d'IRC sont également exposés à une endotoxémie plus élevée [63]. La dysbiose intestinale et l'augmentation de la perméabilité intestinale retrouvée chez ces patients entraînent une augmentation de la concentration sanguine d'endotoxines telles que le lipopolysaccharide (LPS) [63]. Cette endotoxémie élevée favorise la production de cytokines pro-inflammatoires chez les patients IRC entraînant ainsi une activation des réponses immunitaires innées (**Figure 14**) [64].

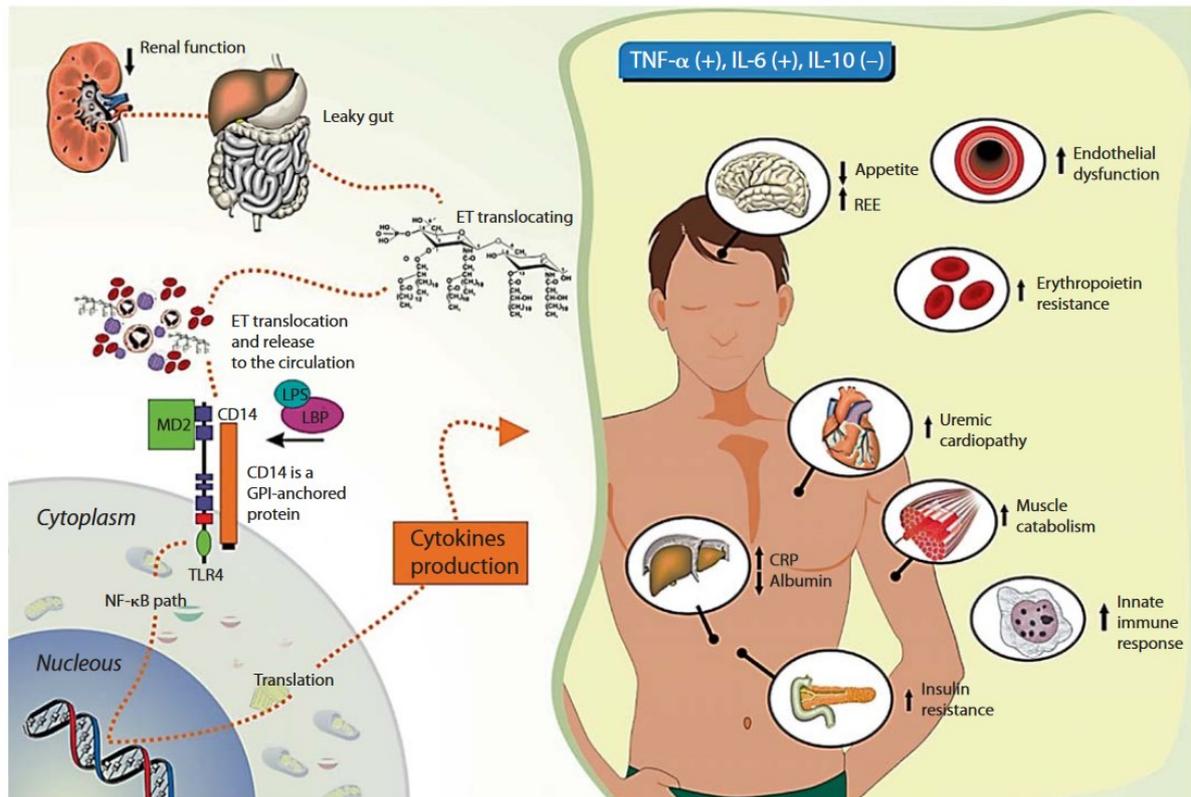


Figure 14 : Endotoxémie et insuffisance rénale chronique (IRC) [64].

ET : endotoxines, REE : dépenses énergétiques au repos.

Le stress oxydant représente un facteur de risque non-traditionnel de l'IRC (**Figure 15**) [61]. Des niveaux de stress oxydant importants sont retrouvés dès les stades précoces de l'IRC [65]. Au niveau rénal, le stress oxydant est responsable d'une détérioration progressive de la fonction rénale menant à une ischémie, des lésions glomérulaires ainsi qu'une apoptose importante [61]. Une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) favorise également la dégradation de différentes molécules biologiques (protéines, acides nucléiques, lipides ...) affectant ainsi l'homéostasie cellulaire au niveau rénal. En effet, l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sont des ROS précurseurs de différentes molécules ayant un pouvoir oxydant plus important telles que le peroxyde d'azote ($ONOO^-$) produit suite au couplage de l' $O_2^{\cdot-}$ et du monoxyde d'azote (NO) [61].

Différents marqueurs de stress oxydant, comme le malondialdéhyde (MDA), les produits de glycation avancés (AGEs) ou les lipoprotéines de faible densité (LDL) oxydées sont significativement augmentés dans la circulation sanguine et dans les tissus des patients atteints d'IRC [61]. Les AGEs interagissent avec les récepteurs RAGE favorisant ainsi l'activation de la voie NF-κB et donc la production de cytokines pro-inflammatoires et de molécules d'adhésion [66].

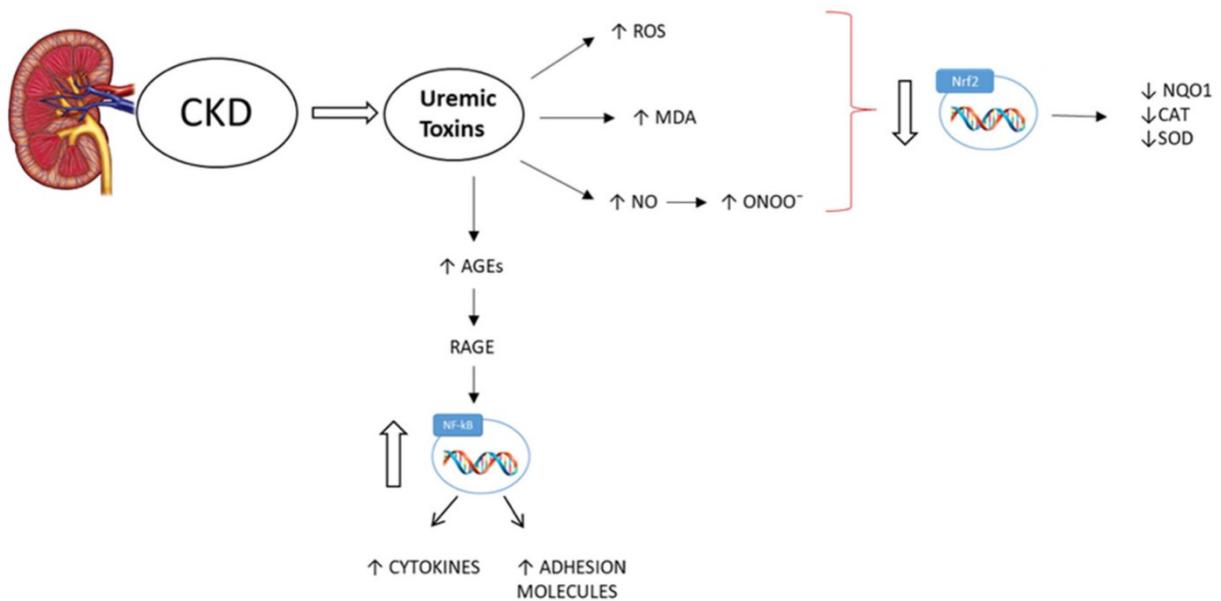


Figure 15 : Stress oxydant et insuffisance rénale chronique (IRC) [61].

c) *Toxines urémiques*

Les toxines urémiques sont des composés qui s'accumulent dans les fluides corporels des patients atteints d'IRC en raison d'une détérioration des fonctions de filtration et d'excrétion du rein. L'*European Uremic Toxin Work Group* (EUTox) fournit aux chercheurs et aux cliniciens de nombreuses informations sur ces toxines urémiques accumulées au cours de l'IRC [67]. La majorité d'entre elles sont associées à des troubles cardiovasculaires et néphrologiques.

Les toxines urémiques peuvent être classées en trois groupes en fonction de leurs propriétés biochimiques et physiques. La première classe est constituée de solutés de faible masse moléculaire, solubles dans l'eau comme l'urée par exemple. La deuxième classe comprend les composés de taille moyenne comme la 2-microglobuline. Enfin, dans la troisième classe, on retrouve les molécules liées aux protéines telles que l'indoxyl sulfate (IS), toxine très étudiée au cours de l'IRC. L'homocystéine, toxine urémique liée aux protéines, est également impliquée dans la physiopathologie de l'IRC.

❖ L'indoxyl sulfate (IS)

L'IS, toxine urémique liée aux protéines, est synthétisé dans le foie à partir d'un précurseur indole dérivant lui-même du métabolisme du tryptophane (**Figure 16**). Ce composé possède une affinité élevée avec différentes protéines, en particulier avec l'albumine conduisant ainsi à une diminution de sa filtration glomérulaire. Une augmentation de la concentration d'IS dans l'urine et le sérum est observée chez les patients atteints d'IRC [68–70]. L'accumulation de cette toxine représente un facteur prédictif de la progression de l'IRC et est impliquée dans la physiopathologie de l'IRC (**Figure 16**).

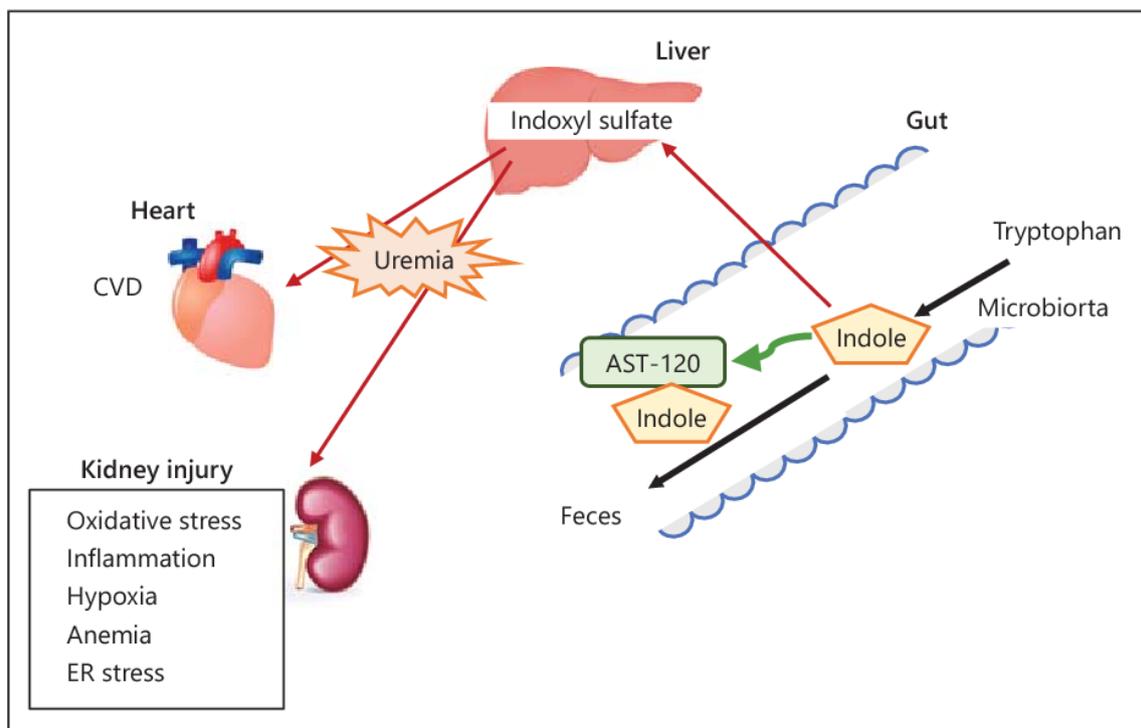


Figure 16 : Effets de l'indoxyl sulfate (IS) sur la perte de fonction rénale observée au cours de l'insuffisance rénale chronique (IRC) [71].

Selon la base de données EUTox, la concentration totale plasmatique d'IS est d'environ 0,54 mg/L en conditions physiologiques et de 37,07 mg/L en conditions urémiques. De plus, une corrélation négative existe entre les concentrations sériques d'IS et le DFG chez les patients atteints d'IRC (**Figure 17**) [72]. Effectivement, plus le DFG est faible et plus l'IS s'accumule chez les patients [72].

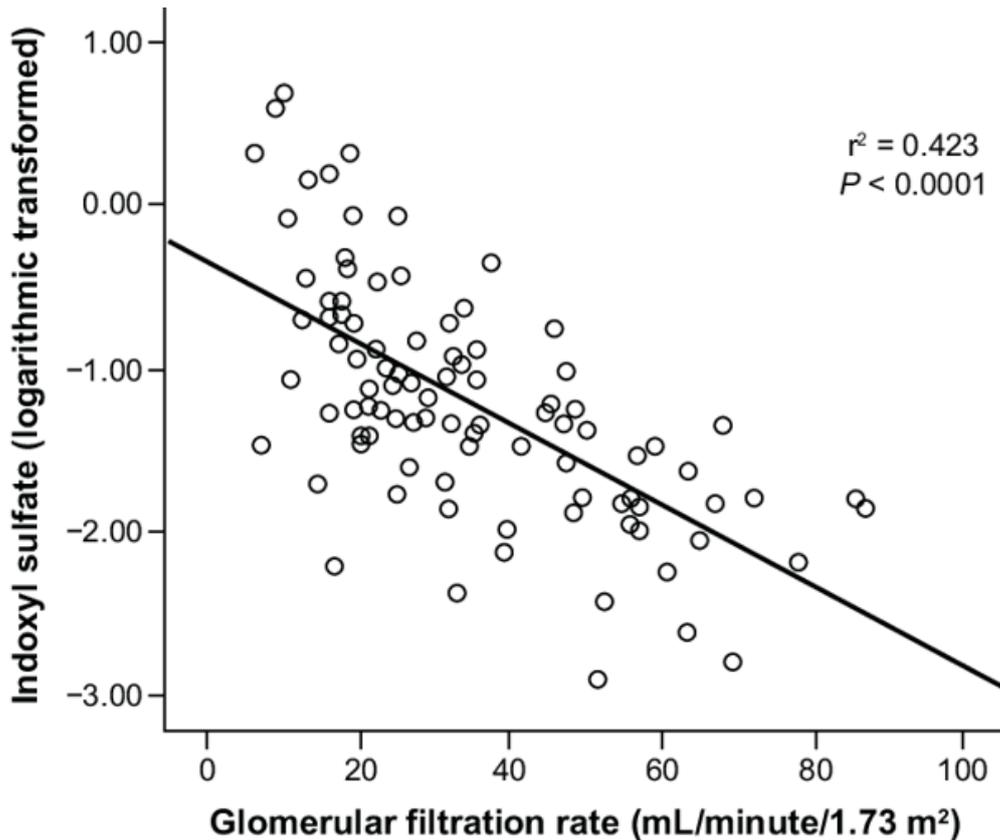


Figure 17 : Corrélation négative entre la concentration d'indoxyl sulfate (IS) et le débit de filtration glomérulaire (DFG) [72].

Différentes études ont montré des effets délétères de l'IS dans des modèles expérimentaux d'IRC (**Tableau 1**). Ceci nous permet de mieux comprendre les effets physiopathologiques de l'accumulation des toxines urémiques chez les patients atteints d'IRC. En effet, ces toxines sont capables d'induire des réponses pro-inflammatoires et pro-oxydantes en augmentant notamment la production de ROS [73,74] responsables de la survenue de lésions dans des cellules tubulaires rénales, glomérulaires et interstitielles, observées au cours de l'IRC. De plus, l'IS est capable de réguler négativement la voie antioxydante impliquant le couple *nuclear factor (erythroid-2-related factor)-2/Kelch-like ECH associating protein-1* (Nrf2/Keap1) [75].

CKD experimental models	Effects of IS	Mechanisms of action	Ref
<i>IN VIVO</i>			
5/6 nephrectomized rats	Enhancement of glomerular sclerosis progression	↑ Serum creatinine levels ↑ Blood urea nitrogen levels ↓ Creatinine, inulin and p-aminohippuric acid clearance	[68]
	Stimulation of renal fibrosis	↑ ICAM-1 gene expression involved in monocyte infiltration ↑ TGF-β1 kidney production ↑ Renal gene expression of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) and type 1 collagen	[76]
	Enhancement of CKD progression	↓ Organic anion uptake of IS by OAT1 and OAT3 transporters in proximal tubular cells → IS accumulation in blood	[77]
FVB/N mice	Renal microvascular injury Glomerular damage Podocyte injury	Macroscopic cortical atrophy Interstitial fibrosis Ischemic changes Aryl hydrocarbon receptor (AhR) activation	[78]
½ nephrectomized rats	Stimulation of renal fibrosis <i>via</i> an epigenetic regulation	Induction of oxidative stress Upregulation of DNMT expression Splicing of Klotho gene	[79]
<i>IN VITRO</i>			
Cultured mouse proximal tubular cells	Induction of fibrosis	↑ TGF-β1 cell synthesis	[77]
	Stimulation of cellular inflammation	↑ Inflammatory gene expression	[80]
Renal tubular cells of CKD kidney basolateral membrane	IS effects mediated <i>via</i> OAT1 and OAT3 transporters	Detection of IS in OAT1 and OAT3 positive area Correlation with serum creatinine levels	[81]
Mouse primary osteoblasts and bone marrow cells	↓ Bone formation ↓ Bone resorption	↓ Osterix (Osx), osteocalcin, bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) expression ↓ Mineralized bone nodule formation ↓ Osteoclast formation <i>via</i> RANKL inhibition	[82]
Primary rat renal mesangial cells	Induction of oxidative stress	↑ ROS production ↑ Intracellular hydroxyl radical production	[83]

Tableau 1 : Effets de l'indoxy sulfate (IS) dans des modèles expérimentaux d'insuffisance rénale chronique (IRC).

❖ L'homocystéine

L'homocystéine est un acide aminé non protéinogène issu du métabolisme d'un acide aminé essentiel, la méthionine (**Figure 18**) [84]. L'homocystéine est impliquée dans différentes voies métaboliques : une voie de re-méthylation, une voie de trans-méthylation ainsi qu'une voie de trans-sulfuration [84]. Comme l'IS, l'homocystéine est une toxine urémique liée aux protéines. Cette toxine s'accumule dans le plasma et les tissus des patients IRC et selon la base de données EUTox, sa concentration plasmatique physiologique qui est de 1,26 à 1,88 mg/L passe alors de 4,40 à 26,40 mg/L en conditions urémiques.

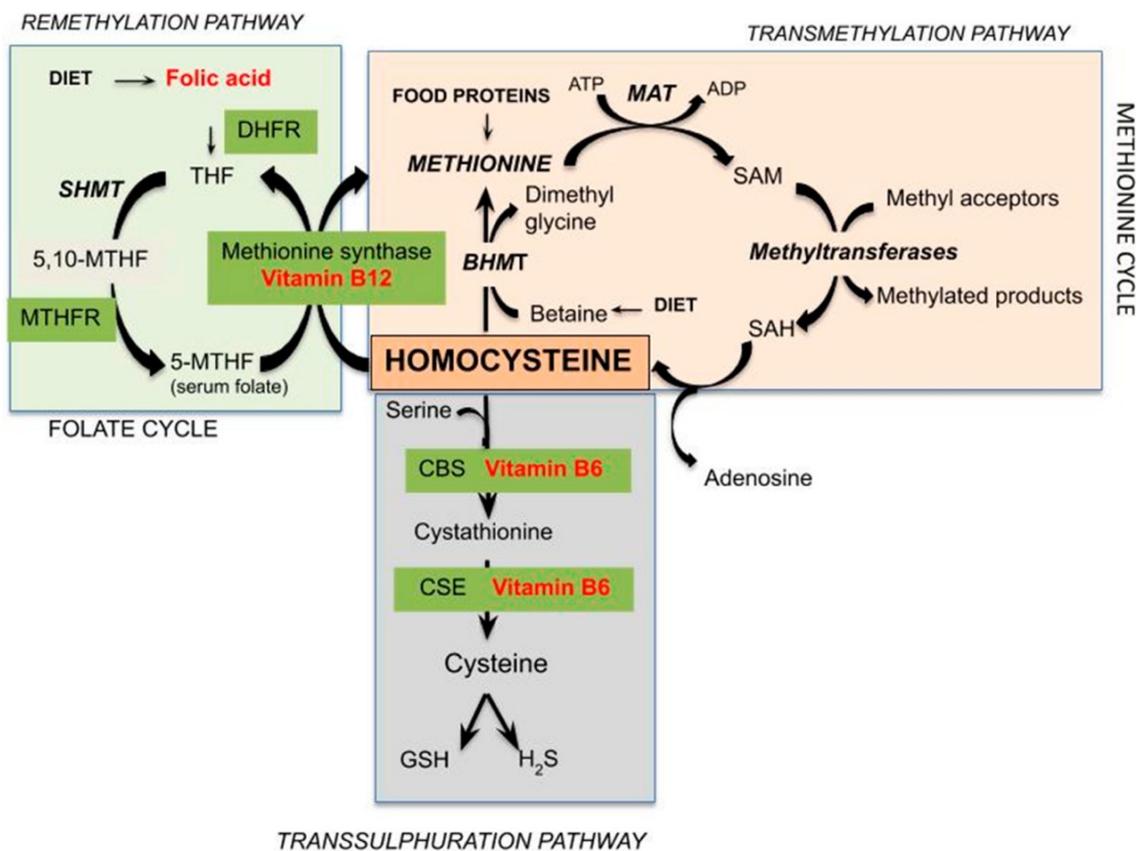


Figure 18 : Représentation schématique des différentes voies du métabolisme de l'homocystéine [84].

De nombreuses études cliniques ont montré que l'hyperhomocystéinémie est un facteur de risque avéré de maladies cardiovasculaires et de mortalité chez les patients IRC [85]. L'accumulation d'homocystéine favorise une dérégulation des mécanismes redox en augmentant non seulement la production des ROS *via* l'activation de NADPH oxydases telles que Nox2 ou Nox4 mais également en inhibant l'activité d'enzymes antioxydantes telles que les superoxydes dismutases (SOD) [85].

Cette augmentation de stress oxydant entraîne une dysfonction endothéliale et une fibrose au niveau rénal *via* une augmentation de la synthèse de collagène [85,86]. Par conséquent, l'hyperhomocystéinémie favorise la glomérulosclérose et la perte des fonctions rénales avec notamment des changements phénotypiques importants au niveau des podocytes, cellules épithéliales formant la capsule de Bowman du glomérule rénal (**Figure 19**) [85].

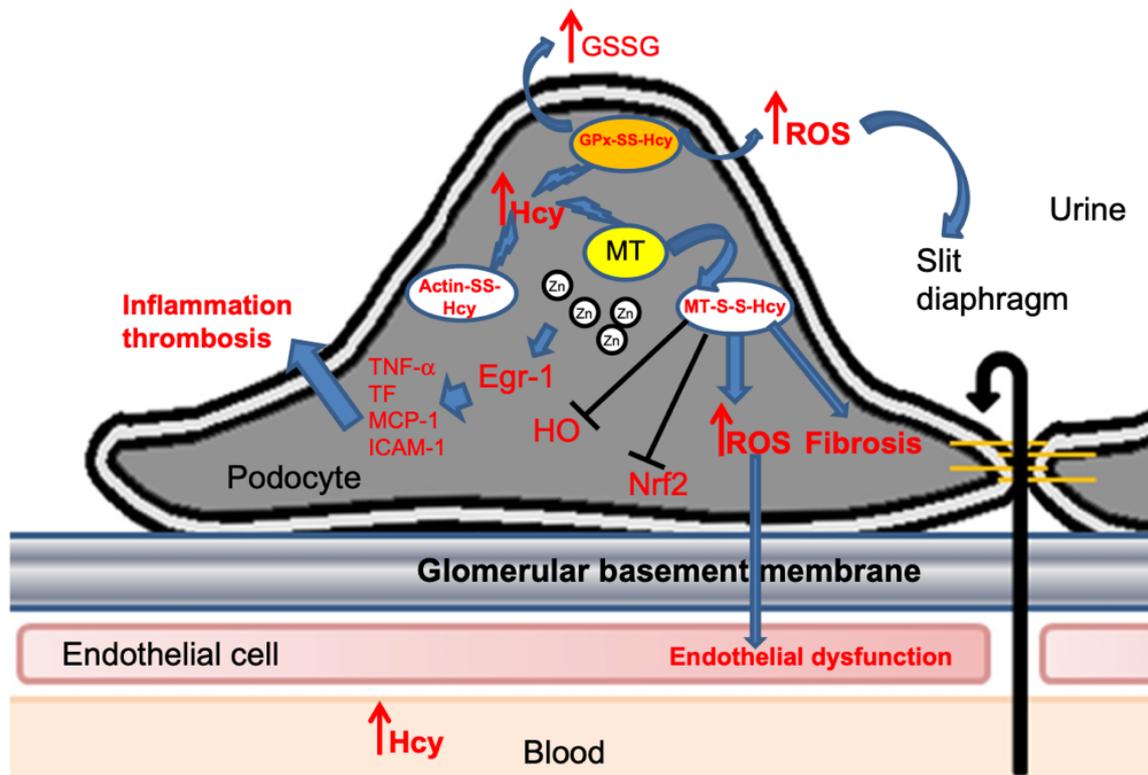


Figure 19 : Effets de l'hyperhomocystéinémie sur la fonction des podocytes [85].

En plus du stress oxydant, l'hyperhomocystéinémie favorise également un état inflammatoire important en augmentant de façon significative la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-8 et la *C-C Motif Chemokine Ligand 2* (CCL2) au sein de cellules endothéliales [86]. Au niveau rénal, l'hyperhomocystéinémie est également impliquée dans des phénomènes de thrombose, de vasoconstriction et dans la détérioration des vaisseaux [85]. Un rôle important de l'homocystéine dans les mécanismes d'athérosclérose existe également [86]. En effet, l'hyperhomocystéinémie induit un stress oxydant important, une dysfonction endothéliale et une thrombose favorisant la survenue d'athérosclérose [86].

2. Les calcifications vasculaires (CV) au cours de l'IRC

2.1. Épidémiologie

Les calcifications vasculaires (CV) étant une complication commune à différentes pathologies, il est difficile d'établir la prévalence exacte de ces CV dans la population générale. Cependant, de nombreuses études épidémiologiques et des méta-analyses ont permis de mettre en évidence des différences de prévalence des CV entre de multiples cohortes d'individus. Par exemple, la *Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis* (MESA) a montré que la prévalence des calcifications des artères coronariennes (CAC) était plus élevée chez les hommes que chez les femmes dans une cohorte de 6 814 individus de différentes origines, âgés de 45 à 84 ans [87]. De plus, une prévalence plus importante a été retrouvée chez les Caucasiens en comparaison aux individus d'origine Africaine, Hispanique ou Chinoise [87].

Différentes études se sont intéressées à la prévalence des CV chez les patients atteints d'IRC. Ainsi, une étude a mis en évidence une prévalence de CV 2 à 3 fois plus importante chez des patients atteints d'IRC au stade 4 en comparaison aux individus sains (**Figure 20**) [88]. De plus, le traitement par hémodialyse semble augmenter les dépôts de CV chez les patients atteints d'IRC au stade 5 [88].

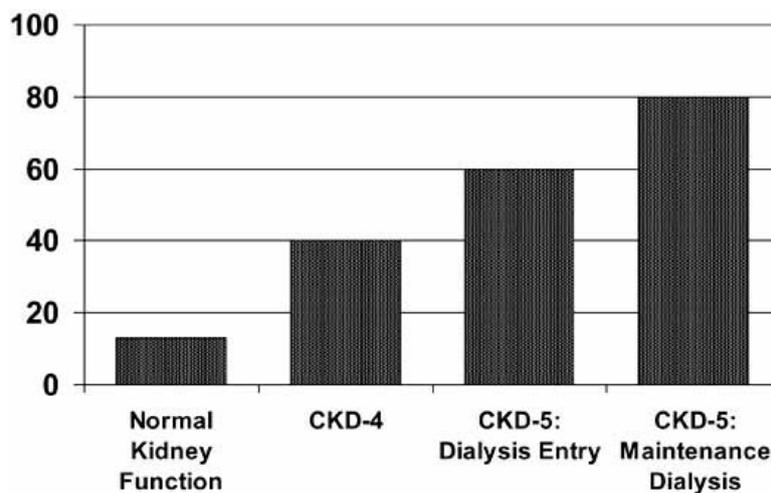


Figure 20 : Prévalence des calcifications vasculaires (CV) chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique (IRC) [88].

Récemment, une méta-analyse a été menée afin d'obtenir une estimation plus précise de la prévalence des CAC chez les patients atteints d'IRC [89]. Cette méta-analyse, incluant un total de 38 études épidémiologiques, a mis en évidence une prévalence des CAC de 60 % chez les patients IRC [89]. De plus, les CAC sont positivement associées à un risque accru d'événements cardiovasculaires et de mortalité chez les patients atteints d'IRC [89].

2.2. *Définition, classification*

Les maladies cardiovasculaires représentent la principale cause de mortalité chez les patients souffrant d'IRC puisqu'elles représentent plus de 50% de la mortalité totale de ces patients IRC avant qu'ils ne développent l'insuffisance rénale terminale. L'IRC conduit non seulement à une athérosclérose accélérée mais également à des calcifications excessives, dont l'étendue semble être liée au risque d'accidents cardiovasculaires.

Les CV représentent une complication commune à différentes pathologies telles que le diabète, l'athérosclérose ou l'IRC. Les CV sont définies par une accumulation hétérotopique de phosphate de calcium formant des cristaux d'hydroxyapatite dans la matrice extracellulaire des vaisseaux sanguins. Les CV représentent un marqueur pronostique important de mortalité chez les patients IRC [90]. Longtemps considérées comme un processus passif et dégénératif, les CV sont désormais reconnues comme résultant d'un mécanisme actif régulé par de nombreuses voies cellulaires et moléculaires similaires à celles retrouvées lors de la minéralisation osseuse (**Figure 21**) [90]. Lors de la CV, de nombreuses cellules vasculaires telles que les CMLV, les myofibroblastes ou encore les péricytes subissent un changement phénotypique [90]. Les CMLV vont notamment se différencier en cellules ostéogéniques similaires à des ostéoblastes ou « ostéoblastes-like » [91].

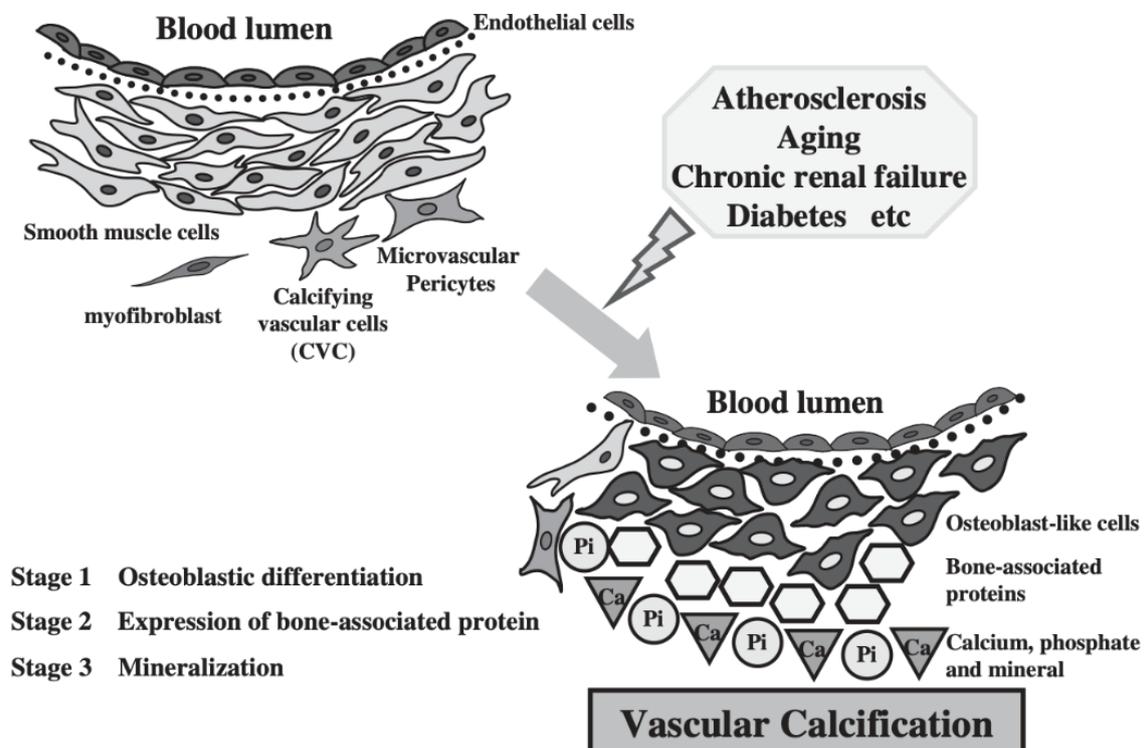


Figure 21 : Principales étapes menant à l'apparition d'une calcification vasculaire (CV) [90].

Cette dédifférenciation cellulaire est accompagnée de variations d'expression de différents facteurs activateurs ou inhibiteurs de la CV tels que la protéine Gla de la matrice (MGP), l'ostéopontine, l'ostéocalcine, la phosphatase alcaline (ALP), les protéines morphogénétiques osseuses (BMP) ou le facteur de transcription lié à Runt 2 (Runx2) (**Figure 22**) [92].

Promoters	Inhibitors
Bone morphogenetic protein (BMP) 2, 4, and 6	Matrix Gla protein (MGP)
Osteocalcin	Osteopontin
Alkaline phosphatase	Osteoprotegerin
(Sex determining region Y)-box 9 (SOX9)	Vitamin K
Osterix	Magnesium
Matrix metalloproteinase (MMP) 2, 3, and 7	Bone morphogenetic protein 7 (BMP7)
Runt-related transcription factor 2 (Runx2)	Fetuin
Calcium	Klotho
Phosphate	Parathyroid hormone (PTH)
Glucose	Pyrophosphate
Advanced glycation end products	Carbonic anhydrase
Oxidized low-density lipoproteins	Collagen IV
Collagen I	Inorganic pyrophosphate (PPi)
Receptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANKL)	

Figure 22 : Principaux facteurs activateurs et inhibiteurs impliqués dans la calcification vasculaire (CV) [92].

Les CV peuvent être retrouvées dans la couche interne des vaisseaux ou intima, mais également dans la média correspondant à la tunique musculaire des vaisseaux sanguins (**Figure 23**) [92]. Les CV présentes au niveau de l'intima sont fortement associées à une dérégulation du métabolisme lipidique, une inflammation chronique et une dédifférenciation des CMLV en cellules « ostéoblastes-like » [92]. La calcification au niveau de la média des vaisseaux, quant à elle, est plutôt associée à une dégradation de l'élastine, un remodelage de la matrice extracellulaire et à une hyperphosphatémie [92]. Cependant, les principaux mécanismes physiopathologiques impliqués restent similaires.

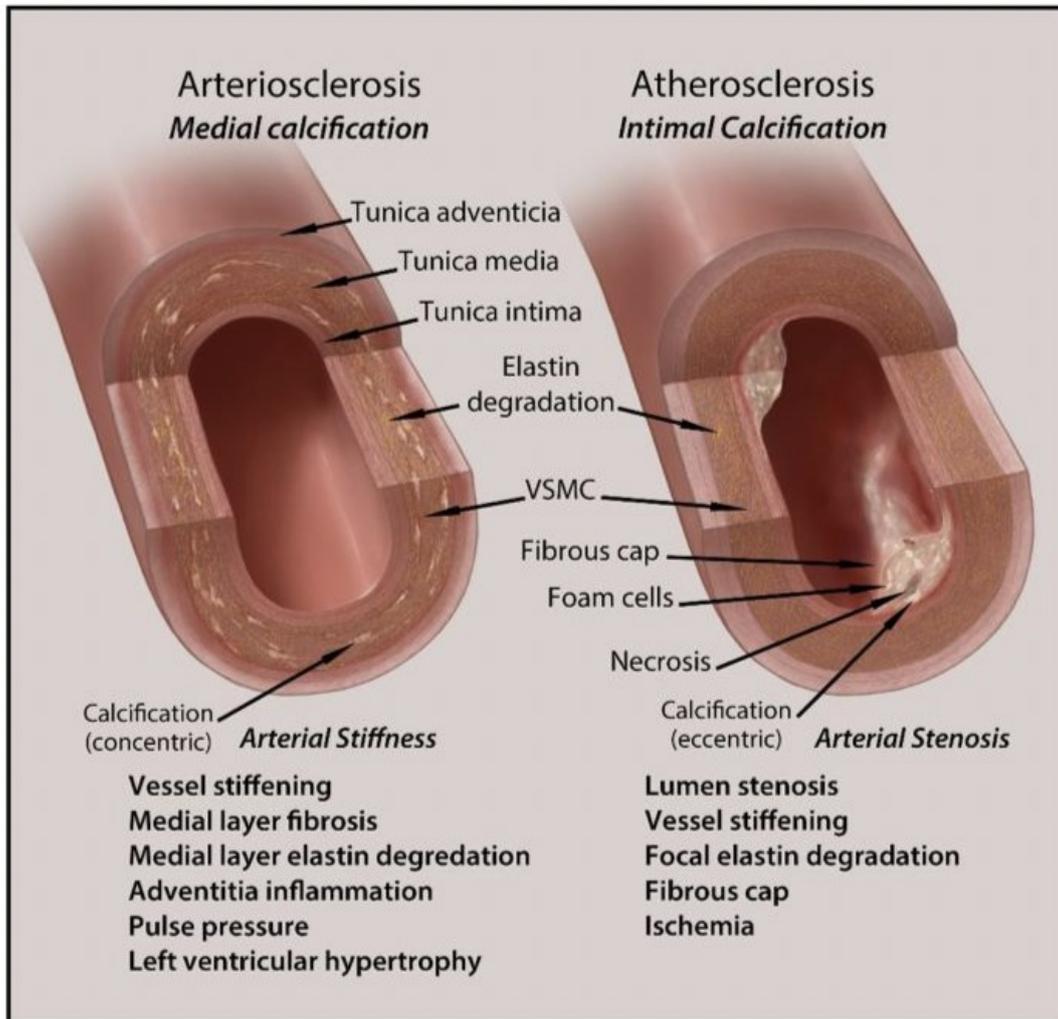


Figure 23 : Représentation schématique des calcifications retrouvées au niveau de la média (à gauche) et de l'intima (à droite) des vaisseaux sanguins [92].

Une autre forme mineure de CV existe : la calciphylaxie ou artériopathie urémique calcifiante [92]. La calciphylaxie représente une forme rare et fatale de CV des artérioles touchant majoritairement les patients au stade final de l'IRC [92]. La calciphylaxie entraîne une nécrose massive des vaisseaux et des tissus, une thrombose et un sepsis chez ces patients. Cependant, les mécanismes physiopathologiques sous-jacents à cette forme de CV ne sont pas encore élucidés étant donné le faible nombre de patients atteints [92].

Il existe également des calcifications valvulaires (**Figure 24**) qui sont significativement associées à une morbidité et une mortalité importantes chez les patients [93]. Cette calcification résulte d'une dérégulation de l'homéostasie tissulaire due à une dégradation de la matrice extracellulaire, une fibrose, une infiltration de cellules immunitaires et une accumulation importante de dépôts lipidiques [93].



Figure 24 : Valve aortique saine (a) et calcifiée (b) [94].

2.3. Facteurs de risque

Différents facteurs de risque favorisent l'apparition d'une CV chez les patients IRC, facteurs qui peuvent être classés en deux groupes : les facteurs de risque traditionnels et non-traditionnels. Les facteurs de risque traditionnels définis par l'étude épidémiologique de Framingham expliquent seulement en partie la prévalence élevée de maladies cardiovasculaires chez les patients IRC [95]. Des facteurs de risque non traditionnels ont alors été définis [95].

Les **facteurs de risque traditionnels** regroupent **l'âge**, le **sexe**, le **tabac**, **l'hypertension**, le **diabète** ainsi que la **dyslipidémie** [96].

L'hypertension est associée au remodelage vasculaire et aux phénomènes d'athérosclérose [96]. En effet, le système rénine-angiotensine, permettant la régulation de la pression artérielle, semblerait être impliqué dans la physiopathologie des CV et notamment dans la croissance, la différenciation ainsi que l'apoptose des CMLV [97].

Le **diabète** représente également un facteur de risque important de développer des CV. En effet, les patients diabétiques présentent des niveaux de CV plus importants que les patients non-diabétiques [98].

De plus, l'incubation de CMLV avec de fortes concentrations de glucose augmente les phénomènes de calcification *via* une augmentation de l'expression de marqueurs ostéogéniques tels que Runx2, BMP-2 et ostéocalcine [98]. Des études *in vivo* ont également mis en évidence un rôle du diabète dans la survenue des CV [96].

La **dyslipidémie** favorise aussi l'apparition des CV. En effet, une hypercholestérolémie ou une hypertriglycéridémie sont associées à une augmentation des mécanismes de minéralisation [96]. De plus, les lipoprotéines de haute densité (HDL) qui possèdent un rôle protecteur, en permettant le transport inverse du cholestérol, inhibent la différenciation ostéogénique des cellules vasculaires [99].

Les **facteurs de risque non traditionnels** tels que le **stress oxydant**, **l'inflammation** persistante, **l'accumulation de toxines urémiques** semblent jouer un rôle important dans la pathogenèse des maladies cardiovasculaires chez les patients IRC [95].

La **dérégulation du métabolisme phosphocalcique** impliquant le phosphate, le calcium, la vitamine D, la parathormone (PTH), ou encore le *Fibroblast Growth Factor 23* (FGF23) joue également un rôle important dans la survenue de ces CV [96,100]. En effet, **l'hyperphosphatémie** et **l'hypercalcémie** sont associées à une augmentation de la mortalité cardiovasculaire chez les patients IRC [96]. De plus, l'hyperphosphatémie favorise la survenue d'une hyperparathyroïdie aggravant les mécanismes de CV chez les patients atteints d'IRC [101]. En effet, l'hyperparathyroïdie est caractérisée par une augmentation anormale de la production de la PTH, hormone régulant les taux de calcium et de phosphate dans le plasma. Des **taux élevés de FGF23** et **d'AGEs** sont également associés à un risque de CV chez les patients atteints d'IRC [96].

2.4. *Physiopathologie*

a) *Généralités*

Les patients atteints d'IRC présentent donc des anomalies de l'homéostasie minérale favorisant l'apparition de CV. La perte de fonction rénale retrouvée chez ces patients associée à une altération des taux sériques et tissulaires de calcium et de phosphate induit différents désordres métaboliques et *in fine* l'apparition d'une CV [92]. D'autres mécanismes cellulaires et moléculaires sont impliqués dans la physiopathologie des CV au cours de l'IRC comme décrit dans la **Figure 25** [92].

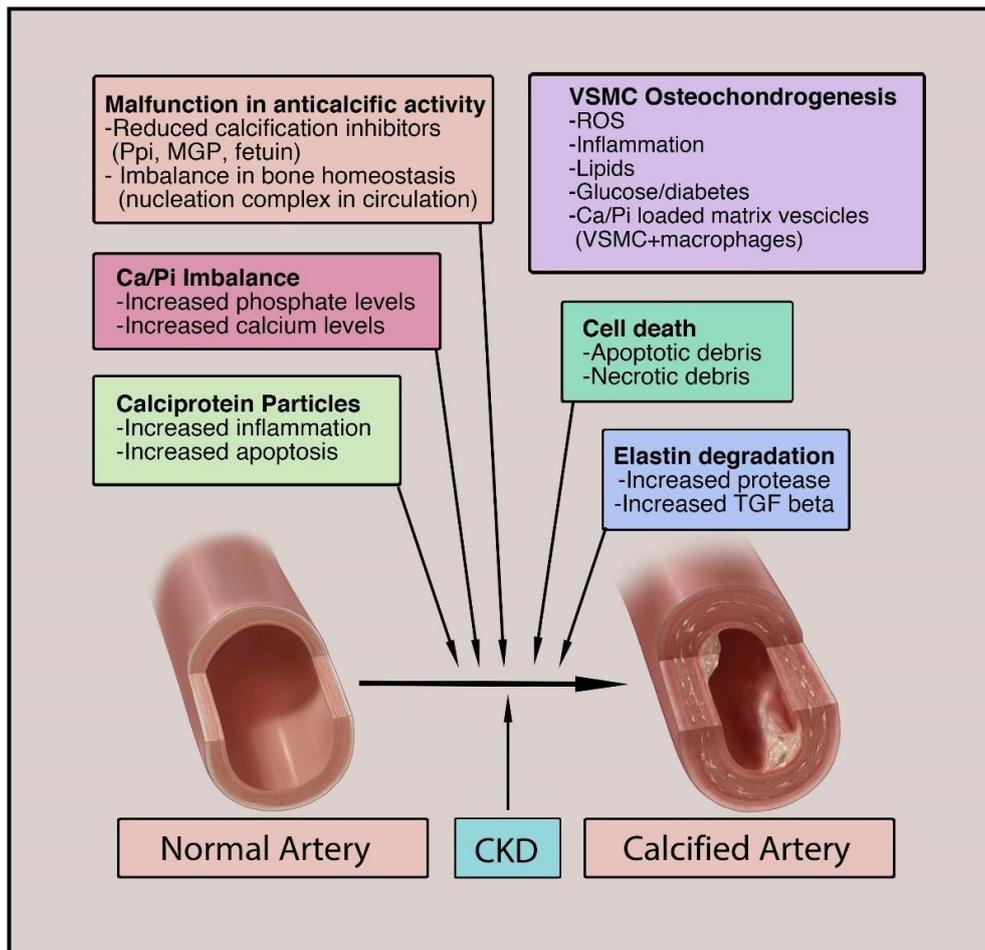


Figure 25 : Mécanismes physiopathologiques impliqués dans les calcifications vasculaires (CV) observées chez les patients atteints d'IRC [92].

b) Différents types cellulaires impliqués

❖ Les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV)

Les principales cellules impliquées dans les mécanismes de CV sont les CMLV. En effet, ces cellules sont capables de changer de phénotype en réponse à divers stimuli (**Figure 26**) [102]. Ainsi, l'IRC favorise la dédifférenciation des CMLV en cellules ostéochondrogéniques [92]. Des états pro-inflammatoires et pro-oxydants, comme observés au cours de l'IRC, entraînent non seulement une augmentation de l'expression de marqueurs ostéogéniques (Runx2, BMP-2 ...) mais également une diminution de l'expression des marqueurs synthétiques tels que l' α -smooth muscle actin (α -SMA) et des inhibiteurs de la calcification (MGP, fetuin-A ...) conduisant alors au changement phénotypique des CMLV [92]. La dérégulation du métabolisme minéral stimule également cette dédifférenciation [92]. Par exemple, des taux élevés de phosphate entraînent une augmentation de l'activité de l'ALP dans les vaisseaux de patients atteints d'IRC favorisant ainsi la différenciation des CMLV en cellules ostéogéniques [103].

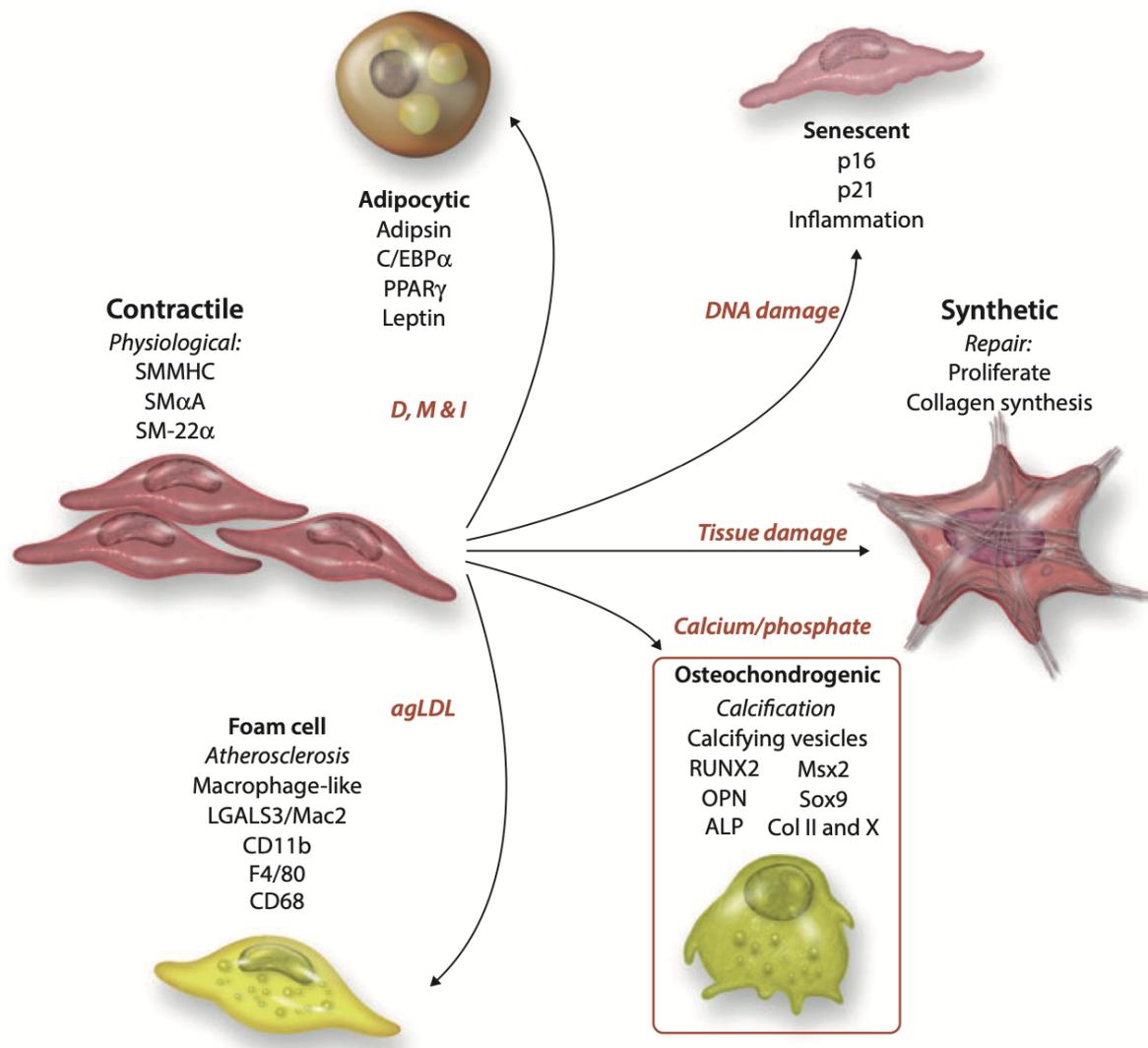


Figure 26 : Différents phénotypes possibles des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) [102].

❖ Les macrophages

Les macrophages jouent également un rôle important dans les mécanismes de CV. En effet, ces cellules sont capables de sécréter différentes cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6, IL-1 ...) impliquées dans la physiopathologie des CV [92]. Ces facteurs favorisent notamment la différenciation des cellules vasculaires en chondrocytes et en ostéoblastes [92]. Deux phénotypes majeurs de macrophages sont impliqués dans les CV. Les macrophages de type M1 sont associés à des effets pro-inflammatoires et sont par conséquent capables de maintenir un état persistant d'inflammation chronique favorisant l'apparition des CV alors que les macrophages de type M2 qui sont plutôt anti-inflammatoires semblent exercer une action anti-calcifiante [92].

❖ Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales peuvent se différencier en CSM lors du phénomène de transition endothélio-mésenchymateuse (EndMT) et ainsi sécréter des facteurs solubles tels que des cytokines ou chimiokines impliquées dans les CV des CMLV [92]. De plus, les cellules endothéliales vasculaires sont exposées à un stress mécanique de cisaillement régulant leur changement phénotypique en CSM [92]. La dysfonction endothéliale est également responsable des CV observées au cours de l'IRC [92]. En effet, la dysfonction endothéliale est associée à l'induction d'un stress oxydant et à une augmentation des réponses pro-inflammatoires caractéristiques des CV [92].

c) Microcalcification vs macrocalcification

Les CV sont caractérisées par deux phases majeures : un état initial de microcalcifications suivi de la formation de macrocalcifications (**Figure 27**) [104]. Les microcalcifications sont définies par la formation de cristaux d'hydroxyapatite d'une taille inférieure à 50 μm alors que les macrocalcifications ont une taille supérieure à 50 μm [104].

Les **microcalcifications** amplifient l'induction d'un stress mécanique au niveau vasculaire favorisant ainsi la rupture de la plaque d'athérome [104]. Elles sont également associées à un état inflammatoire important [104] et à une activation des macrophages de type M1 [105]. L'activation des récepteurs RAGE dans les CMLV promeut également l'apparition de microcalcifications et donc une instabilité importante de la plaque d'athérome [106].

A des stades avancés de la CV, des **macrocalcifications** apparaissent et sont associées à une stabilité de la plaque d'athérome et des risques plus faibles de rupture de cette dernière [104]. Les mécanismes inflammatoires sont moins importants à ce stade de calcification [107] et des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 sont sécrétées par les macrophages de type M2 [105]. De plus, une surexpression dans les CMLV de la galectine-3, glycoprotéine ayant un rôle majeur dans les mécanismes d'inflammation, est associée à une stabilité de la plaque d'athérome [106].

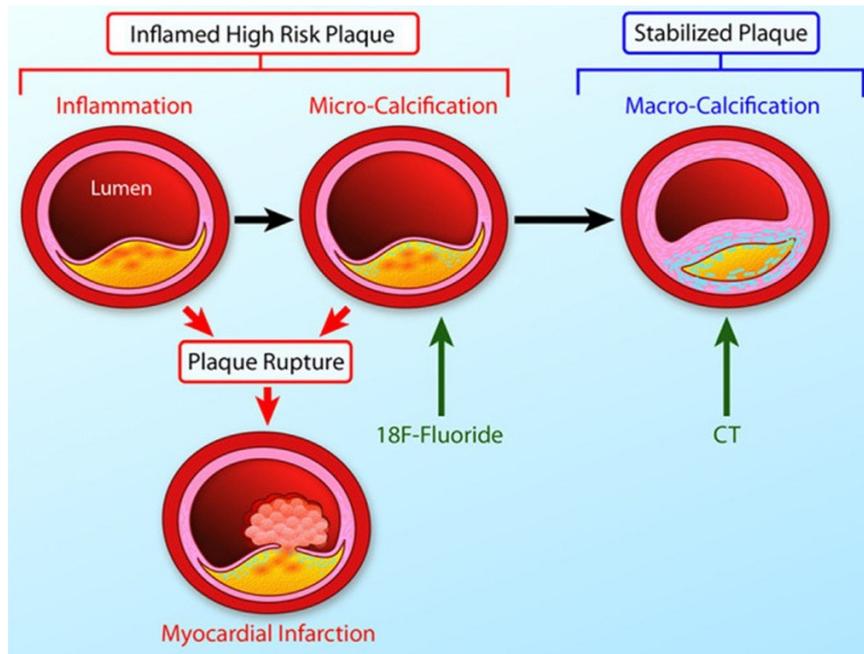


Figure 27 : Lien entre inflammation, microcalcification et macrocalcification [104].

3. Rôles des EVs dans l'IRC et la CV

3.1. Rôles des EVs dans l'IRC

De nombreuses études ont montré l'implication des EVs dans la physiopathologie des maladies rénales comme la néphropathie diabétique, le syndrome néphrotique, les maladies kystiques rénales, l'insuffisance rénale aiguë mais également l'IRC [108,109]. Les EVs étant sécrétées par les différentes cellules constitutives du néphron [108,109], elles représentent de potentiels biomarqueurs diagnostiques [108,109]. Elles peuvent ainsi être retrouvées au niveau plasmatique et urinaire et leur nombre ainsi que leur contenu sont modifiés en conditions pathologiques [108,109]. Jalal *et al.* ont ainsi mis en évidence une augmentation significative de protéines pro-inflammatoires (facteur D, *insulin-like growth factor-binding protein-6* (IGFBP-6), sérines protéases 1 et 2, récepteur 1B de la superfamille du TNF) dans les EVs plasmatiques de patients IRC en comparaison aux EVs d'individus sains [110].

Différentes études se sont également intéressées aux EVs urinaires dans des modèles *in vivo* d'IRC ou chez des patients atteints d'IRC [111–113]. Dans un modèle murin d'IRC par néphrectomie 5/6^{ème}, Lv *et al.* ont mis en évidence une augmentation de la concentration d'exosomes urinaires et rénaux par analyse du suivi individuel de particules (NTA), confirmée par une augmentation significative de l'expression protéique de marqueurs d'exosomes (Alix, CD9, CD63) [111].

De plus, le contenu de ces exosomes urinaires est modifié avec une surexpression de l'ARNm d'une chimiokine pro-inflammatoire, la CCL2 dans les exosomes de rats IRC par rapport aux exosomes de rats contrôles [111]. Les auteurs suggèrent que ces EVs enrichies en CCL2 participeraient à la sévérité de l'inflammation rénale dans ce modèle d'IRC [111].

Dans une autre étude, Lv *et al.* se sont intéressés à l'expression du gène codant pour la *CD2-associated protein* (CD2AP) au sein d'exosomes urinaires d'une cohorte de 32 patients atteints d'IRC [112]. En effet, cette protéine joue un rôle crucial dans la fonction des podocytes [112]. Les auteurs ont mis en évidence une diminution de l'expression de ce gène chez les patients atteints d'IRC par rapport aux volontaires sains [112]. Cette sous expression est corrélée positivement avec la perte de fonction rénale, l'augmentation de la protéinurie, la glomérulosclérose ainsi que la sévérité de la fibrose tubulo-interstitielle chez ces patients IRC [112].

Benito-Martin *et al.* ont analysé le contenu protéique d'exosomes urinaires de patients atteints d'IRC et se sont intéressés plus particulièrement à l'expression de protéines de la superfamille du TNF [113]. Tout d'abord, les auteurs ont mis en évidence une quantité plus importante de protéines exosomales dans l'urine de patients IRC par rapport aux échantillons urinaires de volontaires sains [113]. Ils ont également retrouvé, par *Western Blot*, une surexpression de la protéine ostéoprotégérine (OPG), membre de la superfamille des récepteurs du TNF, au niveau des exosomes urinaires de patients IRC en comparaison aux volontaires sains [113]. Les auteurs suggèrent que cette protéine OPG pourrait être impliquée dans la mort cellulaire ou dans des processus inflammatoires retrouvés au cours de l'IRC [113].

a) Rôles des EVs en fonction de leur origine cellulaire

Les EVs vont être associées à différents mécanismes physiopathologiques de l'IRC en fonction de leur origine cellulaire.

❖ EVs sécrétées par les cellules endothéliales

De nombreuses études se sont intéressées aux rôles des EVs et plus particulièrement aux rôles des microvésicules dérivées des cellules endothéliales chez les patients atteints d'IRC (**Tableau 2**). En effet, au cours de l'IRC, les cellules endothéliales sécrètent en plus grande quantité des microvésicules [114–125], ces vésicules étant associées à différents processus pathologiques chez les patients IRC tels que la rigidité artérielle, l'athérosclérose [114] ou encore la dysfonction endothéliale et artérielle [122].

Study Population		Studied Parameters	EVs Effects	References
Stage of CKD (n)	Therapeutic			
-	-	-	↑ MV levels	[114–125]
I-II-III (100)	Anti-hypertensive therapy	MV levels by FACS Renal function (Estimated GFR, hsCRP, NT-proBNP)	↑ MV levels associated with a decrease of GFR	[117]
ESRD (227)	Kidney transplantation	MV levels by FACS	↓ MV levels after kidney transplantation	[126]
ESRD (52)	Kidney transplantation HD before graft	MV levels by flow cytometry	↓ MV levels after kidney transplantation	[127]
ESRD (81)	HD	Global and cardiovascular mortality (Fatal myocardial infarction, stroke, acute pulmonary oedema, and sudden cardiac death)	High predictors of cardiovascular outcome	[115]
ESRD (37)	Dialysis (HD, PD)	cIMT and PWV by high-resolution ultrasound GFR, blood pressure, fasting lipid profile CRP, PTH, BUN, hemoglobin, albumin, serum creatinine, calcium, and phosphorus levels	Markers of atherosclerosis and arterial stiffness	[114]
ESRD (33)	Pre-dialysis	Arterial hemodynamic measurements (Blood pressure and viscosity, brachial artery and aortic shear stress, hematocrit)	MV levels inversely correlated with laminar shear stress	[128]
ESRD (44)	HD	Arterial function analysis (FMD, CCA intima-media thickness, pulse pressure, distensibility and augmentation index, CCA and brachial artery diameters and pressures, wall motion, aortic PWV)	MV levels associated with endothelial and arterial dysfunction	[122]
(30) III-IV (30)	-	Brachial artery FMD Complement fragment and alternative pathway activity	Activation of the alternative complement pathway <i>in vitro</i>	[129]
IV (8)	-	Thrombin generation by CAT		
(10) ESRD (9)	HD PD	Plasma markers of endothelial activation quantification by ELISA	Less procoagulant	[124]

BUN: blood urea nitrogen, CAT: calibrated automated thrombography, CCA: common carotid artery, cIMT: carotid artery intima-media thickness, CKD: chronic kidney disease, CRP: C-reactive protein, ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay, ESRD: end stage renal disease, EVs: extracellular vesicles, FACS: fluorescence activated cell sorting, FMD: flow-mediated dilation, GFR: glomerular filtration rate, HD: hemodialysis, hsCRP: high-sensitivity C-reactive protein, MV: microvesicles, NT-proBNP: N terminal-pro-brain natriuretic peptide, n: number, PD: peritoneal dialysis, PTH: parathyroid hormone, PWV: pulse wave velocity. ↓: decrease and ↑: increase.

Tableau 2 : Rôles des microvésicules endothéliales chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique (IRC), adapté de [4].

❖ EVs sécrétées par les plaquettes sanguines

Les EVs sécrétées par les plaquettes sanguines sont également impliquées dans la physiopathologie de l'IRC. Différentes études cliniques ont montré que les microvésicules issues de plaquettes sanguines sont augmentées chez les patients IRC [119], urémiques [130] mais également chez les patients hémodialysés ou en dialyse péritonéale en comparaison aux sujets sains [118]. Chen *et al.* ont aussi mis en évidence une augmentation significative du nombre de microvésicules plaquettaires chez les patients IRC avec coronaropathie [121]. Ces microvésicules contribueraient à un risque accru de développer des maladies cardiovasculaires chez les patients IRC [118,119]. En effet, ces EVs, sécrétées par des plaquettes activées sont capables d'exercer une activité pro-coagulante et pro-thrombotique [118,119,130].

Dans un modèle murin d'IRC par néphrectomie totale du rein gauche et électrocoagulation des 2/3 du cortex rénal droit, Yang *et al.* ont mis en évidence, par cytométrie en flux, une augmentation significative du nombre de microvésicules plaquettaires annexine V-/CD41⁺ [131]. Ces résultats suggèrent un état d'hyper activation des plaquettes sanguines suite à l'induction de l'IRC chez ces souris [131].

❖ EVs sécrétées par les neutrophiles

A l'inverse des microvésicules endothéliales et plaquettaires, le nombre de microvésicules sécrétées par les neutrophiles ne semble pas être augmenté chez les patients IRC. En effet, Daniel *et al.* ont mis en évidence une absence de variation de la concentration de microvésicules dérivées de neutrophiles dans une cohorte de 135 patients atteints d'IRC [132]. De plus, aucune corrélation n'a été retrouvée entre la concentration de microvésicules et la clairance de la créatinine chez ces patients [132]. Ces résultats peuvent être expliqués par l'absence d'augmentation de la concentration cytosolique de calcium lors de l'activation des neutrophiles, mécanisme essentiel à la sécrétion des microvésicules [133]. En effet, une étude a mis en évidence des concentrations intracellulaires de calcium similaires après activation de leucocytes polymorphonucléaires, tels que les neutrophiles, issus d'une cohorte de 19 patients atteints d'IRC [133].

b) EVs et toxines urémiques

Du fait de la détérioration de leur fonction rénale, les patients atteints d'IRC présentent une accumulation de toxines urémiques plasmatiques. C'est pourquoi, différentes études *in vitro* et *in vivo* se sont intéressées à la production des EVs et à leurs effets biologiques dans un contexte urémique [134].

Ainsi, une étude clinique de 18 patients urémiques a montré des taux plasmatiques plus importants de microvésicules dérivées des plaquettes chez ces patients par rapport aux sujets sains [135]. Gao *et al.* ont également mis en évidence un nombre plus important de microvésicules circulantes dérivées de cellules sanguines périphériques et de cellules endothéliales dans une cohorte de 66 patients urémiques en comparaison aux sujets sains [136]. De façon intéressante, dans une cohorte de 100 patients hémodialysés, il a été montré une corrélation positive entre les concentrations de p-crésyl sulfate (pCS) libre sérique et le nombre de microvésicules endothéliales circulantes [137]. Ces résultats ainsi que d'autres études ont ainsi mis en évidence une augmentation significative de la sécrétion d'EVs induite par différentes toxines urémiques telles que l'IS, le pCS, l'homocystéine ou le phosphate inorganique (Pi) (**Figure 28**) [135–147].

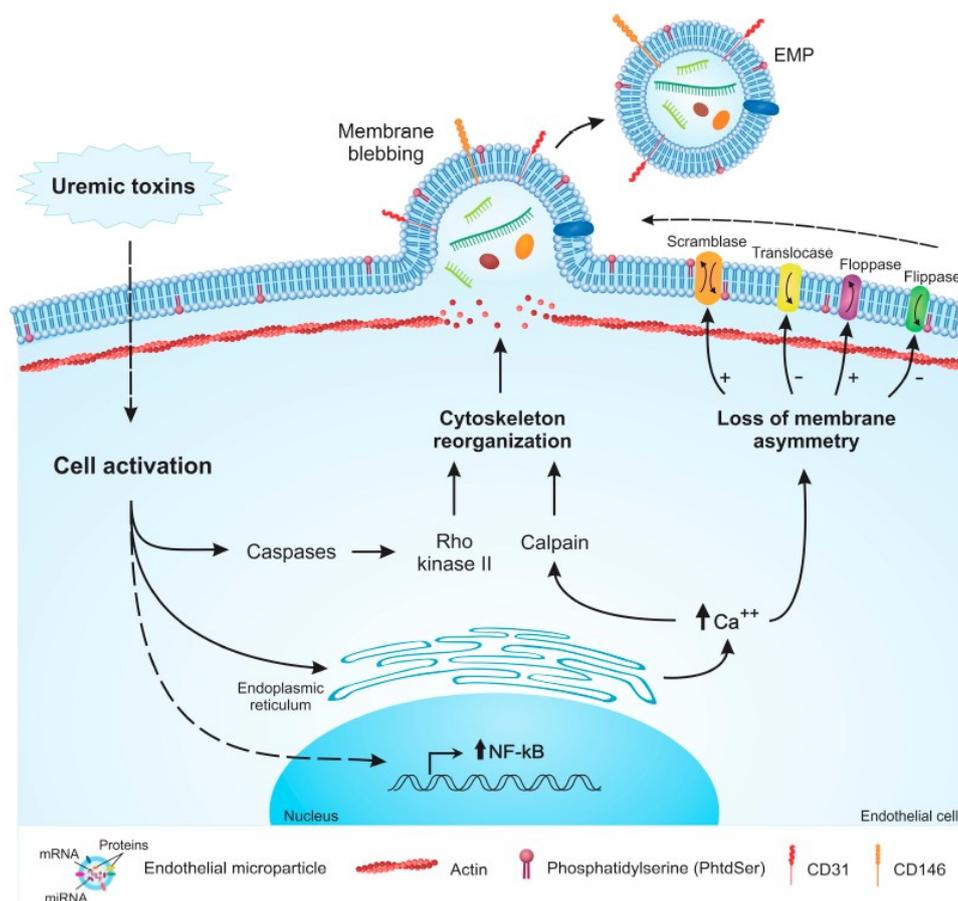


Figure 28 : Induction de la production de microvésicules de cellules endothéliales (EMP) par les toxines urémiques [134].

Les EVs sécrétées en conditions urémiques sont associées à différents processus physiopathologiques retrouvés chez les patients IRC tels que la calcification vasculaire [145], les troubles de la coagulation et la thrombose [140–142,148,149], l'hyperplasie néointimale artérielle [150,151] ou encore la dysfonction endothéliale [137,143].

Shang *et al.* ont démontré un lien entre l'accumulation des toxines urémiques, les EVs et la dysfonction endothéliale (**Figure 29**) [147]. En effet, les toxines urémiques induiraient un stress oxydant au sein de l'endothélium vasculaire entraînant la sécrétion du miR-92a, un micro-ARN connu pour son rôle dans la dysfonction endothéliale [147]. Transporté par les microvésicules endothéliales CD144⁺, ce miR-92a favoriserait ainsi la dysfonction endothéliale et un risque accru de développer des maladies cardiovasculaires [147].

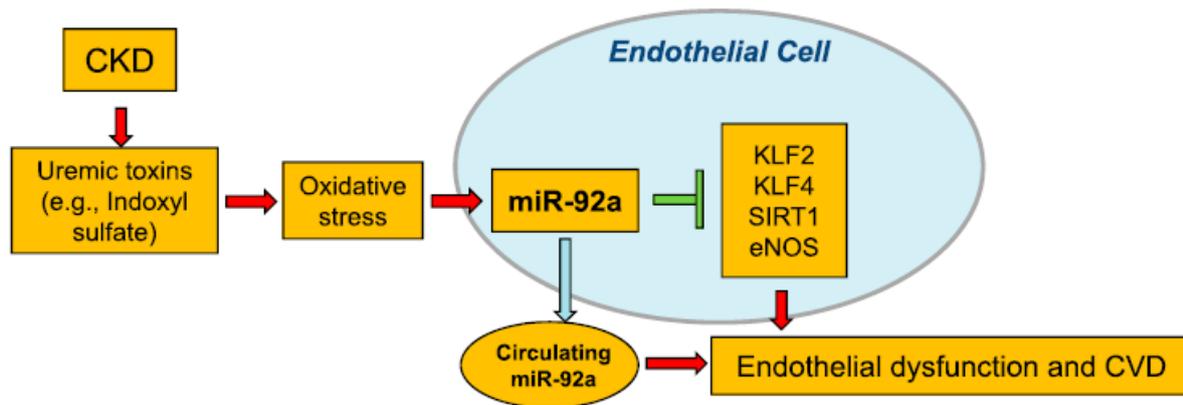


Figure 29 : Rôle du miR-92a transporté par les microvésicules dans la dysfonction endothéliale chez les patients insuffisants rénaux chroniques [147].

3.2. *Rôles des EVs dans la CV*

a) *Rôle pro-calcifiant des EVs*

De récentes études ont montré que les EVs sont impliquées dans les mécanismes de CV, complication vasculaire fréquemment observée chez les patients atteints d'IRC. En effet, la CV est associée non seulement à une augmentation du nombre des EVs chez ces patients mais également à un contenu pro-calcifiant de ces EVs. Soriano *et al.* ont ainsi mis en évidence un nombre significativement plus important de microvésicules endothéliales circulantes chez des patients IRC atteints de CV en comparaison aux patients IRC sans CV [152]. De plus, différentes études *in vitro* ont mis en évidence un rôle pro-calcifiant des EVs (**Tableau 3**). Les EVs de cellules endothéliales, de CMLV ou de macrophages sont capables d'induire la formation de CV en régulant notamment le changement phénotypique des CMLV en cellules ostéogéniques.

Subtype of EVs	Cell types		Experimental Conditions	Studied Parameters	EVs Effects	Ref
	EVs Donor Cells	EVs Recipient Cells				
Total EVs		Human VSMCs	Osteogenic medium 21 days	Visualization of microcalcification by using a bisphosphonate-conjugated imaging agent	Sortilin in EVs mediates VC	[153]
	ESRD patients	Human VSMCs	Phosphate (2.5 mM) 14 days Calcium (5.4 mM) 24 h	Calcium content	Induction of VC	[154]
		Human VSMCs Human VICs	EVs added to 3D collagen hydrogels	Confocal microscopy Collagen staining	Microcalcification formation	[155]
		Human and porcine VSMCs	Ca ²⁺ loaded EVs added to collagen matrix	Calcium content	Promote VC by ROS production <i>via</i> NOX5	[156]
		CKD rats Uremic human endothelial cells	Rat VSMCs 150 µg/mL EVs 5 days	CaCl ₂ (2.7 mmol/L) NaH ₂ PO ₄ (2.8 mmol/L) AKT and PiT-1 expression by Western Blot	Increase of VSMC osteogenic transdifferentiation <i>via</i> an enhancement of AKT signalling and Pit-1 expression	[157]
MV	IS-treated endothelial cells	Human VSMCs	50,000 MV/mL 30 days	Calcium deposits staining Inflammatory (TNF- α , TWEAK, CCL2, CCL5, and IL-6) and pro-calcification (Runx2, BMP-2) gene expression	Induction of VC	[158]
	HUVECs CKD patients	Human VSMCs	Phosphate (2.6 mM) 50 µg/mL MV 5 days	Calcium content Intracellular and MV BMP-2 quantification BMP-2 gene expression	Stimulation of calcification and osteogenesis	[159]
	VC-CKD patients	EPCs, VSMCs, fibroblast cells	500,000 MV/well	OCN expression by flow cytometry	Increase of OCN expression	[152]

	Elderly subjects' plasma Senescent endothelial cells	Human VSMCs	50,000 MV/mL 6-9 days	Calcium content, Alizarin red staining Annexin A6 and BMP-2 protein levels	Promote VC	[160]
	Human and mouse VICs		Mechanical strain of the aortic valve	Calcium content	Promote mineralization	[161]
	CKD rat VSMCs	Rat VSMCs	β -glycerophosphate (5 mM) 10 μ g exosomes 7 days	Calcium content Pro-calcification (Runx2, BMP-2, OCN), NOX1 and SOD2 gene expression levels by RT-PCR	Induction of VC through NOX1, MEK1 and Erk1/2 signaling	[162]
	Human VSMCs		Calcium (5.4mM)	Flow cytometry, TEM and mass spectrometry analysis of exosomes	Induction of mineralization by formation of a complex between PS on exosomes and Annexin A6	[163]
Exosomes	Mouse VSMCs		Inorganic phosphate (4 mM) 8 or 14 days	Calcium content Calcification inhibitors and dedifferentiation markers gene expression levels (MGP, OPN, OCN, Runx2, BMP-2, TNAP, COL1A1, COL1A2)	Reduction of VC by inhibition of collagen-EVs interaction <i>via</i> GFOGER peptide	[164,165]
	Rat VICs		Calcium-phosphate 5 days	Proteomic and TEM analysis	Up-regulation of calcification regulators (calcium-binding annexins) Colocalization of Annexin VI with exosomes	[166]
	Mouse macrophages		Calcium (3 mM)-inorganic phosphate (2 mM)	Calcium content Alkaline phosphatase activity Immunohistochemical analysis of α -SMA and annexin 5	Promote microcalcification	[167]

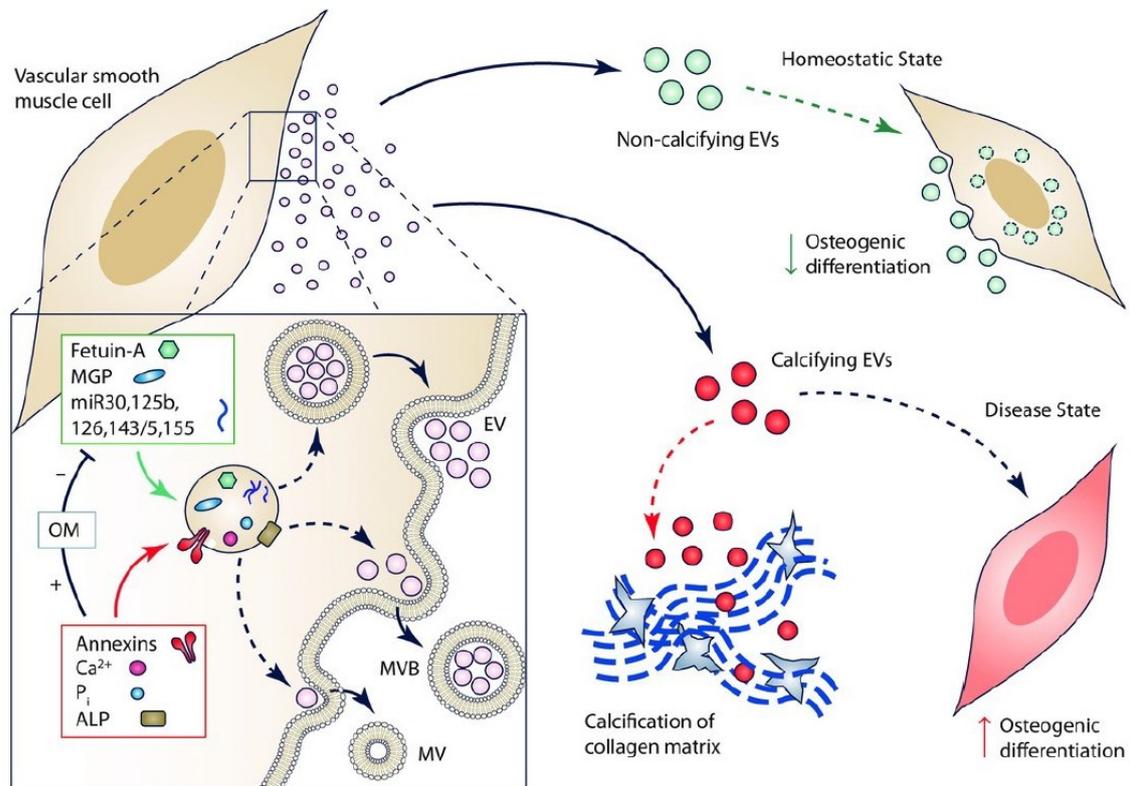
		Alizarin red and Von Kossa staining		
Mouse macrophages	Calcium (1.2 mM)- inorganic phosphate (0.9 mM)	TNAP activity TEM analysis of exosomes OPN, OCN, Runx2, BMP-2 and TNAP gene expression	Enhance ectopic mineralization	[168]

α -SMA: α -smooth muscle actin, BMP-2: bone morphogenetic protein, CCL2: C-C motif chemokine ligand 2, CCL5: chemokine ligand 5, CKD: chronic kidney disease, COL1A1: collagen type 1 α 1 chain, COL1A2: collagen type 1 α 2 chain, EPCs: endothelial progenitor cells, Erk1/2: extracellular-signal-regulated kinase 1/2, ESRD: end stage renal disease, EVs: extracellular vesicles, HUVECs: human umbilical vein endothelial cells, IL-6: interleukin-6, MEK1: mitogen-activated protein kinase, MGP: matrix Gla protein, MV: microvesicles, NOX1: NADPH oxidase 1, NOX5: NADPH oxidase 5, OCN: osteocalcin, OPN: osteopontin, ROS: reactive oxygen species, RT-PCR: real time-polymerase chain reaction, Runx2: runt-related transcription factor 2, SOD2: superoxide dismutase 2, TEM: transmission electron microscopic, TNAP: tissue nonspecific alkaline phosphatase, TNF- α : tumor necrosis factor- α , TWEAK: tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis, VC: vascular calcification, VICs: valvular interstitial cells, VSMCs: vascular smooth muscle cells.

Tableau 3 : Rôles des vésicules extracellulaires (EVs) dans la calcification vasculaire (CV), adapté de [4].

b) Rôles des EVs dérivées de CMLV dans la CV

Les CMLV représentent le type cellulaire majeur impliqué dans les mécanismes de CV. De nombreuses études ont également identifié un rôle important des EVs de CMLV dans la CV (**Figure 30**) [17,169–172]. Elles sont ainsi capables de réguler la trans-différenciation des CMLV en cellules ostéoblastiques-like promouvant ainsi la CV [16]. Lors de la CV, les EVs sécrétées par les CMLV forment des agrégats dans le milieu extracellulaire où les fibres de collagène sont relâchées [173] favorisant ainsi l'apparition de microcalcifications [173]. De plus, ces EVs sont enrichies en micro-ARN qui régulent l'expression de marqueurs ostéogéniques telles que le Runx2, la protéine SMAD1 ou le facteur de transcription Sp7 appelé également Osterix (Osx) [169]. A l'inverse, elles présentent une sous-expression de molécules inhibitrices de la calcification comme la fetuin-A ou la protéine MGP [174]. Elles expriment également à leur surface un complexe protéique constitué des protéines annexine A6 et de la phosphatidylsérine pouvant former un nid de calcification [17]. La présence de métalloprotéases matricielles-2 (MMP-2) au sein de leur bicouche lipidique permet la dégradation de la matrice extracellulaire favorisant ainsi l'apparition d'une CV [17].



The Journal of
Physiology

Figure 30 : Rôle des vésicules extracellulaires (EVs) dérivées de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) dans la calcification vasculaire (CV) [172].

De plus, il a été montré un rôle des EVs de CMLV dans la CV *via* une interaction entre les intégrines à la surface des EVs et le collagène de type 1. Hodroge *et al.* ont démontré que l'acide galacturonique DP8 diminue la calcification de CMLV en inhibant l'interaction entre les exosomes et une séquence spécifique (GFOGER) retrouvée au sein du collagène de type I [164]. De plus, Mansour *et al.* ont mis en évidence un rôle inhibiteur du peptide GFOGER sur la calcification des CMLV [165]. En effet, ce peptide entraîne une inhibition du switch ostéogénique des CMLV et une modification du contenu protéique des EVs de CMLV sécrétées en conditions pro-calcifiantes [165].

c) Régulation de la balance calcium-phosphate

Les EVs de CMLV, de cellules endothéliales ou de macrophages promeuvent également la CV *via* une régulation de la balance calcium-phosphate [171]. En conditions pathologiques, les EVs pro-calcifiantes sont sécrétées au sein de la matrice extracellulaire favorisant ainsi la nucléation de minéraux [169]. En effet, elles possèdent une bicouche lipidique spécifique contenant différentes molécules impliquées dans la formation de dépôts minéralisants (**Figure 31**) [169]. Par exemple, les annexines facilitent l'entrée de calcium au sein des EVs [169]. De plus, la phosphatase alcaline tissu non-spécifique (TNAP) convertit le pyrophosphate en phosphate fournissant ainsi les ions nécessaires à la formation de dépôts minéralisants [169]. La phosphatase phosphoéthanolamine-phosphocholine (phospho-1) régule également les concentrations ioniques des EVs en augmentant les concentrations intra vésiculaires de phosphate [169]. Cette composition moléculaire spécifique retrouvée au sein des EVs favorise alors l'apparition de CV.

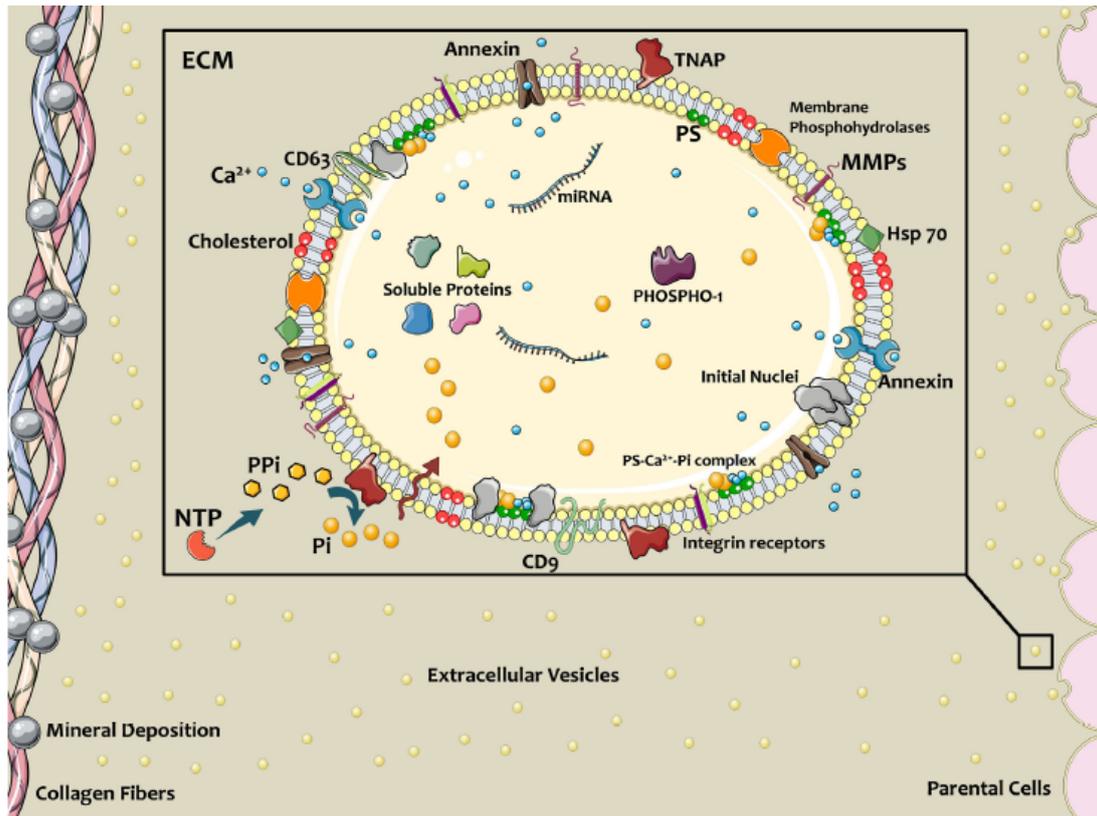


Figure 31 : Composition des vésicules extracellulaires (EVs) impliquées dans la formation de dépôts minéralisants calcifiants [169].

4. Diagnostic et traitement de l'IRC et des CV

4.1. Diagnostic classique de l'IRC

Aux États-Unis, La *National Kidney Foundation–Kidney Disease Outcomes Quality Initiative* (NKF-KDOQI) donne des recommandations pour le diagnostic, la classification de l'IRC, mais également la prise en charge des patients atteints de cette pathologie [54]. En France, la Haute Autorité de Santé (HAS) établit un rapport sur les bons usages des technologies de santé à utiliser pour le diagnostic de l'IRC [175]. Ce dernier repose sur des examens biologiques avec notamment la mesure de la créatininémie pour estimer le DFG [175]. Selon la HAS, l'estimation de la clairance de la créatinine selon la formule de Cockcroft et Gault ne doit plus être utilisée pour le diagnostic de l'IRC [175]. La *Chronic Kidney Disease - Epidemiology Collaboration* (CKD-EPI) est la formule la plus fiable pour l'estimation du DFG car plus précise et doit être appliquée en clinique [176]. Un dosage de l'albuminurie doit également être réalisé sur un échantillon urinaire et rapporté à la créatininurie.

Le diagnostic d'IRC est alors posé si le patient présente un DFG inférieur à 60 ml/min/1,73 m² depuis plus de 3 mois et des taux anormalement élevés d'albuminurie.

4.2. *EVs comme biomarqueurs d'IRC*

Les EVs sont retrouvées dans de nombreux fluides biologiques chez l'Homme notamment dans l'urine [2] et représentent donc de potentiels biomarqueurs diagnostiques de l'IRC [109,177–185]. De plus, il est important de souligner que les EVs plasmatiques représentent aussi de potentiels biomarqueurs diagnostiques de l'IRC [186]. Les EVs urinaires permettant de suivre de façon non invasive l'évolution de la pathologie chez les patients IRC. En effet, les EVs peuvent être produites par les cellules épithéliales rénales dont les podocytes, les cellules tubulaires ou encore les cellules urothéliales et ainsi se retrouver dans les urines [178] (**Figure 32**).

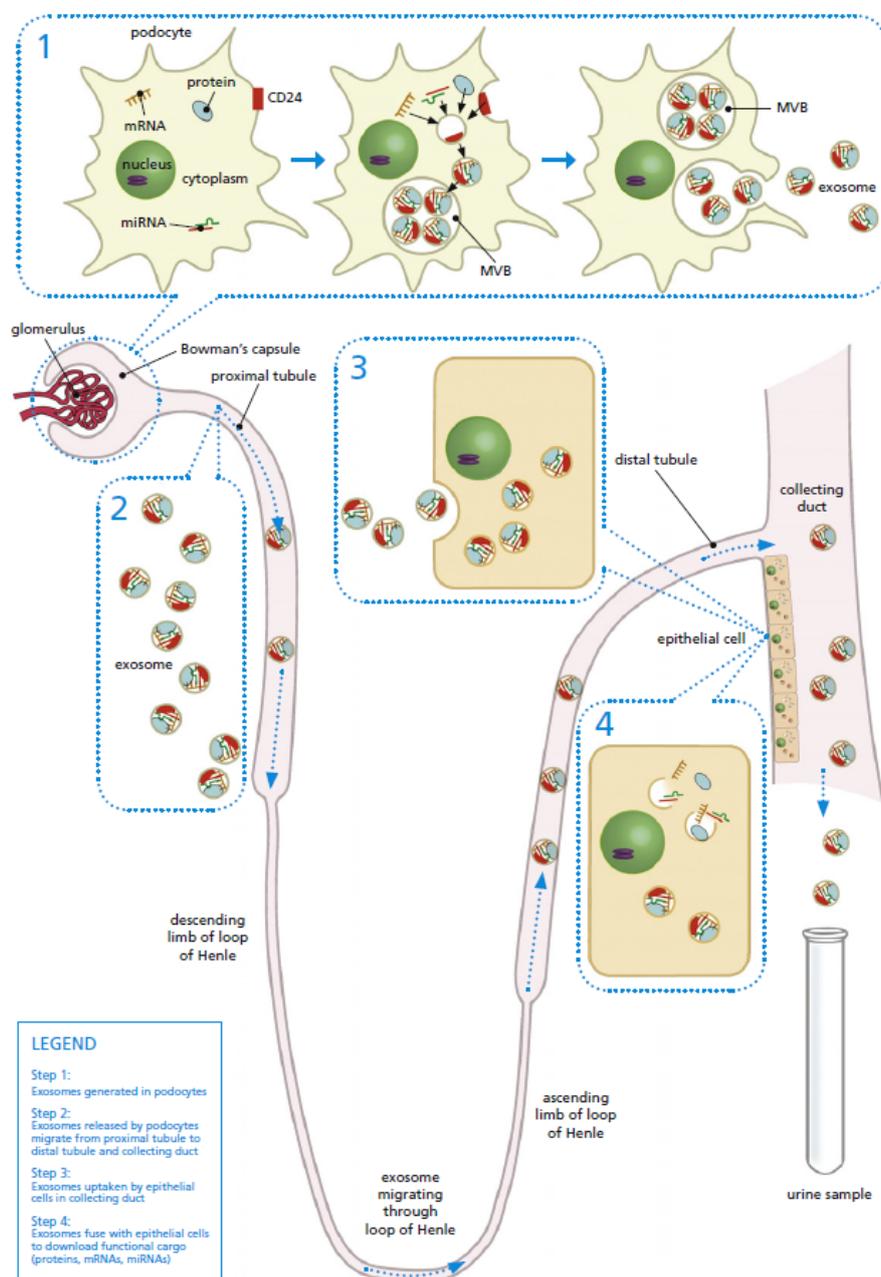


Figure 32 : Biogenèse des exosomes par les podocytes et recueil dans l'urine [178].

Différentes études ont identifié des biomolécules connues pour être associées à la physiopathologie de l'IRC dans les EVs urinaires [180]. Ces EVs sont particulièrement enrichies en ARN codant et non codant tels que les micro-ARN [183,187–190]. Par exemple, Lv *et al.* ont mis en évidence une sous-expression du miR-29c au sein d'exosomes urinaires d'une cohorte de 32 patients atteints d'IRC par rapport aux individus sains [191]. De plus, la sous-expression du miR-29c exosomal urinaire est corrélée positivement à la perte de fonction rénale et au degré histologique de fibrose rénale [191]. Ce micro-ARN exosomal urinaire pourrait donc être utilisé comme biomarqueur de fibrose rénale chez les patients IRC [191].

De nombreuses techniques permettent d'isoler les EVs d'urine de patients : l'ultracentrifugation, la filtration à l'aide de membrane de polyéther sulfone ou de PVDF, l'immuno-affinité à l'aide de billes magnétiques, la chromatographie d'exclusion de taille ou la dialyse hydrostatique [180]. A ce jour, il n'existe pas de protocole standardisé en clinique pour l'isolation des EVs d'urine de patients. Des études complémentaires sont donc nécessaires afin d'éviter des biais d'interprétation dus à l'utilisation de différentes techniques d'isolation d'EVs.

4.3. Traitements

a) Traitements classiques de l'IRC

Afin de pallier la perte des fonctions rénales des patients atteints d'IRC, deux traitements de suppléance sont très couramment utilisés : la dialyse ou la transplantation rénale.

La dialyse permet l'épuration du sang des différents déchets accumulés au sein de l'organisme du patient. Il existe deux types de dialyse, la dialyse péritonéale ainsi que l'hémodialyse. Lors d'une dialyse péritonéale, un cathéter est inséré au sein de l'abdomen qui est une zone richement vascularisée. Un liquide appelé dialysat est alors injecté au sein de la cavité abdominale du patient. Le péritoine abdominal agit alors comme une membrane filtrante favorisant ainsi les échanges entre le dialysat et le sang, l'élimination des déchets et donc l'épuration du sang. L'hémodialyse quant à elle consiste à faire passer le sang du patient dans un système extracorporel appelé dialyseur qui agit alors comme un rein artificiel en retenant les déchets et en éliminant l'excès d'eau. Le sang filtré est ensuite réinjecté au sein de l'organisme du patient. L'hémodialyse est la technique la plus utilisée en France. En effet, selon le rapport annuel 2019 du réseau R.E.I.N., 50 501 patients ont suivi un traitement par dialyse et 94 % d'entre eux ont été traités par hémodialyse [52].

La transplantation rénale représente la meilleure option thérapeutique pour les patients IRC au stade terminal de la maladie. En effet, elle permet d'améliorer considérablement leur qualité et leur espérance de vie.

Des traitements immunosuppresseurs sont cependant nécessaires chez les transplantés rénaux afin d'éviter tout rejet de greffe. Selon le rapport 2019 du réseau R.E.I.N., un peu plus de 40 000 patients atteints d'IRC sont porteurs d'un greffon [52].

b) Traitements classiques de la CV

Les CV étant des prédictors importants de mortalité cardiovasculaire chez les patients atteints d'IRC, la prise en charge thérapeutique de cette complication reste indispensable. Aucun traitement curatif des CV n'existe à ce jour pour les patients atteints d'IRC.

Les stratégies thérapeutiques actuelles consistent par conséquent à prendre en charge les différents facteurs de risque liés aux CV tels que l'hypertension à l'aide **d'antihypertenseurs** (bêtabloquants par exemple), le diabète à l'aide **d'antidiabétiques** (metformine, glinides, sulfamides hypoglycémiantes ...) ou la dyslipidémie à l'aide **d'hypolipémiants** (statines, ézétimibes...).

Différents traitements permettent également de prendre en charge les dérégulations du métabolisme minéral retrouvées chez les patients atteints de CV.

Un des traitements utilisé contre les CV chez les patients atteints d'IRC sont les **calcimimétiques** [192]. Ces molécules sont en effet capables de se lier au récepteur sensible au calcium (CaSR) et d'augmenter ainsi la sensibilité des cellules de la parathyroïde au calcium extracellulaire entraînant en retour une diminution de la production de la PTH, de la calcémie et de la phosphatémie [192].

Les **chélateurs du phosphate** tels que le sévélamer permettent également de diminuer la CV chez les patients atteints d'IRC [193]. Le sévélamer se lie au phosphate et permet d'empêcher son absorption ce qui favorise alors le traitement de l'hyperphosphatémie retrouvée chez les patients IRC atteints de CV [193].

Un autre moyen d'améliorer la prise en charge des patients atteints de CV est l'utilisation de **bisphosphonates** [194]. En effet, ces molécules permettent d'inhiber la résorption osseuse et sont couramment utilisées dans le traitement de l'ostéoporose et des fractures osseuses [194]. Cependant, différentes études suggèrent un potentiel thérapeutique de ces bisphosphonates dans le traitement des CV [194]. Les bisphosphonates tels que l'édronate permettraient notamment de limiter la progression des calcifications coronariennes et aortiques chez les patients hémodialysés [194].

La **vitamine K** représente également un moyen thérapeutique contre les CV chez les patients atteints d'IRC [192]. En effet, la vitamine K est un cofacteur essentiel impliqué dans la carboxylation de la protéine MGP qui devient active et peut alors exercer son activité anti-calcifiante [192]. Différentes études cliniques ont mis en évidence une activation de la protéine MGP ainsi qu'une diminution des CV après un traitement à la vitamine K chez des patients atteints d'IRC [192].

c) *Potentiel thérapeutique des EVs*

Étant donné leur rôle dans la physiopathologie de l'IRC et la CV, les EVs représentent une cible thérapeutique intéressante. De nombreuses molécules pharmacologiques peuvent d'ailleurs être utilisées pour inhiber soit la sécrétion des EVs soit l'interaction des EVs avec la cellule réceptrice [108,195] (**Figure 33**).

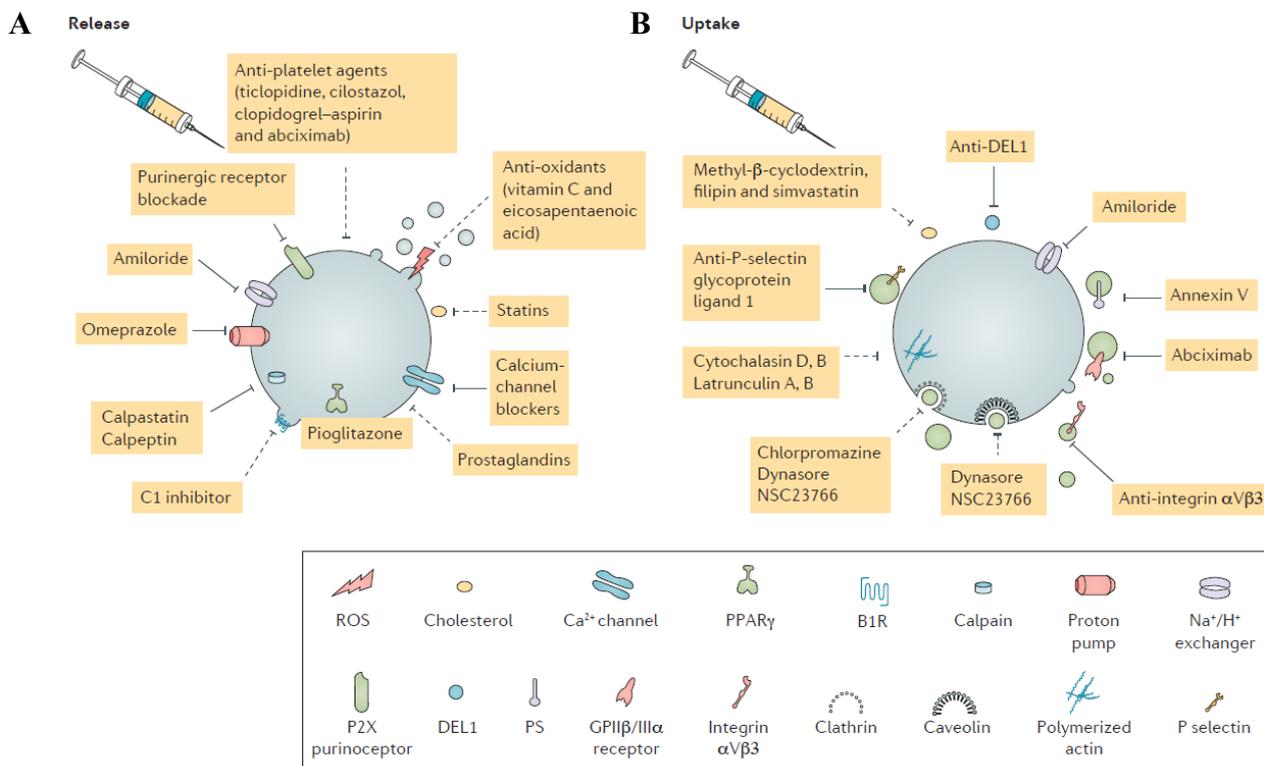


Figure 33 : Agents pharmacologiques inhibant (A) la sécrétion des vésicules extracellulaires (EVs) ou (B) leur interaction avec la cellule réceptrice [108].

Les cellules progénitrices présentent un grand intérêt en thérapeutique mais leur utilisation entraîne de nombreux problèmes d'immunogénicité. Les EVs sécrétées par les cellules progénitrices possèdent un potentiel thérapeutique intéressant car elles permettraient de s'affranchir de ces effets indésirables. Différentes études ont montré un rôle protecteur des EVs de cellules progénitrices endothéliales (EPCs) sur la progression de l'IRC [196–199].

De plus, différentes études ont démontré de nombreux intérêts thérapeutiques des EVs de CSM [200,201].

Ainsi, Nassar *et al.* ont montré une amélioration du DFG estimé, une diminution de la créatininémie et de l'urémie ainsi que du ratio créatinine/albumine urinaire après administration de deux doses d'EVs dérivées de CSM à un groupe de 20 patients atteints d'IRC au stade 3 et 4 [202]. De plus, une augmentation significative des taux plasmatiques de TGF- β 1 et d'IL-10 ainsi qu'une diminution significative des taux plasmatiques de TNF- α ont été retrouvées dans le groupe de patients après traitement avec les EVs de CSM [202].

Le rôle protecteur de microvésicules de CSM a également été montré dans un modèle *in vivo* d'insuffisance rénale aiguë induite chez des rats par ischémie reperfusion et pouvant mener à l'IRC [203]. En effet, ces EVs améliorent la fonction rénale en inhibant l'apoptose ainsi que la fibrose rénale et en stimulant la prolifération cellulaire épithéliale tubulaire [203]. He *et al.* ont aussi mis en évidence un effet bénéfique de microvésicules de CSM dans un modèle de souris IRC induite par néphrectomie subtotale 5/6^{ème} [204]. Ces microvésicules permettent notamment de diminuer la fibrose, les infiltrats lymphocytaires et l'atrophie tubulaire chez ces souris IRC [204]. De plus, les microvésicules dérivées de CSM rénales inhibent l'EndMT, la fibrose rénale et l'infiltration cellulaire inflammatoire dans un modèle *in vivo* d'IRC par obstruction urétérale unilatérale [205]. D'autres études *in vivo* ont mis en évidence des effets protecteurs des EVs de CSM dans l'IRC [206–209].

Les EVs peuvent aussi être utilisées comme vecteurs de biomolécules pharmaceutiques [210]. Elles pourraient avoir de nombreux avantages en clinique : leur bicouche lipidique permet de protéger leur contenu d'une dégradation potentielle ; elles présentent une faible immunogénicité et toxicité ; elles sont capables de traverser différentes barrières anatomophysiologiques telles que la barrière hémato-encéphalique [211]. De plus, elles peuvent délivrer des ARN interférents [211,212] ou des micro-ARN [213] régulant ainsi différentes voies de signalisation intracellulaire. Cependant, il existe actuellement très peu d'études cliniques utilisant les EVs comme vecteurs thérapeutiques en raison d'une absence de protocole standardisé. Des études supplémentaires sont donc encore nécessaires.

Hypothèses
&
Objectifs

I. Rationnel de l'étude

Les patients IRC présentent non seulement une augmentation du risque d'athérosclérose mais également des mécanismes accélérés de CV. Les CV retrouvées chez les patients atteints d'IRC sont associées à un état inflammatoire et l'induction d'un stress oxydant important. Deux types cellulaires majeurs sont impliqués dans la physiopathologie des CV à savoir les CMLV et les macrophages. Les CMLV représentent l'un des acteurs majeurs du développement des CV *via* notamment leur potentiel à se différencier en cellules ostéogéniques. Les macrophages jouent également un rôle régulateur important dans la survenue, le développement et la progression des CV chez les patients atteints d'IRC. Ces cellules sont capables de changer de phénotype et de sécréter différents facteurs pro-calcifiants.

Comme décrit précédemment, de nombreuses études ont mis en évidence un rôle majeur des EVs dans la physiopathologie de l'IRC, les mécanismes de CV et dans les processus d'inflammation et de stress oxydant *via* notamment le transport de différentes biomolécules. Chez les patients atteints d'IRC et de CV, la majorité des études ont montré une augmentation du nombre des EVs ainsi qu'une modification de leur contenu pro-calcifiant favorisant ainsi la progression des CV.

D'autres études se sont intéressées plus particulièrement aux rôles des EVs sécrétées par les macrophages lors du processus de CV. En effet, ces EVs exerceraient une action pro-calcifiante et seraient impliquées dans la formation de microcalcification. Cependant, aucune étude ne s'est intéressée aux effets directs des EVs de macrophages sur la calcification des CMLV environnantes et la propagation des mécanismes d'inflammation et de stress oxydant entre ces deux types cellulaires.

La problématique de ce projet de recherche est donc de déterminer le rôle et le mécanisme d'action des EVs produites par les macrophages, cellules impliquées dans les processus d'inflammation et de stress oxydant, sur les cellules à l'origine des CV à savoir les CMLV.

II. Objectifs de l'étude

Afin de déterminer le rôle et le mécanisme d'action des EVs de macrophages sur la propagation de l'inflammation et du stress oxydant au cours de la CV, nous avons défini trois objectifs principaux :

❖ ***1^{er} Objectif : Mise au point d'un modèle cellulaire de l'inflammation et de stress oxydant***

Pour ce faire, nous avons utilisé une lignée murine de macrophages (RAW 264.7) traitée avec du lipopolysaccharide-EK (LPS-EK), ligand spécifique du récepteur de la réponse immune innée, le TLR4, dont l'activation est à l'origine d'une réponse inflammatoire. Nous avons également traité les macrophages avec l'homocystéine, toxine urémique accumulée chez les patients atteints d'IRC. L'induction de l'inflammation a été mise en évidence par l'analyse de l'expression de différentes cytokines pro-inflammatoires. Le stress oxydant a, quant à lui, été mesuré par l'étude de l'expression de molécules impliquées dans le système antioxydant/oxydant mais également par la production de ROS tels que l'O₂^{•-}.

❖ ***2^{ème} Objectif : Biogenèse et caractérisation des EVs sécrétées en conditions pro-inflammatoires et pro-oxydantes***

L'expression de différents marqueurs de la biogenèse des EVs a été analysée afin d'étudier l'effet de l'induction d'une réponse inflammatoire et d'un stress oxydant sur la production des EVs par les macrophages. Les EVs de macrophages ont été récoltées par ultracentrifugation et caractérisées à l'aide de différentes techniques afin de s'assurer de la présence d'EVs dans nos échantillons. Enfin, le contenu protéique des EVs sécrétées par les macrophages a été analysé par spectrométrie de masse et à l'aide d'un kit multiplex spécifique d'un panel de 10 cytokines pro-inflammatoires.

❖ ***3^{ème} Objectif : Rôles et mécanismes d'action des EVs sécrétées par les macrophages dans la propagation de l'inflammation, du stress oxydant et dans l'aggravation de la CV des CMLV***

Afin de répondre au dernier objectif de notre projet de recherche, nous avons traité une lignée murine de CMLV (MOVAS-1) avec les EVs sécrétées par les macrophages traités ou non et étudié la réponse inflammatoire et le stress oxydant des CMLV. De plus, les effets de ces EVs sur l'aggravation de la calcification des CMLV ont également été étudiés. Ce projet pourrait permettre d'identifier une nouvelle cible thérapeutique afin de limiter la CV chez les patients.

Matériels
&
Méthodes

L'ensemble des réactifs utilisés proviennent de Sigma-Aldrich[®], Saint-Louis, Missouri, États-Unis sauf indication contraire.

I. Culture cellulaire

1. Les macrophages

La lignée cellulaire murine de macrophages RAW 264.7 (ATCC[®] TIB-71[™], Manassas, Virginie, États-Unis) a été utilisée dans le cadre de ce projet de thèse. Les cellules sont cultivées à 37 °C et à 5 % de CO₂ dans le milieu *dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM 6546) contenant 4,5 g/L de glucose et supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF ; Eurobio[®], Les Ulis, France), 4 mM de glutamine (Eurobio[®], Les Ulis, France), 100 UI/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine. Un changement de milieu est réalisé tous les 2 jours. Une fois à confluence, les cellules, cultivées dans des flasques de culture de 75 cm², sont lavées avec du *Phosphate Buffered Saline* (PBS) puis détachées par décollement mécanique à l'aide d'un grattoir. Les cellules sont ensuite centrifugées à 180 g pendant 5 minutes à température ambiante. Elles sont ensuite reprises dans du milieu DMEM 6546 supplémenté avec 10 % de SVF, comptées puis ensemencées dans des flasques de 75 cm² à une densité de 5 000 cellules par cm².

Traitement des cellules

Les cellules sont incubées avant les traitements et pendant 24 heures dans du milieu DMEM 6546 supplémenté avec 0,5 % de SVF ce qui permet de synchroniser les cellules au même stade du cycle cellulaire.

- **Étude de l'effet du LPS-EK**

Les macrophages sont incubés dans du milieu DMEM 6546 supplémenté avec 0,5 % de SVF en présence ou non de LPS-EK (InvivoGen[®], San Diego, Californie, États-Unis) aux concentrations de 0,1 µg/mL et 1 µg/mL pendant 6 heures.

- Étude de l'effet de l'homocystéine

Les concentrations utilisées pour l'homocystéine correspondent aux concentrations retrouvées en clinique et définies par l'EUTox (www.uremic-toxins.org). Les cellules ont ainsi été incubées pendant 24 heures avec l'homocystéine aux concentrations de 10,5 μM (concentration normale) et 45,2 μM (concentration urémique).

2. Les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV)

La lignée cellulaire murine de CMLV aortiques MOVAS-1 (ATCC[®], CRL-2797[™], Manassas, Virginie, États-Unis) a été utilisée dans le cadre de notre étude. Les cellules MOVAS-1 sont cultivées à 37 °C et à 5 % de CO₂ dans du milieu DMEM 6546 supplémenté avec 10 % de SVF, 4 mM de glutamine, 100 UI/mL de pénicilline, 100 $\mu\text{g/mL}$ de streptomycine et 200 $\mu\text{g/mL}$ de généticine (G418). Le milieu de culture des cellules est remplacé tous les 2 jours. Après confluence, les CMLV sont lavées 3 fois avec du PBS puis décollées par ajout d'une solution de trypsine-EDTA (0,05 % et 0,02 % respectivement ; PAN-Biotech[®], Aidenbach, Allemagne). Après 5 minutes d'incubation à 37 °C, du milieu DMEM 6546 contenant 10 % de SVF est ajouté dans le flasque de cellules afin d'inhiber l'action de la trypsine. Les cellules sont ensuite comptées etensemencées dans des flasques de culture de 75 cm² à une densité de 5 000 cellules par cm².

Afin d'étudier l'effet des EVs de macrophages sur les CMLV, ces dernières sont traitées, pour chacune des expérimentations, avec une quantité d'EVs provenant d'un même volume de surnageant de culture cellulaire de macrophages.

II. Test de viabilité cellulaire (WST-1)

La viabilité des cellules après traitement (LPS-EK ou homocystéine pour les macrophages, EVs pour les CMLV) a été mesurée à l'aide d'un test colorimétrique utilisant le sel de tétrazolium (WST-1). Le sel de tétrazolium est un composé jaune pâle qui, une fois clivé par les déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes se transforme en un composé soluble de couleur orange : le formazan (**Figure 34**).

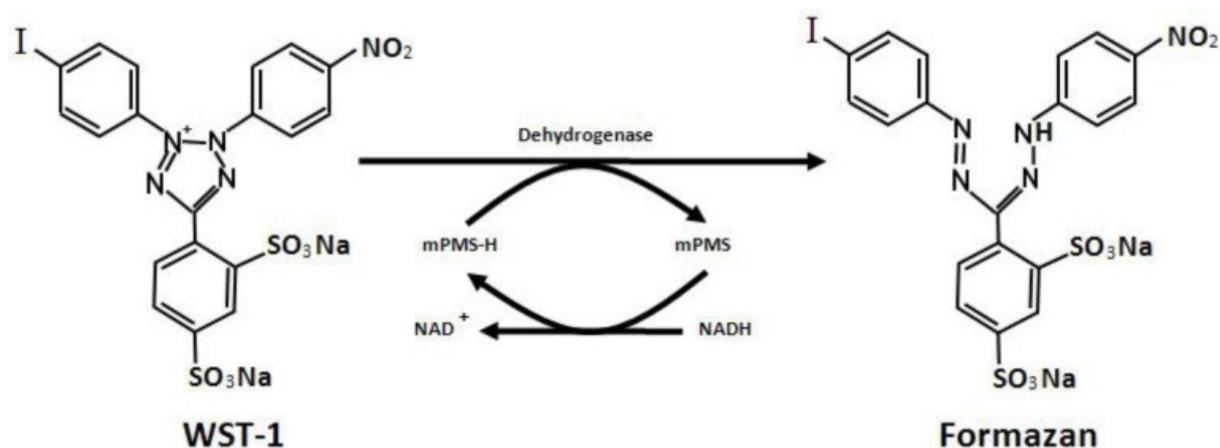


Figure 34 : Schéma du mécanisme de réduction du WST-1 en formazan [214].

Les cellules sontensemencées en plaques 96 puits à une densité de 7 500 cellules par puits dans du milieu DMEM 6546 contenant 10 % de SVF. Après 48 heures, le milieu est remplacé par du milieu DMEM 6546 contenant 0,5 % de SVF afin de synchroniser les cellules. Les cellules sont ensuite traitées avec les différents inducteurs aux concentrations et temps décrits précédemment. Le diméthylsulfoxyde à 10 % (DMSO) est utilisé comme contrôle positif de perte de viabilité cellulaire. Les cellules sont ensuite mises en présence de la solution de WST-1 (1/10^{ème} dans du milieu DMEM 6546) pendant 1 heure à 37 °C. Puis, l'absorbance est mesurée à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques *Envision Microplate Reader* (Perkin Elmer®, Waltham, Massachusetts, États-Unis) et est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes.

III. Étude de l'expression génique

1. Extraction des ARN totaux

Après traitement, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS froid sur la glace. Elles sont ensuite grattées dans 1 mL de *TRIzol™ Reagent* (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, Massachusetts, États-Unis). Le lysat ainsi obtenu est homogénéisé par 10 allers-retours à l'aide d'une aiguille 20 g. Un volume de 200 µl de chloroforme est ensuite ajouté au lysat. Après homogénéisation par retournement pendant 15 secondes, le mélange est incubé pendant 3 minutes à température ambiante. Le lysat est ensuite centrifugé à 12 000 g pendant 15 minutes à +4 °C.

Cette centrifugation permet d'obtenir trois phases : une première phase organique contenant le TRIzol et le chloroforme, une interphase contenant les acides désoxyribonucléiques (ADN) et une phase aqueuse incolore contenant les ARN totaux. Cette phase incolore est alors transférée dans un nouveau tube et 0,5 mL d'isopropanol sont ajoutés. Le mélange est homogénéisé 8 fois par retournement puis incubé 10 minutes à température ambiante. Afin de précipiter les ARN, une centrifugation à 12 000 g pendant 10 minutes à +4 °C est réalisée. Le culot d'ARN totaux ainsi obtenu est lavé 2 fois par ajout d'éthanol à 70 % (VWR International®, Radnor, Pennsylvanie, États-Unis) et centrifugé à 7 500 g pendant 5 minutes à +4 °C. Enfin, le culot d'ARN totaux est repris dans de l'eau stérile dépourvue de RNase et DNase (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, Massachusetts, États-Unis).

2. Dosage des ARN totaux

Le dosage des ARN totaux est réalisé par spectrophotométrie à l'aide du *NanoVue™ Plus* (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, Massachusetts, États-Unis) avec 2 µl d'échantillon. L'absorbance mesurée à 260 nm est proportionnelle à la quantité d'ARN. Les ratios 260/280 nm et 260/230 nm sont également mesurés afin de s'assurer de la pureté de l'échantillon. Le ratio 260/280 nm qui doit être compris entre 1,8 et 2 permet de vérifier l'absence de protéines et le ratio 260/230 nm compris entre 1,8 et 2,2 nous assure de l'absence de contamination par les solvants. Les échantillons d'ARN sont ensuite congelés à -80 °C jusqu'à analyse ultérieure.

3. Synthèse de l'ADNc par reverse transcription (RT)

Les ARNm sont ensuite retranscrits en ADN complémentaire (ADNc) par *Reverse Transcription* (RT) à l'aide du kit *High-Capacity RNA-to-cDNA*TM (Thermo Fisher Scientific[®], Waltham, Massachusetts, États-Unis) selon les recommandations du fournisseur. Brièvement, 1 µg d'ARN totaux est ajouté à 20 µl de tampon contenant des désoxyribonucléotides triphosphate (dNTP), des *random primers* et la transcriptase inverse. La RT est réalisée à l'aide du thermocycleur *iCycler* (Bio-Rad[®], Hercules, Californie, États-Unis) selon le programme suivant : 10 minutes à 25 °C, 2 heures à 37 °C et 5 minutes à 85 °C. Les échantillons d'ADNc sont ensuite conservés à +4 °C avant d'être congelés à -20 °C jusqu'à analyse ultérieure.

4. Amplification des ADNc par quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

L'expression des différents gènes d'intérêt est analysée par *quantitative polymerase chain reaction* (qPCR). Brièvement, 2,5 µl d'échantillon d'ADNc préalablement dilués au 1/10^{ème} sont incubés avec 7,5 µl d'un mix de qPCR contenant du *Takyon*TM (Eurogentec[®], Liège, Belgique), de l'eau stérile *RNase-DNase free* et des amorces spécifiques des gènes d'intérêt préalablement dilués au 1/10^{ème} (**Tableau 4**).

La qPCR est réalisée à l'aide du thermocycleur *CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad[®], Hercules, Californie, États-Unis) selon le programme suivant : 10 minutes à 95 °C puis 40 cycles d'amplification avec une première étape à 95 °C pendant 15 secondes permettant la dénaturation de l'ADNc, une étape d'hybridation des amorces à 60 °C pendant 1 minute puis l'étape d'élongation à 72 °C pendant 30 secondes. Le gène de la *β-actine* est utilisé comme gène de ménage afin de normaliser les différents résultats obtenus pour les gènes d'intérêt.

Gènes d'intérêt	Séquence sens	Séquence antisens
<i>IL-6</i>	5'- AGCCAGAGTCCTTCAGAGAGATAC -3'	5'- AATTGGATGGTCTTGGTCCTTAGC -3'
<i>IL-1β</i>	5'- ACCTTCCAGGATGAGGACATGA -3'	5'- CTAATGGGAACGTCACACACCA -3'
<i>TNF-α</i>	5'- ATGAGAAGTTCCCAAATGGCC -3'	5'- CCACTTGGTGGTTTGCTACGA -3'
<i>MIP-2</i>	5'- CTGGGGAGAGGGTGAGTTG -3'	5'- GCTGTTCTACTCTCCTCGGTG -3'
<i>NLRP3</i>	5'- ATTACCCGCCCCGAGAAAGG -3'	5'- CATGAGTGTGGCTAGATCCAAG -3'
<i>SOD-1</i>	5'- GTGCAGGGAACCATCCACTT -3'	5'- GTCCTGACAACAACACTGGTTCA -3'
<i>SOD-2</i>	5'- GCGGCCTACGTGAACAATCT -3'	5'- ATATGTCCCCCACCATTGAACT -3'
<i>iNOS</i>	5'- CCCTTCAATGGTTGGTACATGG -3'	5'- ACATTGATCTCCGTGACAGCC -3'
<i>Nox-2</i>	5'- CTGCTCTCCTTTCTCAGGGGT -3'	5'- GTGTGCAGTGCTATCATCCA -3'
<i>Nrf2</i>	5'- TTCTTTCAGCAGCATCCTCTCCAC -3'	5'- ACAGCCTTCAATAGTCCCGTCCAG -3'
<i>Keap1</i>	5'- ACGTCTCGGAGGCTATGAT -3'	5'- TTTGCTTCCGACAGGGTTCC -3'
<i>SMPD3</i>	5'- AGAAACCCGGTCCTCGTACT -3'	5'- CCTGACCAGTGCCATTCTTT -3'
<i>phospho-1</i>	5'- TTCTCATTTTCGGATGCCA -3'	5'- TGAGGATGCGGCGGAAT -3'
<i>TNAP</i>	5'- CTGCCACTGCCTACTTGTGT -3'	5'- GATGGATGTGACCTCATTGC -3'
<i>ULK1</i>	5'- CCAGGCAGACATTGAGAACA -3'	5'- GTTGGCAGCAGGTAGTCAGG -3'
<i>Atg5</i>	5'- GCCGAACCCTTTGCTCAATG -3'	5'- TGGTCACCTTAGGAAATACCCAC -3'
<i>LC3a</i>	5'- AGCTTCGCCGACCGCTGTAAG -3'	5'- CTTCTCCTGTTTCATAGATGTCAGC -3'
<i>LC3b</i>	5'- CGGAGCTTTGAACAAAGAGTG -3'	5'- TCTCTCACTCTCGTACACTTC -3'
<i>Beclin-1</i>	5'- TTTTCTGGACTGTGTGCAGC -3'	5'- GCTTTTGTCCACTGCTCCTC -3'
<i>p62</i>	5'- GCTCAGGAGGAGACGATGAC -3'	5'- AGAAACCCAAGGACAGCATC -3'
<i>Osx</i>	5'- AGCGACCACTTGAGCAAACAT -3'	5'- GCGGCTGATTGGCTTCTTCT -3'
<i>OCN</i>	5'- GACCGCCTACAAACGCATCT -3'	5'- GGGCAGCACAGGTCCTAAATAGT -3'
<i>BMP-2</i>	5'- AGCTGCAAGAGACACCCTTT -3'	5'- CATGCCTTAGGGATTTTGGA -3'
<i>Runx2</i>	5'- AGGCACAGACAGAAGCTTGATG -3'	5'- GCGATCAGAGAACAACACTAGGTTAGA -3'
<i>α-SMA</i>	5'- TGTGCTGGACTCTGGAGATG -3'	5'- GAAGGAATAGCCACGCTCAG -3'
<i>SMemb</i>	5'- CGCGCCAACCTGAAAGACAAA -3'	5'- TCCACGTCCTTCCAAAGCTC -3'
<i>VIM</i>	5'- GAAATTGCAGGAGGAGATGC -3'	5'- TCCACTTTCGGTTCAAGGTC -3'
<i>MGP</i>	5'- ATGAAGAGCCTGCTCCCTCT -3'	5'- ATATTTGGCTCCTCGGCGCT -3'
<i>β-actine</i>	5'- AGAGGGAAATCGTGCGTGAC -3'	5'- CAATAGTGATGACCTGGCCGT -3'

Tableau 4 : Liste des séquences d'amorces utilisées lors de la *quantitative polymerase chain reaction* (qPCR).

IV. Étude de l'expression protéique

1. Extraction protéique

Après incubation avec les différents inducteurs, les cellules sont lavées délicatement deux fois avec du PBS froid sur de la glace. Puis, elles sont grattées dans le tampon de lyse protéique *Radio-ImmunoPrecipitation Assay* (RIPA) contenant de l'eau, 1 % de désoxycholate de sodium (DOC), 1 % de triton X-100, 150 mM de chlorure de sodium (NaCl ; VWR International®, Radnor, Pennsylvanie, États-Unis), 5 mM d'EDTA (Merck®, Darmstadt, Allemagne), 0,1 % de sodium dodécyl sulfate (SDS ; VWR International®, Radnor, Pennsylvanie, États-Unis), 20 mM d'HEPES pH 7,4, 20 mM de fluorure de sodium (NaF), 20 mM de β -glycérophosphate, 4 mM de sodium orthovanadate, 100 μ l de sodium pyrophosphate, 100 μ l d'inhibiteur de protéases. Le lysat obtenu est ensuite soniqué et centrifugé à 16 060 g pendant 5 minutes à +4 °C. Le surnageant contenant les protéines est ensuite transvasé dans de nouveaux tubes et congelé à -20 °C jusqu'au dosage.

2. Dosage protéique

La concentration protéique totale des échantillons est déterminée par un dosage colorimétrique à l'aide du kit *BCA™ Protein Assay* (Pierce™ ; Thermo Fisher Scientific®, Waltham, Massachusetts, États-Unis). Ce kit repose sur la détection d'un composé coloré en pourpre, l'acide bicinchoninique qui est formé après réduction par les protéines des ions cuivriques Cu^{2+} en ions Cu^+ (**Figure 35**). L'acide bicinchoninique possédant une absorbance maximale à 562 nm, l'absorbance mesurée des différents échantillons permet donc de déterminer la concentration protéique totale.

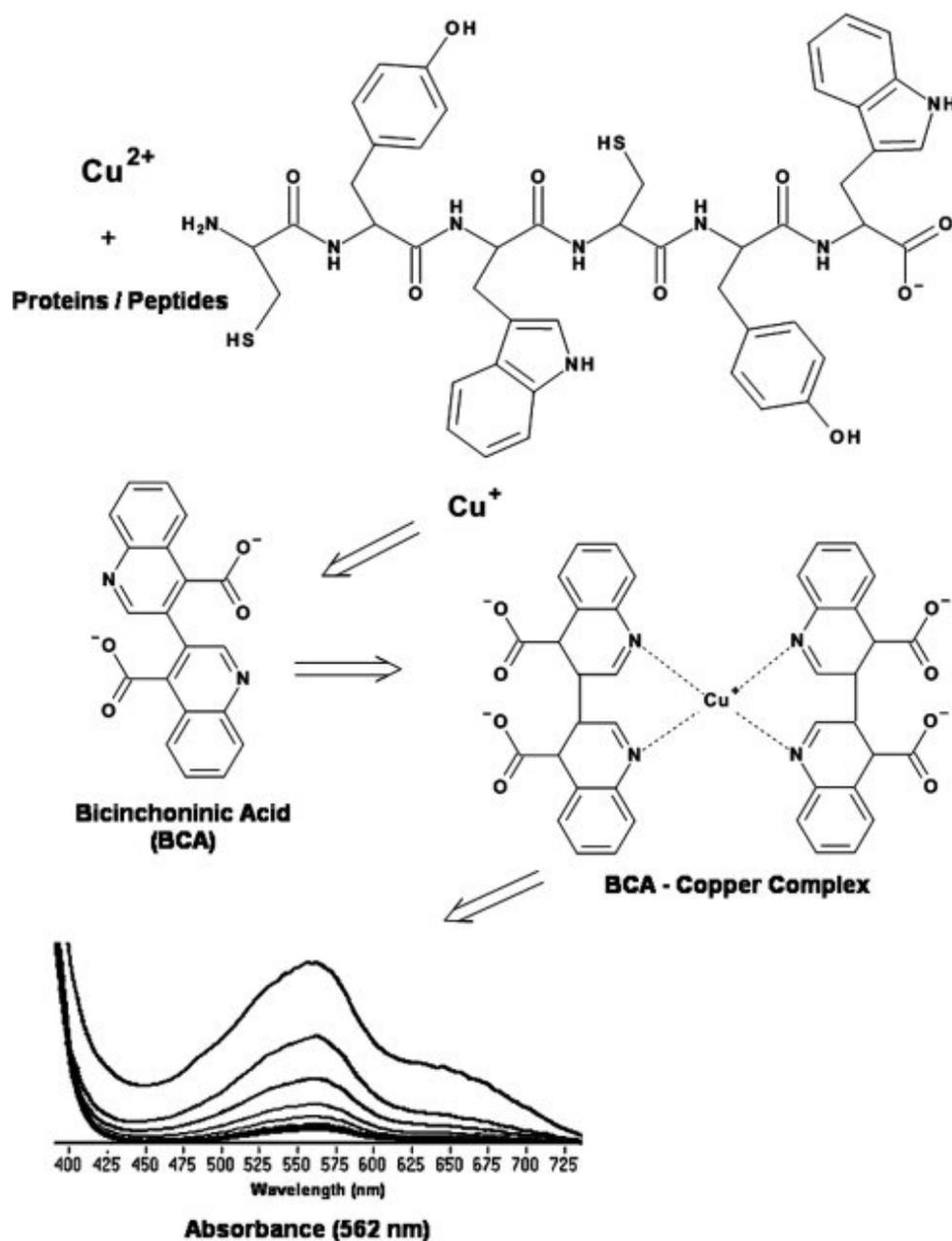


Figure 35 : Schéma du dosage protéique par la méthode BCA [215].

Afin d'évaluer la concentration protéique de nos échantillons, une gamme d'étalonnage (de $5 \cdot 10^{-3}$ à $3 \cdot 10^{-2}$ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) est réalisée à l'aide d'une solution mère de *bovine serum albumin* (BSA) à une concentration de 2 mg/mL. Puis, 2 μl d'échantillon ou de gamme sont déposés en plaque 96 puits et 200 μl de réactif du kit *BCA™ Protein Assay* sont ajoutés. Les échantillons sont ensuite incubés pendant 15 minutes à 56 °C et l'absorbance est mesurée à 570 nm à l'aide du lecteur de microplaques *Envision Microplate Reader*.

3. Précipitation des protéines

Après le dosage protéique, les échantillons sont précipités afin de concentrer les protéines et optimiser l'analyse des protéines d'intérêt par *Western Blot*. Brièvement, à 100 µg de protéines sont ajoutés 400 µl de méthanol et 100 µl de chloroforme. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 16 060 g pendant 5 minutes à température ambiante. Le culot protéique obtenu est ensuite repris dans une solution contenant de l'eau, du Laemmli 4X et du β-mercaptoéthanol. Les échantillons sont ensuite incubés à température ambiante pendant 1 heure puis conservés à -20 °C jusqu'à analyse ultérieure.

4. Western Blot

L'expression des différentes protéines d'intérêt a été analysée en *Western Blot*. Les échantillons protéiques obtenus après précipitation sont chauffés à 99 °C pendant 5 minutes afin de dénaturer les protéines.

Les gels de séparation et de concentration sont préparés par ajout dans un volume d'eau, d'acrylamide, de tris base (Merck[®], Darmstadt, Allemagne), de SDS 10 % et d'ammonium persulfate 10 %. Un activateur de polymérisation, le TEMED, est ajouté juste avant de couler les gels. Le pourcentage d'acrylamide dans le gel de séparation est déterminé en fonction du poids moléculaire de la protéine d'intérêt. Plus le poids moléculaire de la protéine d'intérêt est élevé et plus le pourcentage d'acrylamide ajouté est faible. Pour des protéines de poids moléculaire compris entre 0 et 30 kDa, des gels de 12 % d'acrylamide sont utilisés alors que pour les protéines de poids moléculaire compris entre 40 et 60 kDa, 10 % d'acrylamide sont ajoutés dans le gel.

Puis, 50 µg d'extrait protéique sont déposés dans les puits du gel d'acrylamide. Les protéines sont séparées par migration électrophorétique à 90 V pendant 2 heures. Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Thermo Fisher Scientific[®], Waltham, Massachusetts, États-Unis) par transfert semi-liquide à 60 V pendant 2 heures. Une coloration des protéines au rouge ponceau est ensuite réalisée afin de s'assurer du transfert des protéines du gel vers la membrane de nitrocellulose.

La membrane contenant les protéines est ensuite saturée pendant 1 heure à température ambiante sous agitation lente dans une solution de *Tris Buffered Saline Tween* (TBST) contenant 50 mM de tris/acide chlorhydrique (HCl), 150 mM de NaCl, 0,1 % de Tween 20 et 5 % de lait ou de BSA (Euromedex[®], Souffelweyersheim, France). Cette étape de saturation permet de bloquer tous les sites non-spécifiques de la membrane.

La membrane est ensuite incubée dans une solution de TBST contenant l'anticorps primaire (**Tableau 5**) à +4 °C pendant une nuit, sous agitation lente. Trois rinçages au TBST sont ensuite réalisés puis la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire adéquat couplé à la peroxidase de raifort (HRP) pendant 1 heure à température ambiante sous agitation lente. La membrane est de nouveau lavée 3 fois au TBST.

	Anticorps	Référence	Dilution
Anticorps primaires	<i>Rabbit anti-SMPD3</i>	Sigma-Aldrich® SAB2102245	1/10 000 5 % lait
	<i>Rabbit anti-CD9</i>	GeneTex® GTX55564	1/1000 5 % BSA
	<i>Goat anti-CD81</i>	Santa Cruz Biotechnology, Inc.® sc-31234	1/1000 5 % BSA
	<i>Rabbit anti-p62/SQSTM1</i>	Sigma-Aldrich® P0067	1/1000 5 % BSA
	<i>Mouse anti β-actine</i>	Sigma-Aldrich® A1978	1/5000 5 % BSA
Anticorps secondaires	<i>Goat anti-rabbit IgG-HRP</i>	Santa Cruz Biotechnology, Inc.® sc-2004	1/5000
	<i>Goat anti-mouse IgG-HRP</i>	Santa Cruz Biotechnology, Inc.® sc-2005	1/5000
	<i>Rabbit anti-goat IgG(H+L)-HRP</i>	Southern Biotech® 6160-05	1/5000

Tableau 5 : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour le *Western Blot*.

La révélation des bandes correspondant aux protéines est réalisée par chimioluminescence à l'aide du système de détection *ECL™ Western Blotting Detection Reagents* et de l'appareil *ChemiDoc™ MP Imaging System* (Bio-Rad®, Hercules, Californie, États-Unis). Les bandes protéiques sont ensuite détectées et quantifiées en utilisant le logiciel *Image Lab* (Bio-Rad®, Hercules, Californie, États-Unis). L'expression de la protéine β-actine est également analysée afin de normaliser l'expression des protéines d'intérêt entre les différentes conditions.

V. Préparation des vésicules extracellulaires (EVs)

1. Isolation des EVs

Les macrophages (RAW 267.4) sont ensemencés dans des boîtes de pétri de 10 cm de diamètre et cultivés en présence ou non de traitement dans du milieu DMEM 6546 supplémenté avec 10 % de SVF déplété en exosomes (Thermo Fisher Scientific[®], Waltham, Massachusetts, États-Unis). Les EVs sont ensuite isolées à partir du surnageant de culture de ces macrophages traités ou non.

Un premier protocole d'isolation d'EVs décrit par Théry *et al.* [216], a été testé sur nos surnageants de culture cellulaire. Ce protocole consistant en plusieurs étapes successives de centrifugation et d'ultracentrifugation permet d'isoler les différentes sous-populations d'EVs : corps apoptotiques, microvésicules et exosomes.

Malheureusement, comme dans notre modèle cellulaire nous travaillons sur des temps courts de traitement (6 heures pour le LPS-EK et 24 heures pour l'homocystéine), la quantité d'EVs sécrétées par les cellules est faible et par conséquent ce protocole d'isolation d'EVs ne nous a pas permis d'obtenir des quantités suffisantes des différentes sous-populations d'EVs pour nos expériences ultérieures. C'est pourquoi, nous avons utilisé le protocole d'isolation de l'ensemble des EVs décrit par Chen *et al.* [217], qui nous a ainsi permis de récolter une plus grande quantité d'EVs (**Figure 36**). Brièvement, après traitement, le surnageant de culture cellulaire est récolté et centrifugé à 800 g pendant 5 minutes à +4 °C afin d'éliminer les débris cellulaires. Puis, une première étape d'ultracentrifugation est réalisée à 100 000 g pendant 50 minutes à +4 °C. Le culot total d'EVs obtenu est ensuite repris dans du PBS froid et une deuxième étape d'ultracentrifugation est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment. Le culot d'EVs est ensuite repris soit dans du PBS soit dans un tampon de lyse protéique RIPA selon le besoin de l'expérimentation ultérieure puis congelé à -80 °C jusqu'à analyse.

Lignée murine de macrophages

RAW 264.7

(± LPS-EK ou Homocystéine)

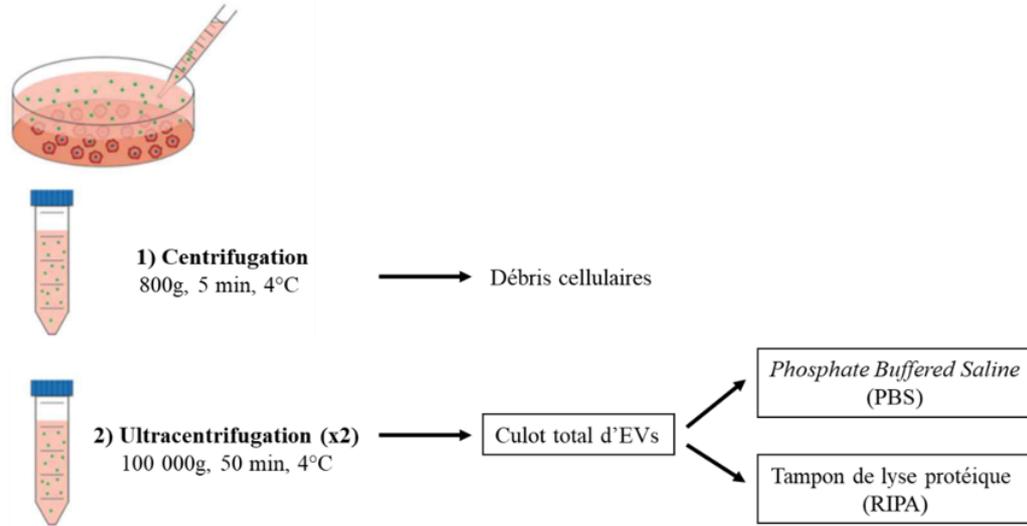


Figure 36 : Protocole d'extraction des vésicules extracellulaires (EVs) de macrophages.

2. Caractérisation des EVs

2.1. Analyse des EVs par microscopie électronique en transmission (TEM)

La morphologie des EVs a été analysée par microscopie électronique en transmission (TEM) en utilisant la méthode classique de coloration négative. En effet, cette technique permet d'analyser la morphologie de particules telles que les EVs en utilisant des sels de métaux lourds tels que l'acétate d'uranyle (**Figure 37**). Ce contrastant se lie à la surface des particules et dévie les électrons au sein du microscope ce qui permet d'obtenir un contraste entre les particules à visualiser et le reste de la photographie.

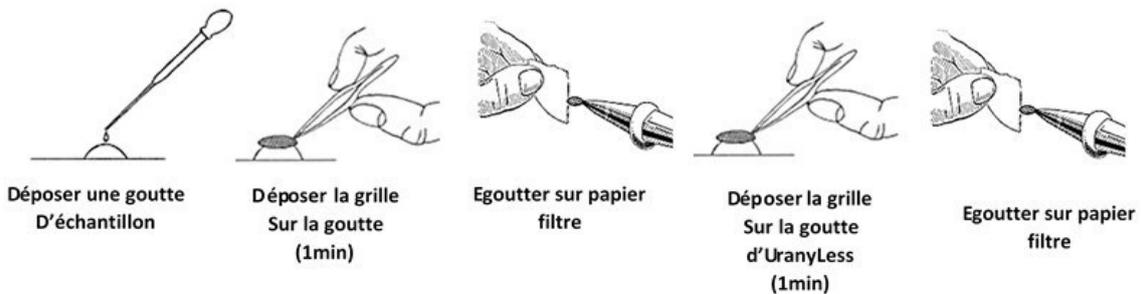


Figure 37 : Protocole de coloration négative pour une analyse par microscopie électronique en transmission (TEM).

(<http://uranylless.com/fr/la-coloration-negative/>)

Les EVs ont été isolées comme décrit précédemment et reprises dans 50 µl de tampon Tris Base (100 mM, pH 7,4). Un volume de 10 µl d'échantillon est absorbé pendant deux minutes sur une grille hexagonale de cuivre recouverte de Formvar et d'un film de carbone. Les préparations sont ensuite incubées avec 1% d'acétate d'uranyle pendant 1 minute. Les grilles sont ensuite analysées à l'aide du microscope électronique à transmission JEM-1400 80 kV (JEOL Inc., Peabody, Massachusetts, États-Unis) et l'acquisition des images est réalisée à l'aide de la caméra digitale Gatan Orius (Gatan Inc., Pleasanton, Californie, États-Unis).

2.2. Analyse des EVs par cryo-microscopie électronique (cryo-EM)

Les EVs ont également été analysées par cryo-microscopie électronique (cryo-EM). Cette technique peut être utilisée afin d'analyser la morphologie mais également l'intégrité de la bicouche lipidique des EVs. L'avantage majeur de cette technique est l'absence d'utilisation de colorant, de fixateur ou de rayons X. En effet, la grille de microscopie électronique contenant les échantillons est congelée dans de l'éthane liquide puis analysée à l'aide d'un microscope électronique à transmission (**Figure 38**).

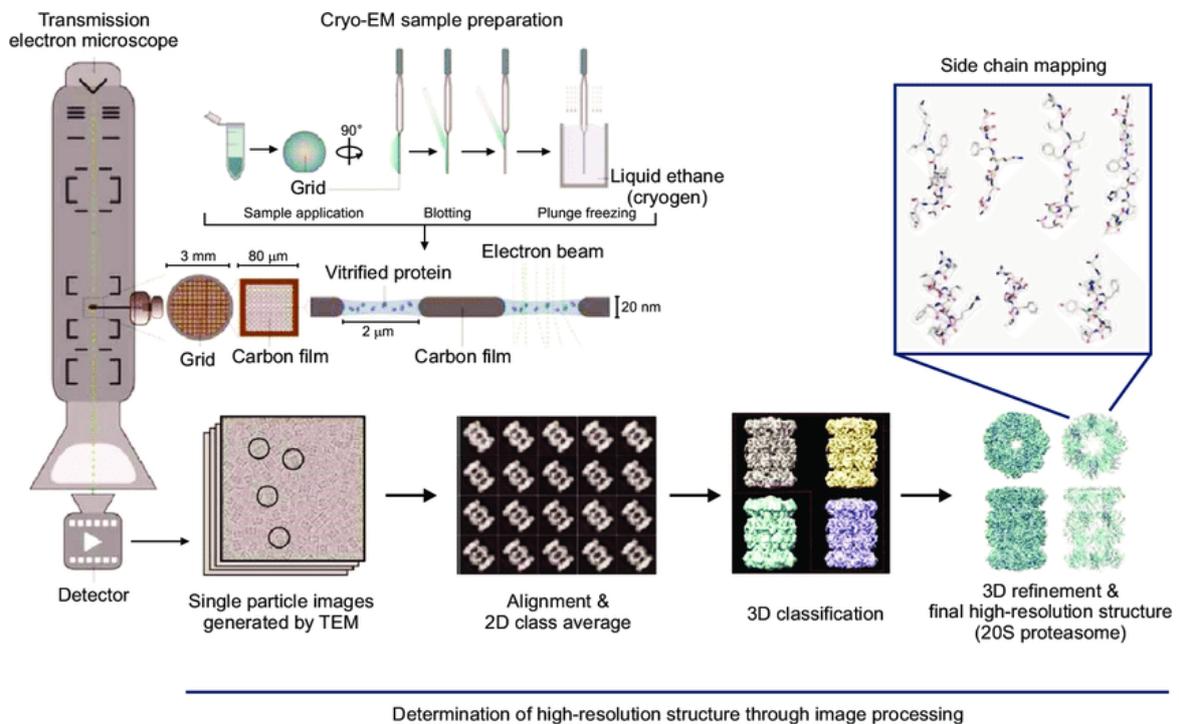


Figure 38 : Principales étapes pour l'analyse d'échantillons biologiques par cryo-microscopie électronique (cryo-EM) [218].

Les EVs isolées sont reprises dans 50 μ l de tampon Tris Base (100 mM, pH 7,4). Un volume de 3 μ l d'échantillons est déposé sur une grille de carbone 200 Mesh chargée dans une chambre thermostatique d'un automate de cryofixation Leica EM-GP (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Allemagne) réglé à 20 °C et à 95 % d'humidité. La solution en excès est retirée à l'aide d'un papier filtre whatman et la grille est immédiatement congelée dans de l'éthane liquide à -185 °C. Les échantillons sont ensuite transférés dans un porte-cryo Gatan 626 et analysés à l'aide du microscope électronique à transmission Jeol 2100 (JEOL Inc., Peabody, Massachusetts, États-Unis), équipé d'une cathode LaB6 et fonctionnant à 200 kV. L'acquisition des images est réalisée à l'aide du logiciel SerialEM [219] (défocus compris entre 600 et 1000 nm, caméra CCD Gatan US4000).

2.3. Analyse du suivi individuel de particules (NTA)

Une analyse du suivi individuel de particules (NTA) a été réalisée afin de déterminer la concentration ainsi que la distribution par taille des EVs contenues dans nos différents échantillons. Cette technique repose sur la capacité des particules à dévier la lumière émise par un faisceau laser (**Figure 39**). La taille des particules soumises à un mouvement Brownien (interaction avec les molécules du fluide) est déterminée par l'appareil en calculant le diamètre hydrodynamique à l'aide de l'équation de Stokes-Einstein.

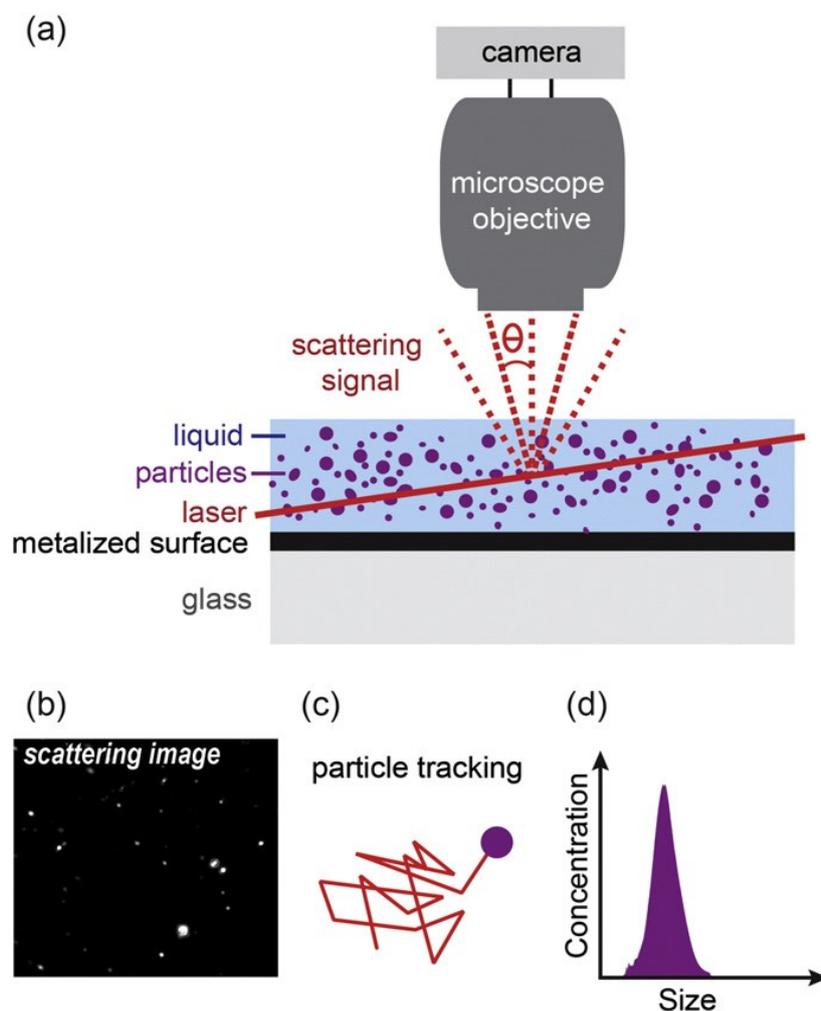


Figure 39 : Illustration schématique du dispositif d'analyse du suivi individuel de particules (NTA) (a) et les différents résultats obtenus après analyse (b)(c)(d) [220].

Les EVs isolées sont reprises dans 50 μl de PBS. La distribution par taille des particules ainsi que leur concentration ont été déterminées à l'aide du NanoSight LM10-HS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Royaume-Uni) selon les recommandations du fournisseur de l'appareil. Brièvement, chaque échantillon est injecté dans la chambre d'analyse. Les échantillons sont analysés par l'appareil à température ambiante pendant 60 secondes. Chaque expérience est répétée trois fois. Les données sont acquises et analysées à l'aide du logiciel NTA 2.2 Build 127 (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Royaume-Uni).

2.4. Analyse de l'activité acétylcholinestérase (AChE)

Afin de caractériser les EVs de macrophages, l'activité acétylcholinestérase (AChE) des échantillons d'EVs a été analysée. En effet, selon l'ISEV, l'activité AChE est un marqueur spécifique d'EVs [9].

Pour cela, une méthode colorimétrique décrite par Ellman *et al.* [221], a été utilisée (**Figure 40**). L'AChE hydrolyse l'acétylthiocholine ce qui permet la formation de thiocholine. La thiocholine va à son tour réduire le 5,5'-Dithiobis 2-nitrobenzoic acid (DNTB) en nitrobenzoate qui absorbe à 450 nm.

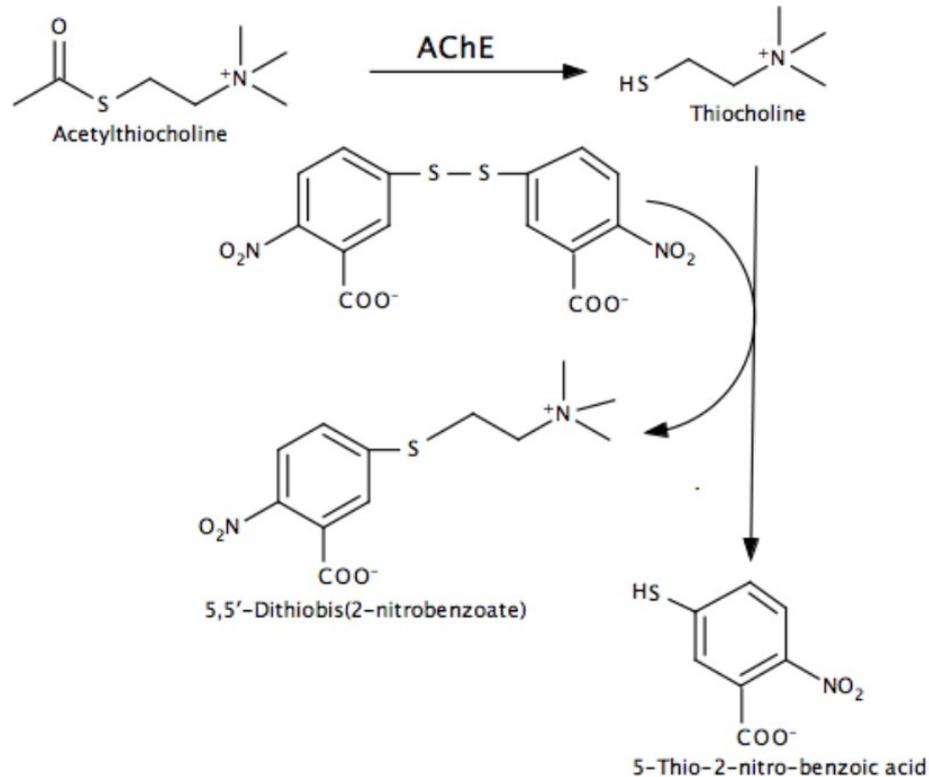


Figure 40 : Étude de l'activité acétylcholinestérase (AChE) par la méthode colorimétrique d'Ellman *et al.* [222].

Des solutions d'acétylthiocholine et de DNTB sont préparées à une concentration de 75 mM et 10 mM respectivement. La solution réactionnelle finale est réalisée selon le ratio 150:2:5 afin d'obtenir une concentration finale d'1 mM d'acétylcholine et de 0,1 mM de DNTB dans du PBS. Puis, 100 µl d'échantillon d'EVs sont déposés dans une plaque 96 puits et 200 µl de solution réactionnelle sont ajoutés dans chacun des puits. Après une incubation de 15 minutes à température ambiante, l'absorbance est lue à 450 nm à l'aide du lecteur de microplaques *Envision Microplate Reader*.

2.5. Analyse de l'expression de molécules spécifiques des EVs

Selon l'ISEV, différentes molécules spécifiques des EVs sont retrouvées au niveau intra-vésiculaires ou membranaires [9]. Nous avons donc analysé l'expression protéique de deux tétraspanines membranaires spécifiques d'EVs (CD9 et CD81) par *Western Blot*.

VI. Étude du stress oxydant

1. Étude de la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Les ROS (H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, ONO_2^{\cdot} ...) sont des molécules chimiques hautement réactives produites lors de réactions biochimiques intracellulaires. Afin d'étudier la production intracellulaire des ROS des macrophages traités avec les différents inducteurs, un test reposant sur l'utilisation du diacétate de dichlorodihydrofluorescéine 2',7' (DCFH-DA) a été réalisé. Le DCFH-DA est une molécule perméable capable de diffuser à travers la membrane cellulaire (**Figure 41**). Une fois dans la cellule, les groupements acétates de cette molécule sont clivés par des estérases intracellulaires. Lorsque la molécule obtenue (DCFH₂) est oxydée en présence de ROS, elle se transforme en molécule DCF fluorescente et donc détectable.

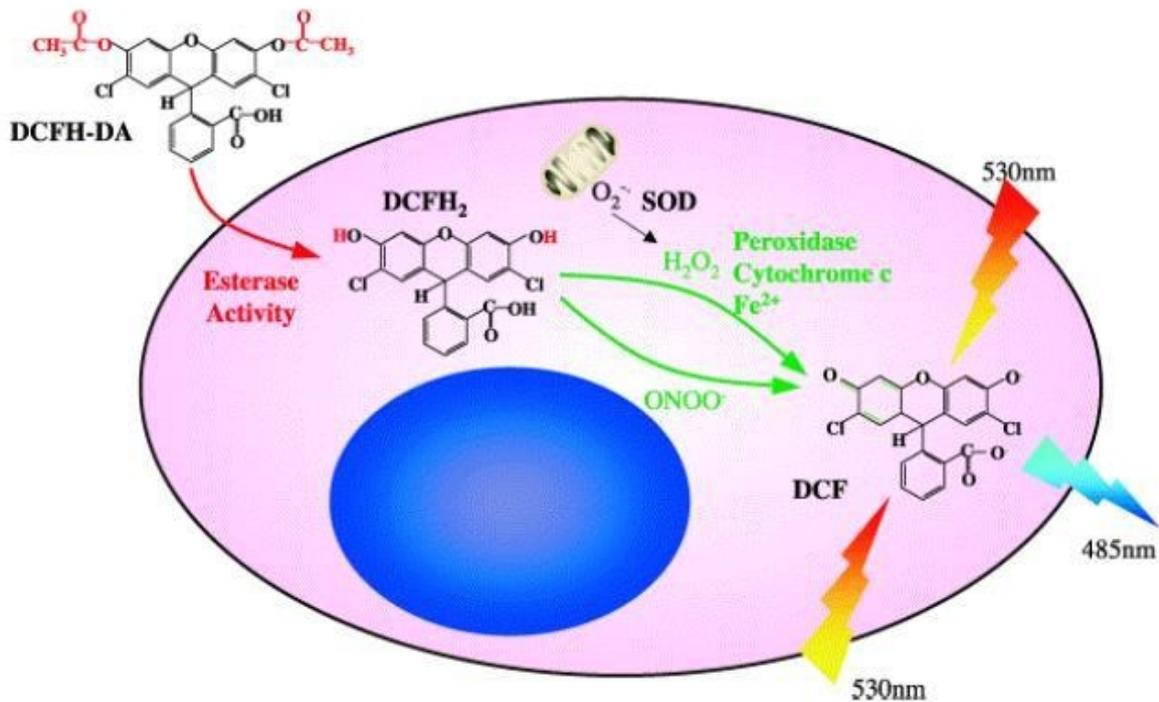


Figure 41 : Schéma de la réaction d'oxydation du diacétate de dichlorodihydrofluorescéine 2',7' (DCFH-DA).

(<https://docplayer.fr/72239158-Oxidative-stress-from-toxicity-to-cell-interactions.html>)

Les macrophages sontensemencés dans une plaque opaque blanche de 96 puits à une densité de 7 500 cellules par puits dans du milieu DMEM contenant 10 % de SVF. Du fait de l'utilisation d'une plaque opaque, les cellules sont égalementensemencées dans une plaque transparente de 96 puits afin de suivre leur prolifération. Après 48 heures, le milieu des cellules est remplacé par du milieu DMEM contenant 0,5 % de SVF. Le lendemain, les cellules sont lavées avec du PBS et traitées avec une solution de PBS contenant le DCFH-DA (Molecular Probes[®], Eugene, Oregon, États-Unis) à une concentration de 10 μM pendant 30 minutes à 37 °C. Les cellules sont de nouveau lavées avec du PBS et traitées avec les différents inducteurs (LPS-EK ou homocystéine). Du H_2O_2 à des concentrations de 50 et 500 μM est utilisé comme contrôle positif. Dans certaines expériences, les cellules ont également été traitées 1 heure avant avec deux antioxydants : la N-acétyl-L-cystéine à une concentration de 10 mM et l' α -tocophérol ou vitamine E à une concentration de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La fluorescence est mesurée à l'aide du lecteur de microplaques *Envision Microplate Reader* (λ_{Ex} 492 nm, λ_{Em} 535 nm).

2. Étude de la production de l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

Afin d'étudier plus particulièrement la production intracellulaire de l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ par les macrophages traités au LPS-EK ou à l'homocystéine, un test reposant sur l'utilisation de la molécule de dihydroéthidium (DHE) a été utilisé. Cette molécule perméable passe la membrane cellulaire et est oxydée en présence d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ en 2-hydroxyéthidium qui est alors fluorescent et détectable (**Figure 42**).

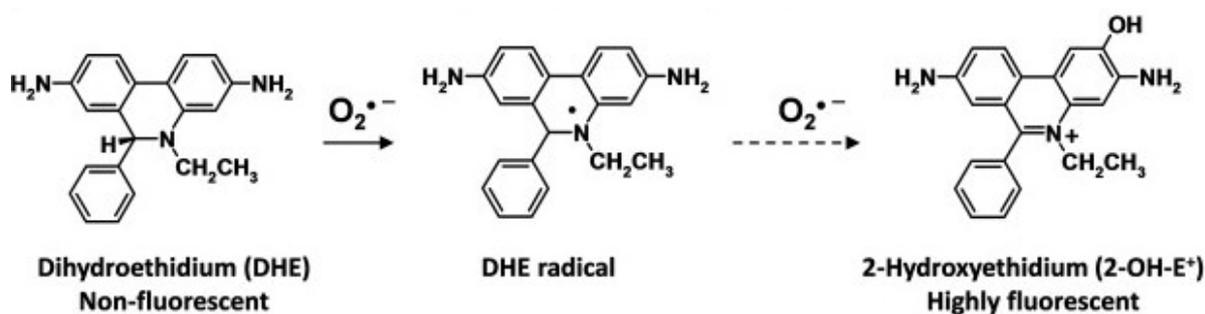


Figure 42 : Schéma de la réaction d'oxydation du dihydroéthidium (DHE) [223].

Le protocole utilisé est identique à celui permettant l'étude des ROS à la seule différence que les cellules sont traitées avec une solution de PBS contenant le DHE (Thermo Fisher Scientific[®], Waltham, Massachusetts, États-Unis) à une concentration de 10 μM pendant 1 heure à 37 °C. La fluorescence est mesurée à l'aide du lecteur de microplaques *Envision Microplate Reader* (λ_{Ex} 492 nm, λ_{Em} 615 nm).

VII. Étude de la production du monoxyde d'azote (NO)

La production intracellulaire de NO par les macrophages traités au LPS-EK ou à l'homocystéine a été analysée en utilisant la molécule de diacétate de fluorescéine (DAF-FM). Du fait de sa perméabilité, cette molécule diffuse à travers la membrane cellulaire. En présence de NO, le DAF-FM non fluorescent, se transforme en un dérivé benzotriazole fluorescent et détectable (**Figure 43**).

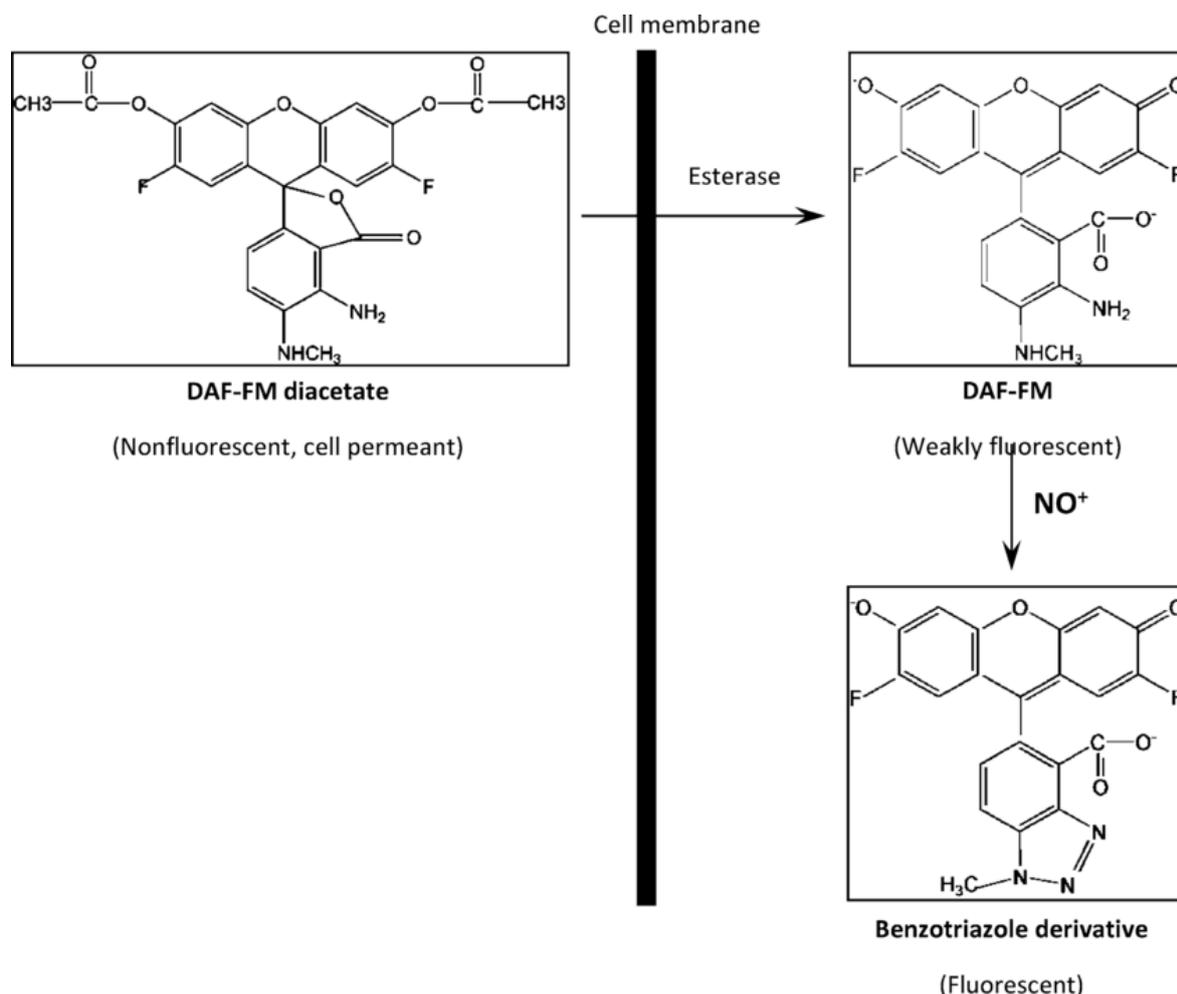


Figure 43 : Détection du monoxyde d'azote (NO) intracellulaire par le diacétate de fluorescéine (DAF-FM) [224].

Le protocole utilisé est proche de celui permettant l'étude des ROS et de l'O₂⁻ à la différence que les cellules sont traitées dans une solution de Krebs-Ringer contenant le DAF-FM à une concentration de 0,1 μM pendant 1 heure à 37 °C. De plus, les cellules sont traitées avec 50 μM de L-arginine, substrat de l'*inductible NO synthase* (iNOS), enzyme produisant le NO. Cela permet de s'assurer que les résultats obtenus ne sont pas la conséquence d'un manque de substrat. La fluorescence est mesurée à l'aide du lecteur de microplaques *Envision Microplate Reader* (λ_{Ex} 492 nm, λ_{Em} 535 nm).

VIII. Étude de la calcification

Afin d'induire leur calcification, les CMLV MOVAS-1 sont cultivées pendant 7 ou 14 jours à 37 °C et à 5 % de CO₂ dans du milieu DMEM 6546 supplémenté avec 1 % de SVF et 4 mM de Pi (NaH₂PO₄·H₂O ; Merck[®], Darmstadt, Allemagne). Le milieu DMEM 6546 contenant l'équivalent de 1 mM de Pi, seulement 3 mM de Pi sont ajoutés dans le milieu.

Pour étudier l'induction d'une calcification par le Pi au niveau des CMLV, un dosage de calcium intracellulaire est réalisé par la méthode colorimétrique à l'o-crésolphthaléine [225]. En milieu alcalin, l'o-crésolphthaléine forme un complexe coloré violet avec le calcium. L'intensité de coloration de la solution obtenue est alors proportionnelle à la concentration de calcium contenu dans l'échantillon.

Une solution réactionnelle contenant du 2-Amino-2-méthyl-1-propanol 0,5 M (AMP), 191 µg/mL d'o-crésolphthaléine complexone et 2,33 mg/mL de 8-hydroxyquinoline est chauffée pendant 2 heures à 55 °C. Dans le même temps, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS puis décalcifiées avec une solution d'HCl 0,6 N pendant 2 heures à température ambiante. Puis, 25 µl d'échantillon ou de gamme de calcium Ca²⁺ (de 4,4.10⁻³ à 9,8.10⁻² µg/µl) sont déposés dans une plaque 96 puits. Un volume de 150 µl de solution réactionnelle est alors ajouté dans chacun des puits. L'absorbance est lue immédiatement à 565 nm à l'aide du lecteur de microplaques *Envision Microplate Reader*.

Les cellules sont ensuite lavées deux fois avec du PBS et 50 µl d'hydroxyde de sodium 0,1 N (NaOH) sont ajoutés et incubés pendant 30 minutes sous agitation modérée afin de réaliser par la suite un dosage des protéines totales selon la méthode de Peterson [226]. Une solution contenant un même volume de 2-chlorotriyl chloride (CTC), de NaOH 0,8 N, de SDS 10 % et d'eau est préparée et 500 µl de cette solution sont ajoutés à 50 µl d'échantillon ou d'une gamme (de 0,1 à 1 mg/mL) réalisée à partir de BSA à 2 mg/mL. Après une incubation de 10 minutes à température ambiante, 250 µl de réactif de Folin sont ajoutés aux échantillons. Après 30 minutes d'agitation à température ambiante, l'absorbance est lue à 750 nm à l'aide du lecteur de microplaques *Envision Microplate Reader*. Les résultats obtenus lors du dosage de calcium intracellulaire sont alors normalisés par la concentration de protéines totales obtenue après le dosage de Peterson.

IX. Étude de l'expression des cytokines pro-inflammatoires

Afin d'évaluer le profil inflammatoire des macrophages traités et des EVs sécrétées par ces derniers, nous avons utilisé un kit de dosage multiplex (V-PLEX[®] K15048D, Meso Scale Diagnostics[®], Rockville, Maryland, États-Unis). Ce kit repose sur le principe de l'*enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) et permet de doser dans nos échantillons protéiques issus soit de macrophages contrôles ou traités (LPS-EK ou homocystéine) soit d'EVs sécrétées par ces mêmes cellules, un panel de 10 cytokines pro-inflammatoires dans un seul et même puits (**Figure 44**).

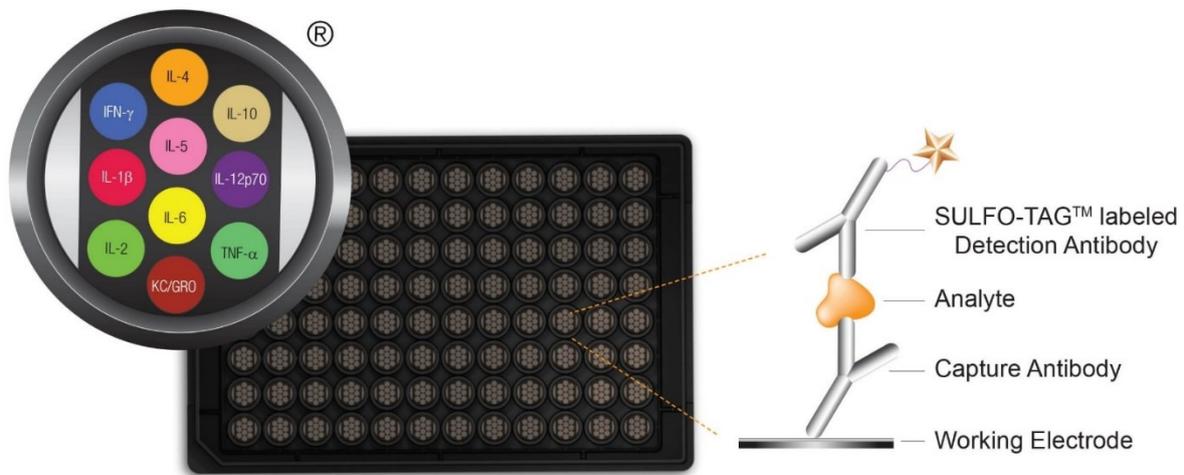


Figure 44 : Principe général de la technologie MSD.

(<https://www.mesoscale.com/en/products/v-plex-proinflammatory-panel-1-mouse-kit-k15048d>)

Ce kit a été utilisé selon les recommandations du fournisseur. Brièvement, 50 μ l de chaque point de gamme ou d'échantillons protéiques sont déposés dans une plaque 96 puits fournie dans le kit MSD. Celle-ci est pré-coatée avec les anticorps de capture dirigés contre différentes cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF- α , IFN- γ , KC-GRO) (**Figure 44**). Après une incubation de 2 heures à température ambiante et sous agitation modérée, les puits sont lavés trois fois avec du PBS contenant 0,05 % de Tween-20. Puis, 25 μ l de solution de détection sont ajoutés. Après 2 heures d'incubation à température ambiante et sous agitation modérée, 3 lavages sont réalisés avec du PBS contenant 0,05 % de Tween-20. Enfin, 150 μ l de tampon de lecture sont ajoutés dans chaque puit. La plaque est ensuite analysée à l'aide de l'appareil MSD (Meso Scale Diagnostics[®], Rockville, Maryland, États-Unis).

X. Analyse protéomique par spectrométrie de masse

1. Digestion protéique

Une analyse protéomique des échantillons d'EVs a été réalisée par spectrométrie de masse afin d'étudier le contenu protéique des EVs sécrétées par les macrophages traités ou non. Les EVs isolées sont resuspendues dans du tampon de lyse protéique RIPA. La digestion protéique est réalisée sur 10 µg d'échantillons à l'aide de la colonne microspin S-Trap™ (Protifi, Hutington, États-Unis), selon les recommandations du fournisseur. Brièvement, les échantillons ont été réduits avec 20 mM de tris (2-carboxyéthyl) phosphine (TCEP) et alkylés avec 50 mM de chloracétamide (CAA) pendant 15 minutes à température ambiante. De l'acide phosphorique aqueux a ensuite été ajouté à une concentration finale de 1,2 % après l'ajout d'un tampon de liaison S-Trap™ (méthanol aqueux à 90 %, bromure de tétraéthylammonium (TEAB) à 100 mM, pH 7,1). Les mélanges ont ensuite été chargés sur les colonnes S-Trap™ puis les échantillons ont été digérés avec 1 µg de trypsine (Promega, Madison, Wisconsin, États-Unis) à 47 °C pendant 1 heure.

2. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) couplée à la spectrométrie de masse

Après élution, les peptides ont été séchés sous vide et remis en suspension dans 45 µl d'eau contenant 2 % d'acétonitrile (ACN) et 0,1 % d'acide formique. Un volume de 1 µL de la suspension peptidique a été injecté dans le système de chromatographie en phase liquide à haute performance HPLC nanoElute® (Bruker Daltonics, Allemagne) couplé au spectromètre de masse timsTOF Pro (Bruker Daltonics, Allemagne). La séparation par HPLC (solvant A : 0,1 % d'acide formique dans l'eau, 2 % d'ACN ; solvant B : 0,1 % d'acide formique dans l'ACN) a été menée avec un débit de 250 nL/min à l'aide d'une colonne émettrice remplie (C18, 25 cm x 75 µm, 1,6 µm ; Ion Optics, Australie). Une élution par gradient à l'aide du solvant B a été réalisée selon les étapes suivantes : 2 à 11 % pendant 19 minutes, 11 à 16 % pendant 7 minutes, 16 à 25 % pendant 4 minutes, 25 à 80 % pendant 3 minutes et 80 % pendant 7 minutes afin de laver la colonne. Les données de spectrométrie de masse ont été acquises à l'aide de la méthode de fragmentation accumulation-séquentielle parallèle (PASEF). Les mesures ont été effectuées sur une gamme allant de 100 à 1700 m/z. La durée totale du cycle a été fixée à 1,2 secondes et le nombre de scans MS/MS PASEF à 10.

3. Analyse des données

Les données obtenues ont été analysées à l'aide du logiciel MaxQuant (version 1.6.14.0) comme décrit précédemment [227] et comparées à la base de données UniProtKB/Swiss-Prot *Mus musculus* (version 02-04-2020, 17 040 entrées). L'analyse statistique et bio-informatique a été réalisée à l'aide du logiciel Perseus (version 1.6.14.0) [228]. Cinq réplicats indépendants par condition ont été réalisés. Des tests de Student non appariés ont été menés à l'aide d'un taux de fausses découvertes (FDR) inférieur à 5 %.

XI. Analyses statistiques

Les données obtenues ont été analysées à l'aide du logiciel *GraphPad Prism* (*GraphPad Software Inc. Version 7.0* ; San Diego, Californie, États-Unis). Des tests non paramétriques de Wilcoxon-Mann-Whitney et de Kruskal-Wallis suivis de post-test de Dunn ont été réalisés avec un seuil de significativité de 5 %. Tous les résultats sont exprimés par la moyenne \pm l'erreur standard à la moyenne (SEM).

Résultats

Partie I :
LPS-EK

I. Effets du LPS-EK sur les macrophages

1. Effets du LPS-EK sur la viabilité cellulaire des macrophages

Dans un premier temps, nous avons évalué la viabilité des cellules RAW 264.7 après un traitement de 24 heures avec le LPS-EK aux concentrations de 0,1 et 1 $\mu\text{g/ml}$, concentrations habituellement utilisées pour activer les macrophages RAW [229]. Pour cela, nous avons utilisé le test de viabilité cellulaire WST-1. Comme attendu, le DMSO 10 %, utilisé comme contrôle positif de perte de viabilité cellulaire, diminue significativement (-80%) la viabilité cellulaire (* $p < 0,05$ vs. CT ; **Figure 45A**). Le LPS-EK induisant environ 25% de cytotoxicité cellulaire (* $p < 0,05$ vs. CT ; **Figure 45A**), nous avons testé des temps plus courts de traitements. Comme le montre la **Figure 45B**, le LPS-EK n'a pas d'effet sur la viabilité des macrophages après une incubation de 6 heures. Nous avons donc utilisé ces conditions expérimentales pour nos expériences ultérieures.

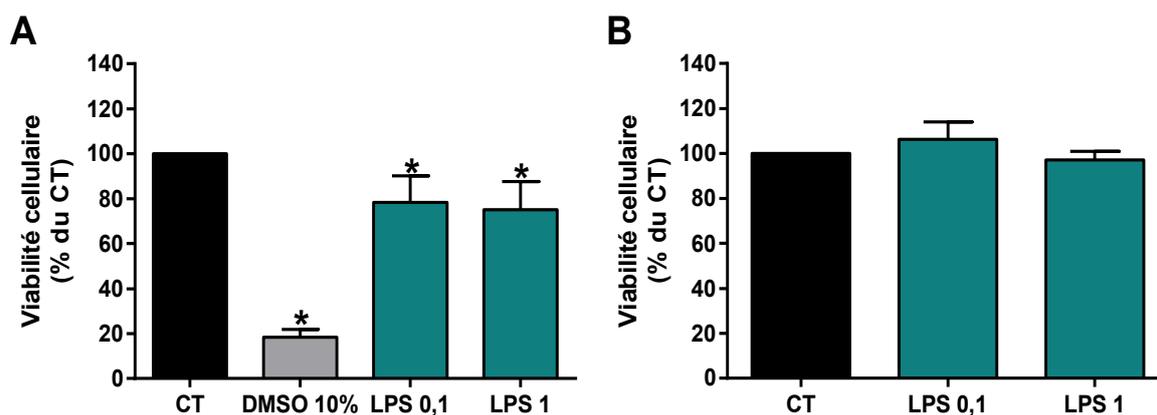


Figure 45 : Effets du lipopolysaccharide (LPS-EK) sur la viabilité cellulaire des macrophages.

Les cellules ont été incubées avec du LPS-EK pendant (A) 24 heures ou (B) 6 heures. La viabilité cellulaire est ensuite mesurée par le test de WST-1. Le diméthyl sulfoxyde 10% (DMSO 10%) a été utilisé comme contrôle positif de perte de viabilité cellulaire. La viabilité des cellules non traitées est rapportée à 100 %. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicate ($n=4$). * $p < 0,05$ vs. CT ; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney. LPS 0,1, LPS-EK 0,1 $\mu\text{g/mL}$; LPS 1, LPS-EK 1 $\mu\text{g/mL}$.

De plus, il semblerait qu'un traitement au LPS-EK à une concentration de 1 $\mu\text{g/ml}$ et 6 heures d'incubation entraîne un changement morphologique des macrophages et notamment une forme plus allongée des cellules (**Figure 46**).

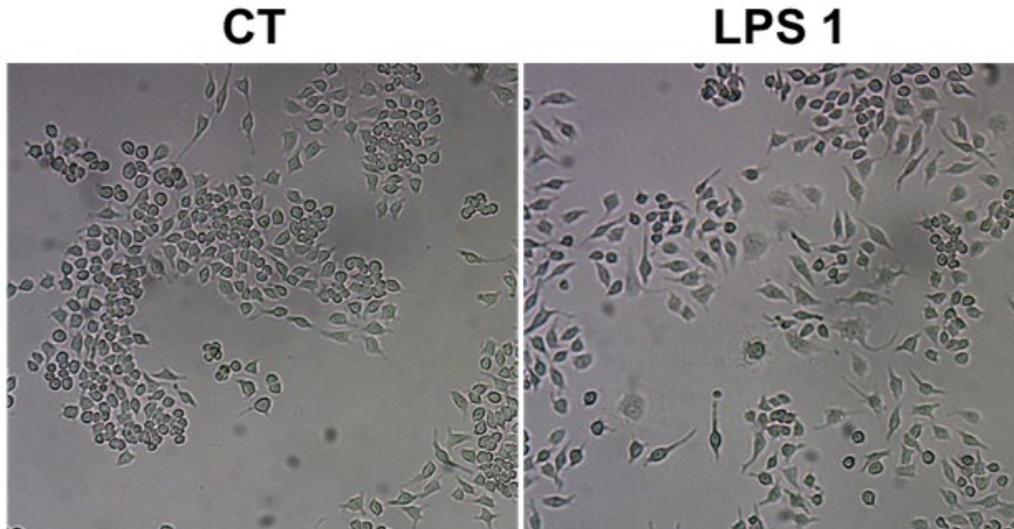


Figure 46 : Observation des macrophages au microscope optique inversé après traitement au lipopolysaccharide-EK (LPS-EK).

Les cellules RAW ont été incubées avec 1 $\mu\text{g/ml}$ de LPS-EK pendant 6 heures (LPS 1) puis observées au microscope optique inversé au grossissement $\times 10$.

2. Le LPS-EK induit une réponse inflammatoire dans les macrophages

Pour mettre en place notre modèle cellulaire d'inflammation, nous avons tout d'abord analysé l'effet du LPS-EK sur l'inflammation des macrophages RAW en analysant l'expression génique de différentes cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1 β , TNF- α et MIP-2) ainsi que celle du marqueur de l'inflammasome *NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3* (NLRP3). L'expression génique de l'ensemble de ces marqueurs est significativement augmentée après traitement avec le LPS-EK par rapport aux macrophages non traités (* $p < 0,05$ vs. CT ; **Figure 47**).

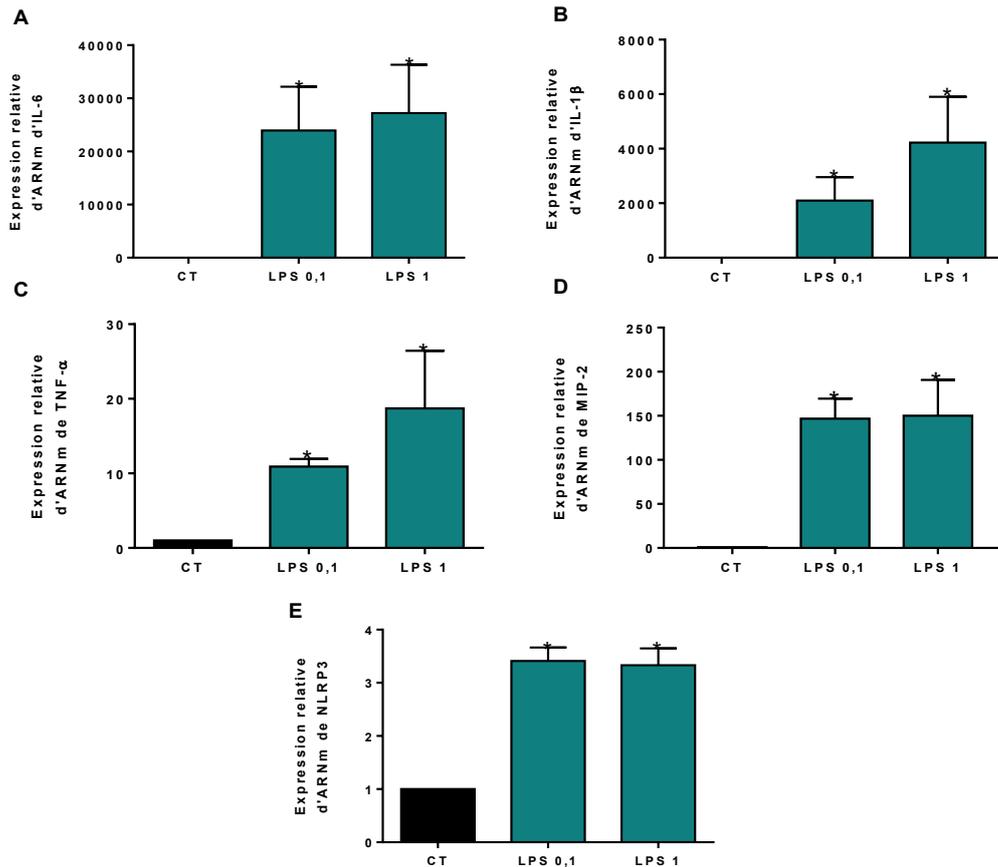


Figure 47 : Le lipopolysaccharide-EK (LPS-EK) induit une réponse inflammatoire dans les macrophages.

Les cellules ont été incubées avec du LPS-EK pendant 6 heures. L'expression génique de (A) IL-6, (B) IL-1β, (C) TNF-α, (D) MIP-2 et (E) NLRP3 a été quantifiée par RT-qPCR et normalisée par l'expression de l'ARNm de la β-actine. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicate (n=4). * p < 0,05 vs. CT ; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney. LPS 0,1, LPS-EK 0,1 μg/mL ; LPS 1, LPS-EK 1 μg/mL.

Dans un second temps, nous avons analysé l'expression de 10 cytokines pro-inflammatoires dans les macrophages traités ou non au LPS-EK en utilisant un kit de dosage multiplex (**Annexe 1**). Une augmentation significative des 10 cytokines pro-inflammatoires est observée dans les macrophages traités au LPS-EK en comparaison aux cellules non traitées (* p < 0,05 vs. CT6 ; **Figure 48**).

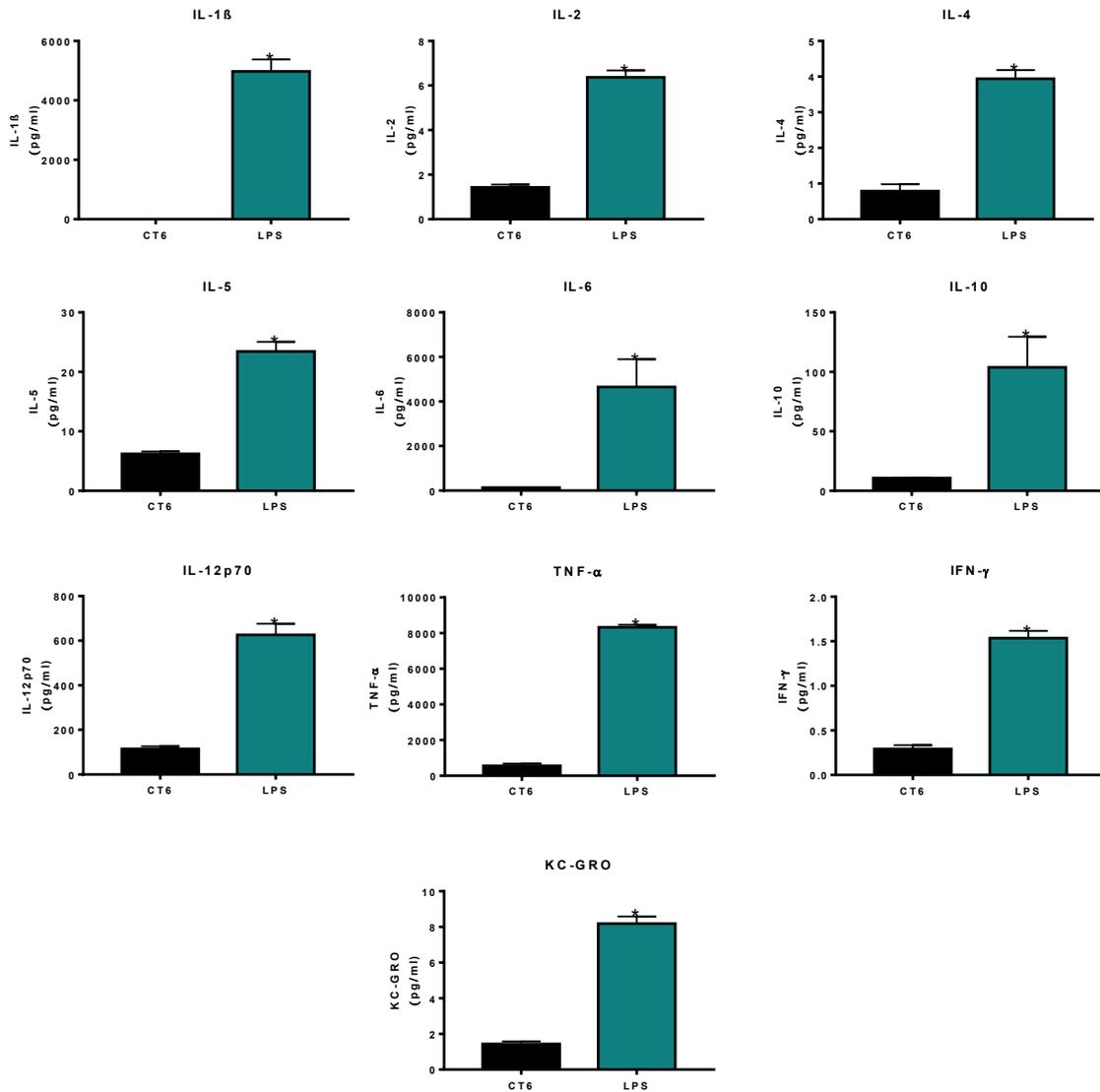


Figure 48 : Effets du lipopolysaccharide-EK (LPS-EK) sur l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans les macrophages.

Les cellules RAW ont été cultivées sans (CT6) ou avec 1 $\mu\text{g/ml}$ de LPS-EK (LPS) pendant 6 heures. L'expression protéique des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF- α , IFN- γ , KC-GRO) a été mesurée dans les macrophages en utilisant un kit de dosage multiplex. * $p < 0,05$ vs. CT ; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

L'ensemble de ces résultats montrent que dans notre modèle cellulaire, le LPS-EK induit bien une réponse inflammatoire.

3. Le LPS-EK induit un stress oxydant dans les macrophages

3.1. Le LPS-EK augmente la production de ROS

Le stress oxydant étant impliqué dans les processus de CV, nous avons ensuite déterminé l'effet du LPS-EK sur la production des ROS en utilisant la molécule DCFH-DA. Nous avons tout d'abord vérifié l'induction de la production de ROS par le H₂O₂, utilisé comme contrôle positif. Comme attendu, le H₂O₂ aux concentrations de 50 et 500 µM augmente significativement la production de ROS par les macrophages. Dans nos conditions expérimentales et comme le montre la figure ci-dessous, le LPS-EK augmente significativement la production de ROS par rapport aux cellules non traitées (* $p < 0,05$ vs. CT ; **Figure 49**).

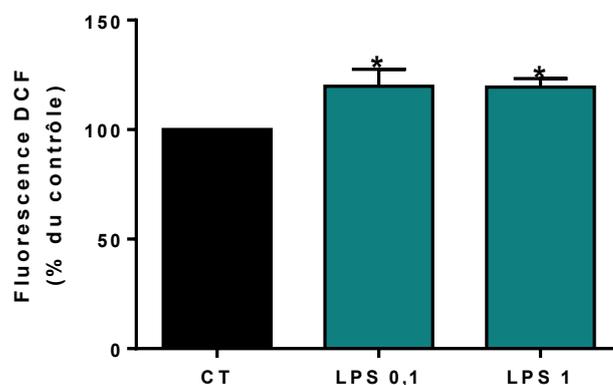


Figure 49 : Effets du lipopolysaccharide-EK (LPS-EK) sur la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les macrophages.

Les cellules ont été incubées avec 10 µM de DCFH-DA dans du PBS à 37°C pendant 30 minutes puis traitées avec du LPS-EK pendant 6 heures. La production des ROS est déterminée par une mesure de la fluorescence du DCF (λ_{Ex} 492 nm, λ_{Em} 535 nm). La production des ROS de cellules non traitées (CT) est rapportée à 100 %. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicate ($n=4$). * $p < 0,05$ vs. CT ; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney. LPS 0,1, LPS-EK 0,1 µg/mL ; LPS 1, LPS-EK 1 µg/mL.

Une diminution significative de l'expression de l'ARNm de deux composants d'un système antioxydant (Nrf2 et Keap1) a également été observée après traitement au LPS-EK, ce qui pourrait expliquer en partie l'augmentation du stress oxydant observée précédemment (* $p < 0,05$ vs. CT ; **Figure 50**).

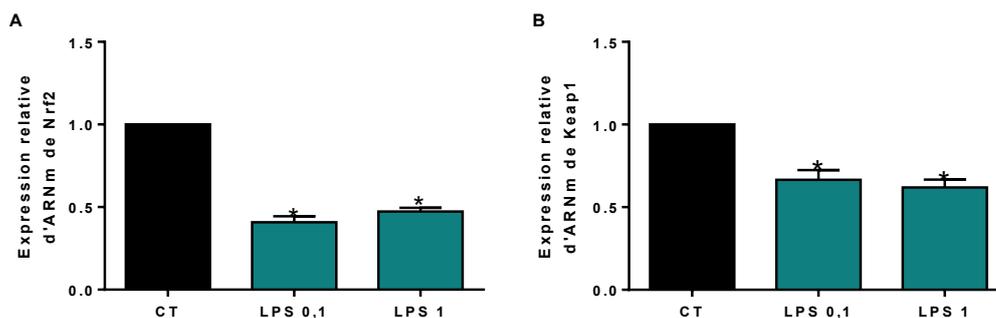


Figure 50 : Effets du lipopolysaccharide-EK (LPS-EK) sur l'expression génique de Nrf2 et Keap1 dans les macrophages.

Les cellules ont été incubées avec du LPS-EK pendant 6 heures. L'expression génique de (A) Nrf2 et (B) Keap1 a été quantifiée par RT-qPCR et normalisée par l'expression de l'ARNm de la β -actine. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicate ($n=4$). * $p < 0,05$ vs. CT ; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney. LPS 0,1, LPS-EK 0,1 $\mu\text{g/mL}$; LPS 1, LPS-EK 1 $\mu\text{g/mL}$.

3.2. Le LPS-EK diminue la production d' $\text{O}_2^{\cdot-}$

Parmi les différentes ROS, l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$ joue un rôle important dans les mécanismes de stress oxydant. Nous avons donc étudié l'effet du LPS-EK sur la production d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ en utilisant la molécule fluorescente DHE. De manière surprenante, le LPS-EK diminue significativement la production d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ par rapport aux cellules non traitées (* $p < 0,05$ vs. CT ; **Figure 51**).

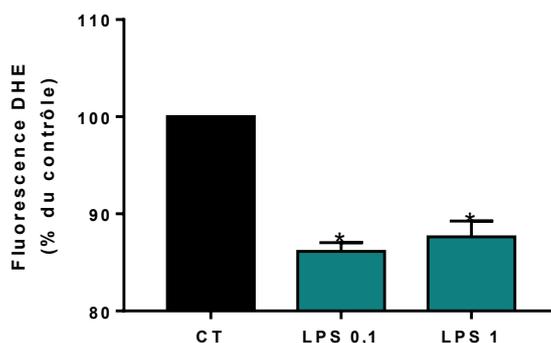


Figure 51 : Effets du lipopolysaccharide-EK (LPS-EK) sur la production d'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) par les macrophages.

Les cellules ont été incubées avec 10 μM de DHE dans du PBS à 37°C pendant 1 heure puis traitées avec du LPS-EK pendant 6 heures. La production d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ est déterminée par une mesure de la fluorescence (λEx 492 nm, λEm 615 nm). La production d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ de cellules non traitées (CT) est rapportée à 100 %. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicate ($n=4$). * $p < 0,05$ vs. CT ; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney. LPS 0,1, LPS-EK 0,1 $\mu\text{g/mL}$; LPS 1, LPS-EK 1 $\mu\text{g/mL}$.

Pour tenter d'expliquer ces résultats, nous avons ensuite analysé l'expression génique de la Nox-2, l'enzyme permettant la production d'O₂⁻, et de la SOD-2, responsable de la dégradation d'O₂⁻. Une diminution significative de l'expression de l'ARNm de Nox-2 et une augmentation significative de l'expression de l'ARNm de SOD-2 ont été observées après traitement au LPS-EK par rapport aux macrophages non traités (* p < 0,05 vs. CT ; **Figure 52**). Nos résultats suggèrent donc que le LPS-EK diminue la production d'O₂⁻ en diminuant l'expression de Nox-2 et en augmentant l'expression de SOD-2.

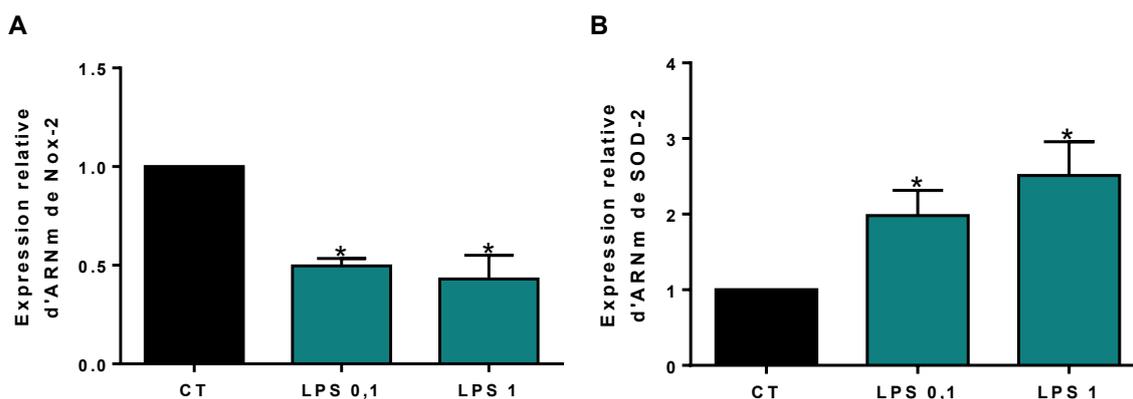


Figure 52 : Effets du lipopolysaccharide-EK (LPS-EK) sur l'expression génique de Nox-2 et SOD-2 dans les macrophages.

Les cellules ont été incubées avec du LPS-EK pendant 6 heures. L'expression génique de (A) Nox-2 et (B) SOD-2 a été quantifiée par RT-qPCR et normalisée par l'expression de l'ARNm de la β -actine. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicate (n=4). * p < 0,05 vs. CT ; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney. LPS 0,1, LPS-EK 0,1 μ g/mL ; LPS 1, LPS-EK 1 μ g/mL.

3.3. Le LPS-EK diminue la production de NO

Le monoxyde d'azote (NO) peut interagir rapidement avec l'anion superoxyde (O₂⁻) pour produire des dérivés oxydants tels que le peroxyde nitrite (ONOO⁻) principalement mais également l'anion nitroxyl (NO⁻) et le dioxyde d'azote (NO₂), 3 molécules responsables de stress oxydant. De plus, l'interaction du NO avec l'O₂⁻, réaction plus lente, peut conduire à la formation de trioxyde de diazote (N₂O₃) responsable de stress nitrosant.

Nous avons donc ensuite étudié l'effet du LPS-EK sur la production de NO en utilisant le fluorophore DAF. Comme le montre la figure ci-dessous, le LPS-EK diminue significativement la production de NO par rapport aux cellules non traitées (* p < 0,05 vs. CT ; **Figure 53A**) malgré une augmentation significative d'iNOS (* p < 0,05 vs. CT ; **Figure 53B**).

Ces résultats suggèrent que la diminution de la production de NO et d'O₂⁻ pourrait être partiellement expliquée par la formation d'ONOO⁻.

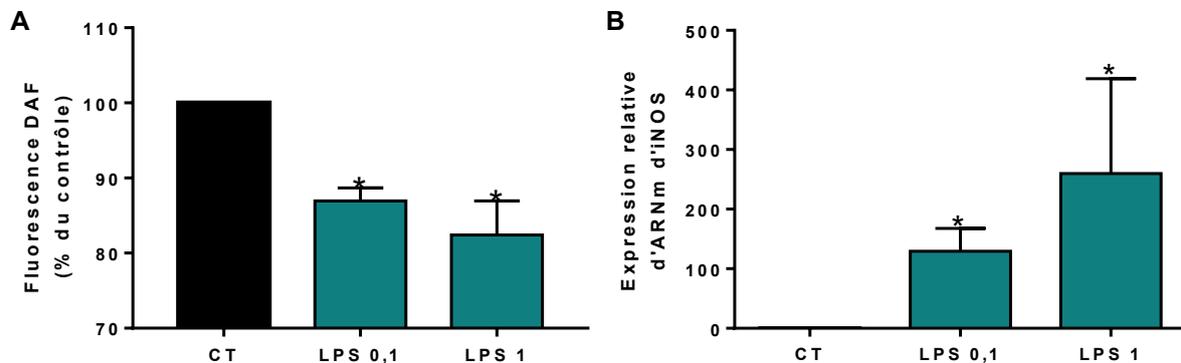


Figure 53 : Effets du lipopolysaccharide-EK (LPS-EK) sur la production de monoxyde d'azote (NO) et l'expression génique de l'inductible NO synthase (iNOS) dans les macrophages.

(A) Les cellules ont été incubées avec 0,1 μ M de DAF dans une solution de Krebs-Ringer à 37°C pendant 1 heure puis traitées avec du LPS-EK pendant 6 heures. La production de NO est déterminée par une mesure de la fluorescence (λ Ex 492 nm, λ Em 535 nm). La production de NO de cellules non traitées (CT) est rapportée à 100 %. (B) Les cellules ont été incubées avec du LPS-EK pendant 6 heures. L'expression génique d'iNOS a été quantifiée par RT-qPCR et normalisée par l'expression de l'ARNm de la β -actine. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicate (n=4). * $p < 0,05$ vs. CT ; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney. LPS 0,1, LPS-EK 0,1 μ g/mL ; LPS 1, LPS-EK 1 μ g/mL.

4. Le LPS-EK diminue l'autophagie dans les macrophages

Des études récentes ont mis en évidence un lien entre l'autophagie et la biogenèse des EVs mais également avec leur sécrétion [230]. En effet, il a été démontré qu'il existe des mécanismes moléculaires communs entre ces deux processus cellulaires. Nous avons donc analysé l'effet du LPS-EK sur l'expression de différents marqueurs d'autophagie tels que ULK1, Atg5, LC3a, LC3b et Beclin-1. L'expression des ARNm de l'ensemble de ces marqueurs est significativement diminuée après traitement au LPS-EK en comparaison aux macrophages non traités (* $p < 0,05$ vs. CT ; **Figure 54**), suggérant une diminution du processus d'autophagie.

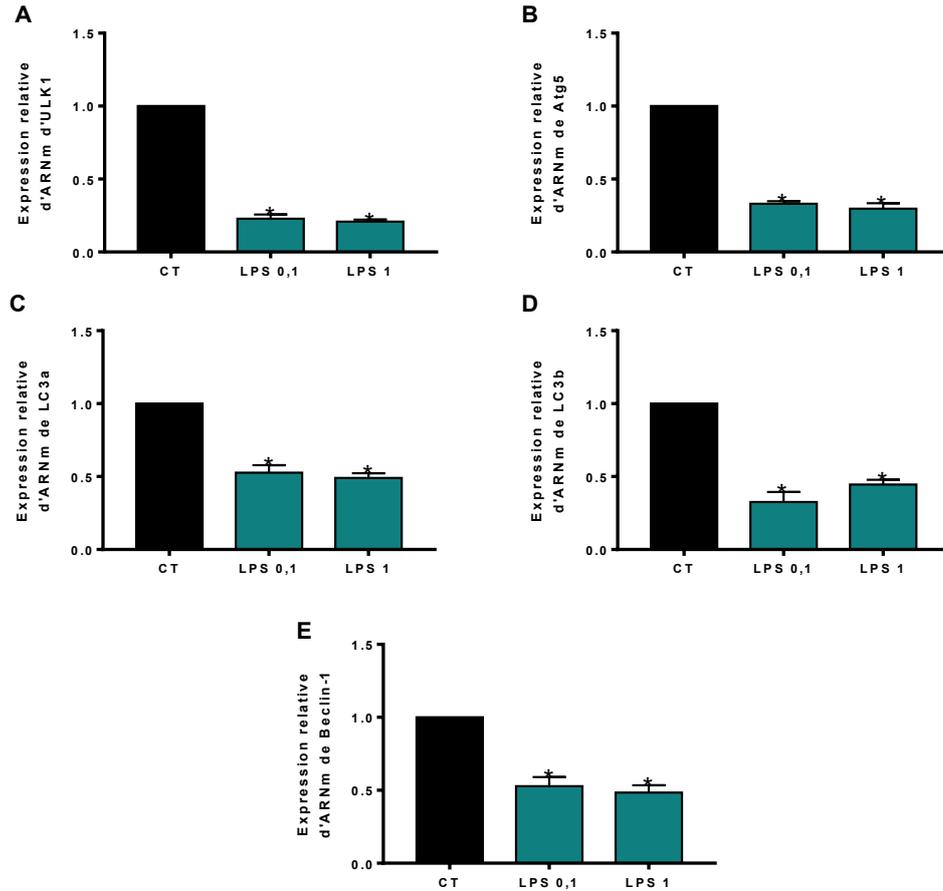


Figure 54 : Effets du lipopolysaccharide-EK (LPS-EK) sur l'expression des marqueurs d'autophagie des macrophages.

Les cellules ont été incubées avec du LPS-EK pendant 6 heures. L'expression génique de (A) ULK1, (B) Atg5, (C) LC3a, (D) LC3b et (E) Beclin-1 a été quantifiée par RT-qPCR et normalisée par l'expression de l'ARNm de la β -actine. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicate (n=4). * $p < 0,05$ vs. CT ; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney. LPS 0,1, LPS-EK 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; LPS 1, LPS-EK 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

p62, également connu sous le nom de séquestome-1 (SQSTM) est un récepteur autophagique pouvant être utilisé comme capteur du flux autophagique [231]. En effet, p62 s'accumule lors d'une inhibition des mécanismes d'autophagie, et à l'inverse une diminution de l'expression de p62 est observée lors de l'induction de l'autophagie. Après traitement au LPS-EK, l'expression des ARNm de p62 est significativement augmentée en comparaison aux macrophages non traités (* $p < 0,05$ vs. CT ; **Figure 55A**) suggérant une inhibition du processus d'autophagie.

L'expression protéique de p62 déterminée par *Western Blot* tend à augmenter après traitement au LPS-EK (1 µg/ml) par rapport aux cellules non traitées sans pour autant atteindre la significativité ($p=0,3429$ vs. CT ; **Figure 55B**).

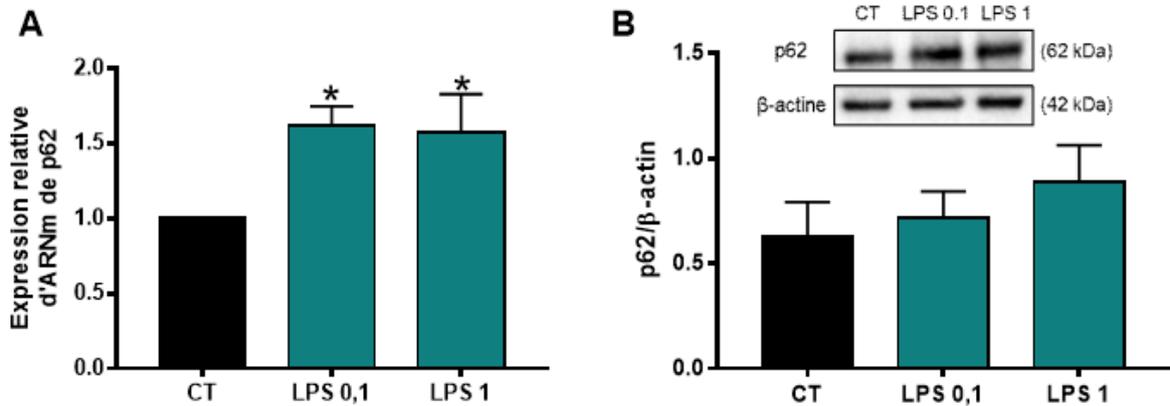


Figure 55 : Effets du lipopolysaccharide-EK (LPS-EK) sur l'expression génique et protéique de p62 dans les macrophages.

Les cellules ont été incubées avec du LPS-EK pendant 6 heures. (A) L'expression génique de p62 a été quantifiée par RT-qPCR et normalisée par l'expression de l'ARNm de la β-actine. (B) L'expression protéique de p62 a été quantifiée par Western Blot et normalisée par l'expression de la protéine β-actine. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicate (n=4). * $p < 0,05$ vs. CT ; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney. LPS 0,1, LPS-EK 0,1 µg/mL ; LPS 1, LPS-EK 1 µg/mL.

L'ensemble de nos résultats ont permis de montrer que le LPS-EK induit non seulement une réponse inflammatoire et un stress oxydant dans les macrophages, mais également qu'il diminue les processus d'autophagie.

II. Étude de la biogenèse des EVs sécrétées en conditions pro-inflammatoires et pro-oxydantes

L'objectif de notre projet étant de déterminer si les EVs sécrétées par les macrophages sont capables de propager l'inflammation et le stress oxydant aux CMLV, nous avons tout d'abord étudié la biogenèse des EVs après traitement au LPS-EK. Nous avons ainsi analysé l'expression des ARNm de différents marqueurs de la biogenèse des EVs (SMPD3, phospho-1 et TNAP) dans les macrophages traités au LPS-EK. L'expression des ARNm de l'ensemble de ces marqueurs est significativement diminuée après traitement au LPS-EK en comparaison aux macrophages non traités (* $p < 0,05$ vs. CT ; Figure 56).

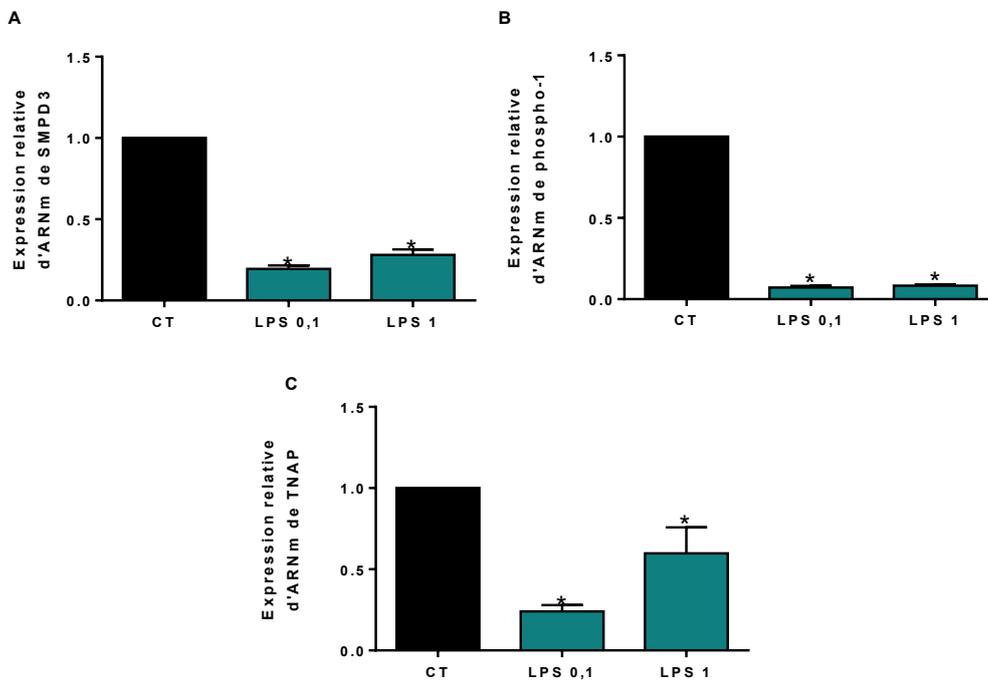


Figure 56 : Effets du lipopolysaccharide-EK (LPS-EK) sur l'expression des gènes de la biogenèse des EVs dans les macrophages.

Les cellules ont été incubées avec du LPS-EK pendant 6 heures. L'expression génique de (A) SMPD3, (B) phospho-1 et (C) TNAP a été quantifiée par RT-qPCR et normalisée par l'expression de l'ARNm de la β -actine. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicate ($n=4$). * $p < 0,05$ vs. CT ; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney. LPS 0,1, LPS-EK 0,1 $\mu\text{g/mL}$; LPS 1, LPS-EK 1 $\mu\text{g/mL}$.

Une diminution significative de l'expression protéique de SMPD3 a également été observée après traitement des cellules avec 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS-EK en comparaison aux macrophages non traités (* $p < 0,05$ vs. CT ; Figure 57), confirmant ainsi nos résultats de RT-qPCR.

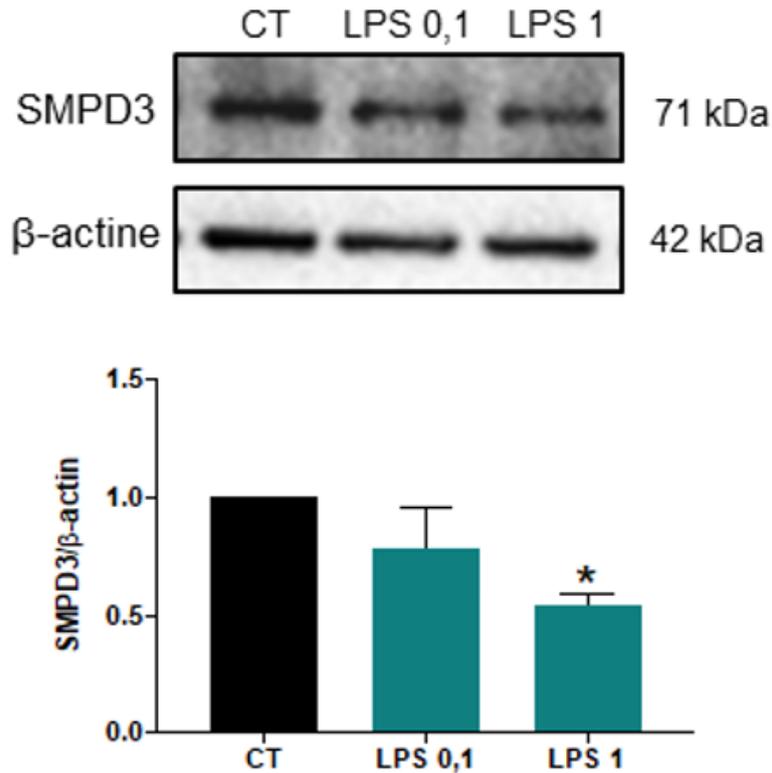


Figure 57 : Effets du lipopolysaccharide-EK (LPS-EK) sur l'expression protéique de SMPD3 dans les macrophages.

Les cellules ont été incubées avec du LPS-EK pendant 6 heures. L'expression protéique de SMPD3 a été quantifiée par Western Blot et normalisée par l'expression de la protéine β-actine. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicate (n=4). * $p < 0,05$ vs. CT ; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney. LPS 0,1, LPS-EK 0,1 µg/mL ; LPS 1, LPS-EK 1 µg/mL.

Ces résultats montrent donc une diminution de la biogenèse des EVs de macrophages en conditions pro-inflammatoires et pro-oxydantes.

III. Caractérisation des EVs de macrophages

Les EVs dérivées des macrophages ont été caractérisées par leur morphologie, leur taille et leur contenu à l'aide de différentes techniques couramment utilisées pour la caractérisation des EVs. Pour des raisons pratiques, nous avons utilisé une seule concentration de LPS-EK (1 µg/ml) pour la suite de nos expérimentations. Les images obtenues par TEM (**Figure 58**) et cryo-EM (**Figure 59**) montrent que nos échantillons d'EVs sont principalement enrichis en exosomes et en microvésicules. De plus, l'intégrité de la membrane des EVs a été vérifiée par cryo-EM (**Figure 59**).

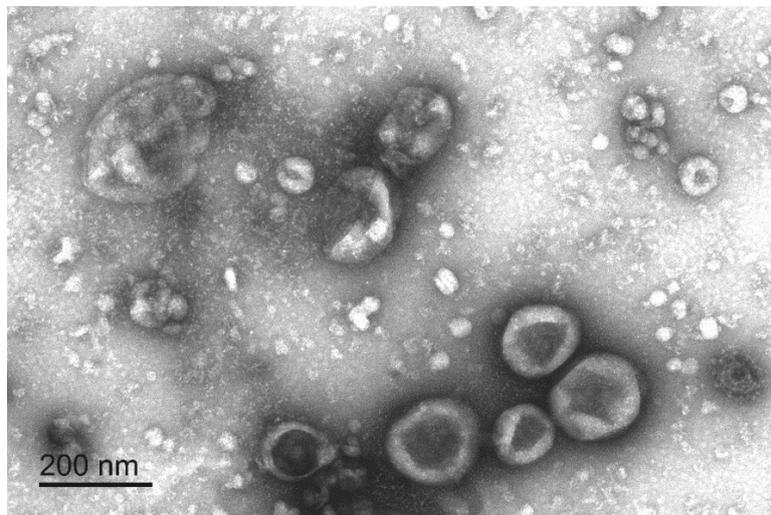


Figure 58 : Analyse des vésicules extracellulaires (EVs) sécrétées par les macrophages en microscopie électronique en transmission (TEM).

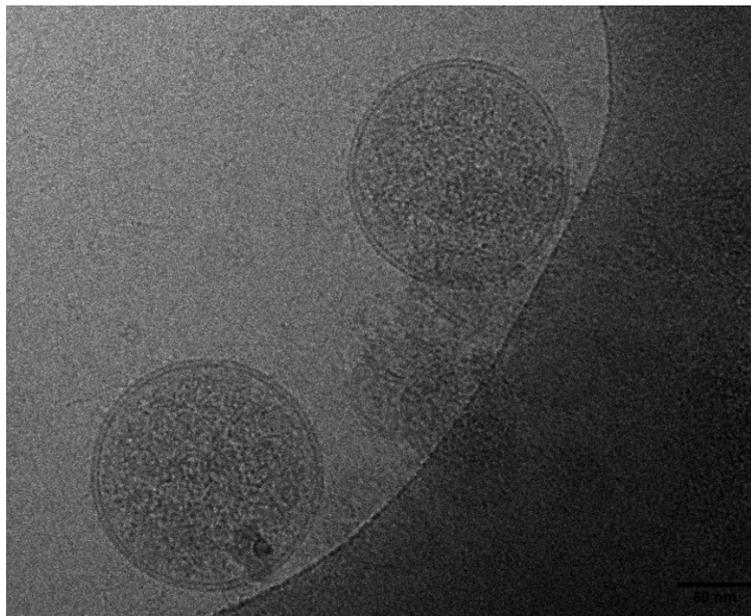


Figure 59 : Analyse des vésicules extracellulaires (EVs) sécrétées par les macrophages en cryo-microscopie électronique (cryo-EM).

Nous avons également analysé par NTA la concentration et la taille des EVs sécrétées par les macrophages. La taille moyenne des particules détectées par NTA est de 139 nm pour les EVs dérivées de macrophages non traités (EV CT6) et de 130 nm pour les EVs dérivées de macrophages traités avec du LPS-EK (EV LPS) (**Figure 60**). Comme la taille des exosomes se situe entre 30 et 150 nm et celle des microvésicules entre 100 et 1000 nm [4], nous pouvons conclure que nos préparations d'EVs sont enrichies en ces deux populations d'EVs.

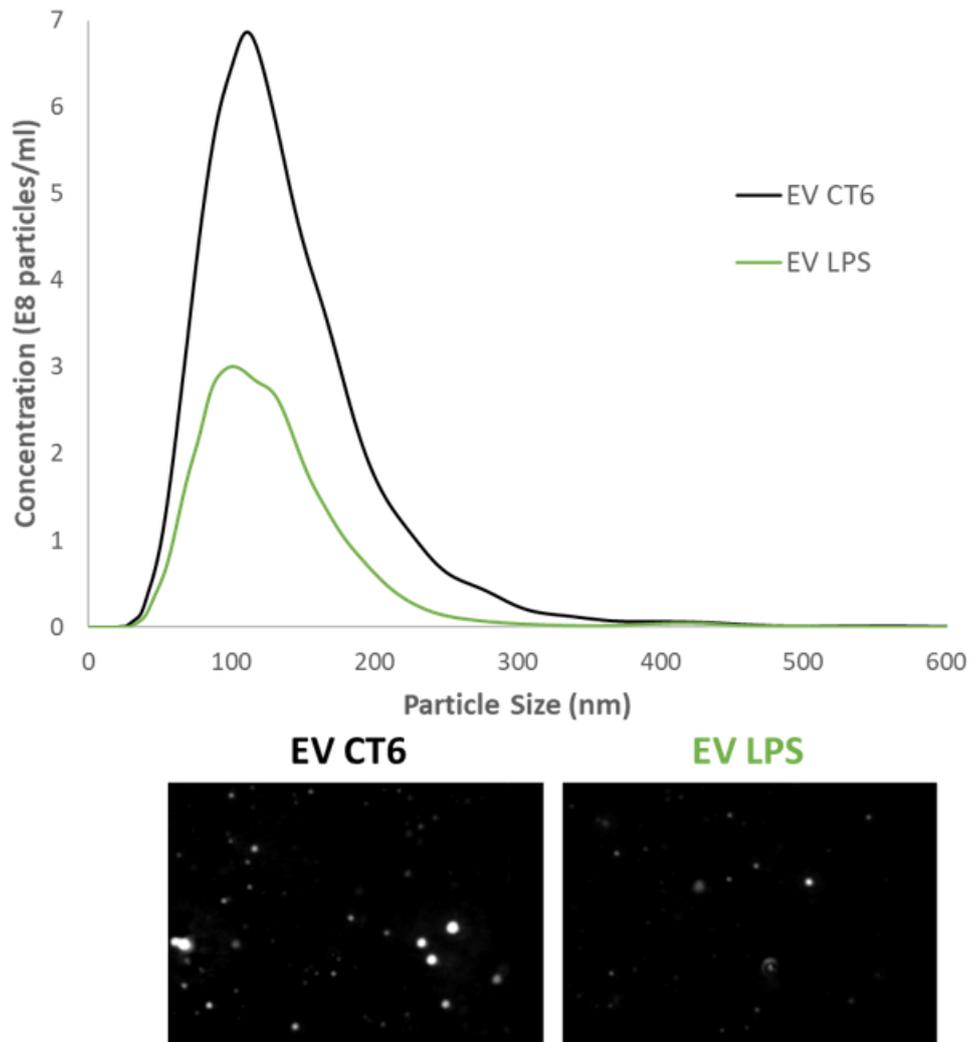


Figure 60 : Analyse de la distribution des vésicules extracellulaires (EVs) sécrétées par les macrophages selon la taille à l'aide de la technique par analyse du suivi individuel de particules (NTA).

Les EVs ont été récoltées à partir de milieu de culture des macrophages non traités (EV CT6) ou traités avec du lipopolysaccharide-EK à une concentration de 1 µg/mL (EV LPS).

Le traitement des macrophages avec le LPS-EK diminue de plus de la moitié la concentration d'EVs sécrétées par rapport aux cellules non traitées ($3,20 \times 10^{10}$ EVs/mL vs $7,54 \times 10^{10}$ EVs/mL) (**Figure 61**).

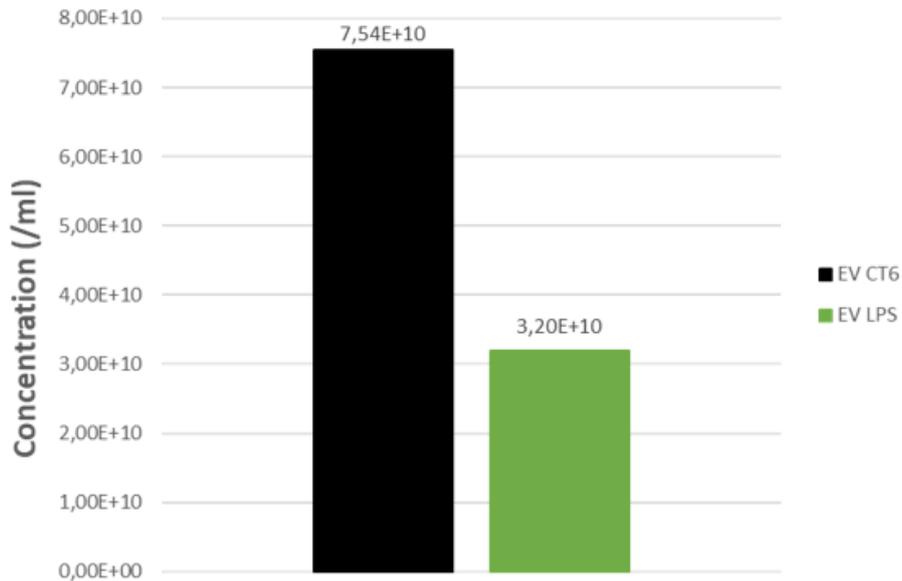


Figure 61 : Analyse de la concentration des vésicules extracellulaires (EVs) sécrétées par les macrophages à l'aide de la technique par analyse du suivi individuel de particules (NTA).

Les EVs ont été récoltées à partir de milieu de culture des macrophages non traités (EV CT6) ou traités avec du lipopolysaccharide-EK à une concentration de $1 \mu\text{g/mL}$ (EV LPS).

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'activité AChE dans nos échantillons d'EVs. En effet, selon l'ISEV, l'activité de cette enzyme dans les échantillons confirme la présence d'EVs. De plus, l'AChE étant exprimée dans les macrophages [232], cette enzyme peut être retrouvée dans les EVs issues des macrophages. Une augmentation significative de l'activité AChE a été mise en évidence dans nos deux préparations d'EVs (***) $p < 0,001$ vs. CT ; **Figure 62**). En comparant les préparations d'EV LPS par rapport aux EV CT6, nous avons montré une diminution significative de l'activité AChE dans les EV LPS (\$) $p < 0,05$ vs. EV CT6 ; **Figure 62**). Cette diminution peut s'expliquer par la diminution de concentration d'EVs observée précédemment.

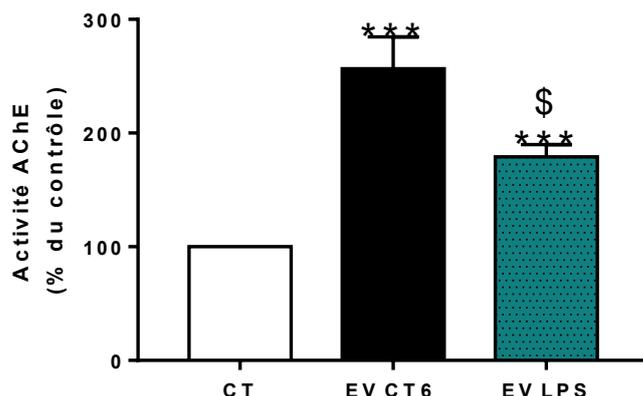


Figure 62 : Étude de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase (AChE) de vésicules extracellulaires (EVs) de macrophages.

Les EVs ont été récoltées à partir de milieu de culture des macrophages non traités (EV CT6) ou traités avec du lipopolysaccharide-EK à une concentration de 1 µg/mL (EV LPS). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM de 7 expériences indépendantes réalisées en triplicate (n=7). *** $p < 0,001$ vs. CT ; \$ $p < 0,05$ vs. EV CT6 ; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Nous avons ensuite analysé l'expression de marqueurs spécifiques d'EVs à savoir deux tétraspanines (CD9 et CD81) ainsi que l'expression de la β-actine dans nos préparations d'EVs. L'ensemble de ces protéines ont été détectées dans nos échantillons d'EVs (**Figure 63**) confirmant la présence d'EVs dans nos préparations.

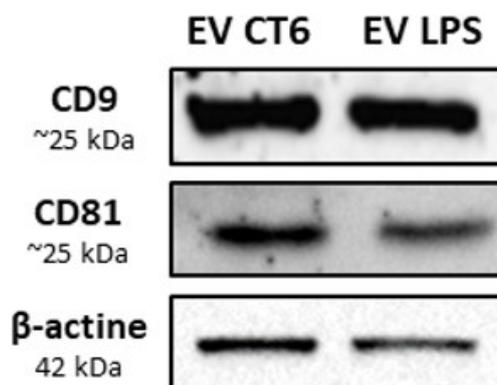


Figure 63 : Analyse par *Western Blot* de l'expression protéique de CD9, CD81 et β-actine de vésicules extracellulaires (EVs) sécrétées par les macrophages.

Les EVs ont été récoltées à partir de milieu de culture des macrophages non traités (EV CT6) ou traités avec du lipopolysaccharide-EK à une concentration de 1 µg/mL (EV LPS).

L'ensemble de ces résultats ont permis de montrer que nos préparations d'EVs sont principalement enrichies en exosomes et microvésicules. De plus, une diminution du nombre d'EVs est observée dans les préparations d'EV LPS.

IV. Rôles et mécanismes d'action des EVs sécrétées par les macrophages

1. Effets des EVs dérivées de macrophages sur la viabilité cellulaire des CMLV

Afin d'étudier les effets des EVs dérivées des macrophages sur la lignée murine de CMLV (MOVAS-1), nous avons tout d'abord évalué la viabilité des CMLV après un traitement de 24 heures avec les EVs de macrophages. Comme le montre la figure ci-dessous, les EVs sécrétées par les macrophages n'ont pas d'effet sur la viabilité des CMLV en comparaison aux cellules non traitées (**Figure 64**).

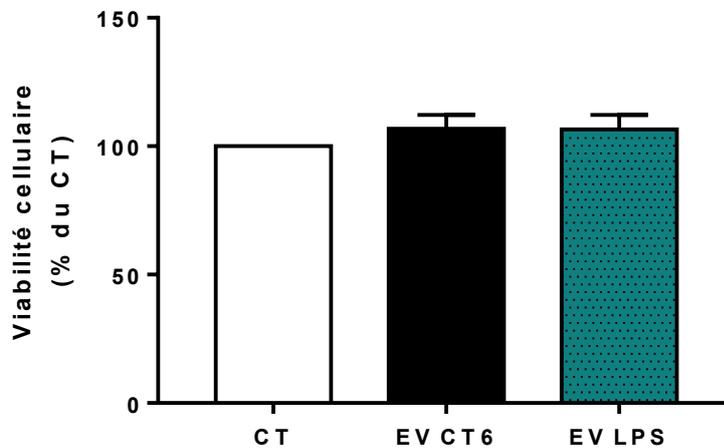


Figure 64 : Effets des vésicules extracellulaires (EVs) de macrophages sur la viabilité cellulaire des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).

Les CMLV ont été incubées avec les EVs de macrophages non traités (EV CT6) ou traités avec 1 µg/ml de LPS-EK (EV LPS) pendant 24 heures. La viabilité cellulaire est ensuite mesurée par le test de WST-1. La viabilité de cellules non traitées (CT) est rapportée à 100 %. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicate (n=4).

2. Les EV LPS induisent une réponse inflammatoire dans les CMLV

Les EV CT6 n'ont aucun effet sur l'expression des cytokines pro-inflammatoires dans les CMLV. En revanche, une augmentation significative de l'expression des ARNm des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1β et TNF-α) est observée après traitement des CMLV avec les EV LPS en comparaison aux cellules non traitées (* p < 0,05 vs. CT ; **Figure 65**).

De plus, une augmentation significative de l'expression des ARNm de la cytokine IL-6 est observée après traitement des CMLV avec les EV LPS en comparaison aux CMLV traitées avec les EV CT6 ($p < 0,05$ vs. EV CT6 ; **Figure 65A**). Ces résultats montrent que les EV LPS sont capables d'induire une réponse inflammatoire dans les CMLV *via* une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires.

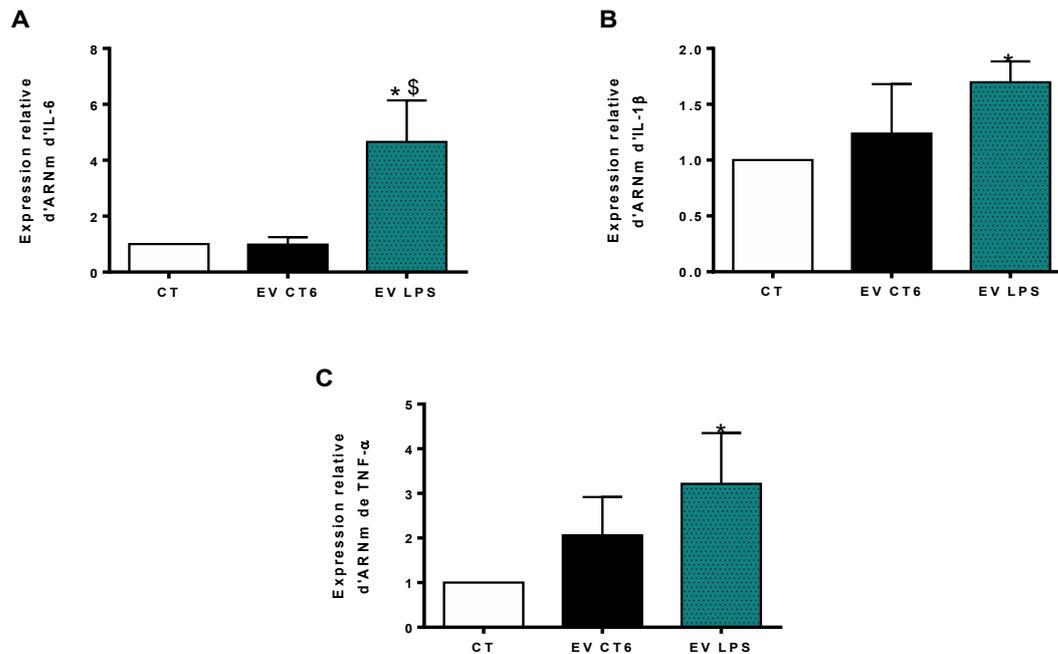


Figure 65 : Effets des vésicules extracellulaires (EVs) de macrophages sur l'expression génique de marqueurs d'inflammation des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).

Les CMLV ont été incubées avec les EVs de macrophages non traités (EV CT6) ou traités avec 1 μ g/ml de LPS-EK (EV LPS) pendant 24 heures. L'expression génique de (A) IL-6, (B) IL-1 β et (C) TNF- α a été quantifiée par RT-qPCR et normalisée par l'expression de l'ARNm de la β -actine. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicate ($n=4$). * $p < 0,05$ vs. CT ; \$ $p < 0,05$ vs. EV CT6 ; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

3. Les EV LPS induisent un stress oxydant dans les CMLV

Afin d'étudier les effets des EVs dérivées de macrophages sur le stress oxydant dans les CMLV, nous avons mesuré la production intracellulaire de ROS. Les deux préparations d'EV CT6 et EV LPS augmentent significativement la production de ROS par rapport aux CMLV non traitées (* $p < 0,05$ vs. CT ; **Figure 66**).

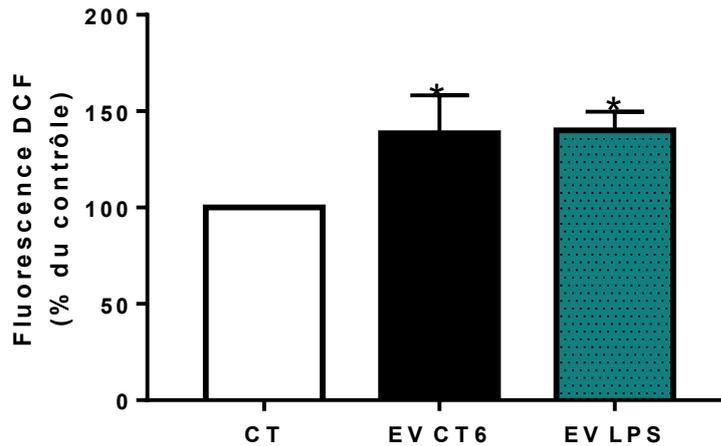


Figure 66 : Effets des vésicules extracellulaires (EVs) dérivées de macrophages sur la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).

Les CMLV ont été incubées avec 10 μ M de DCFH-DA dans du PBS à 37°C pendant 30 minutes, puis traitées avec les EVs dérivées de macrophages non traités (EV CT6) ou traités avec 1 μ g/ml de LPS-EK (EV LPS) pendant 24 heures. La production des ROS est déterminée par une mesure de la fluorescence du DCF (λ Ex 492 nm, λ Em 535 nm). La production des ROS de cellules non traitées (CT) est rapportée à 100 %. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicate ($n=4$). * $p < 0,05$ vs. CT ; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Nous avons ensuite analysé l'expression génique d'enzymes antioxydantes (la SOD-1 cytosolique et la SOD-2 mitochondriale) ainsi que celle de facteurs impliqués dans la réponse antioxydante (Nrf2, Keap1). L'expression de l'ensemble des marqueurs est significativement augmentée dans les CMLV incubées avec des EV LPS par rapport aux CMLV non traitées (* $p < 0,05$ vs. CT ; **Figure 67**). En comparant les effets des EV LPS avec ceux des EV CT6, seule une augmentation significative de l'expression des ARNm de la SOD-2 mitochondriale est observée (\$ $p < 0,05$ vs. EV CT6 ; **Figure 67B**).

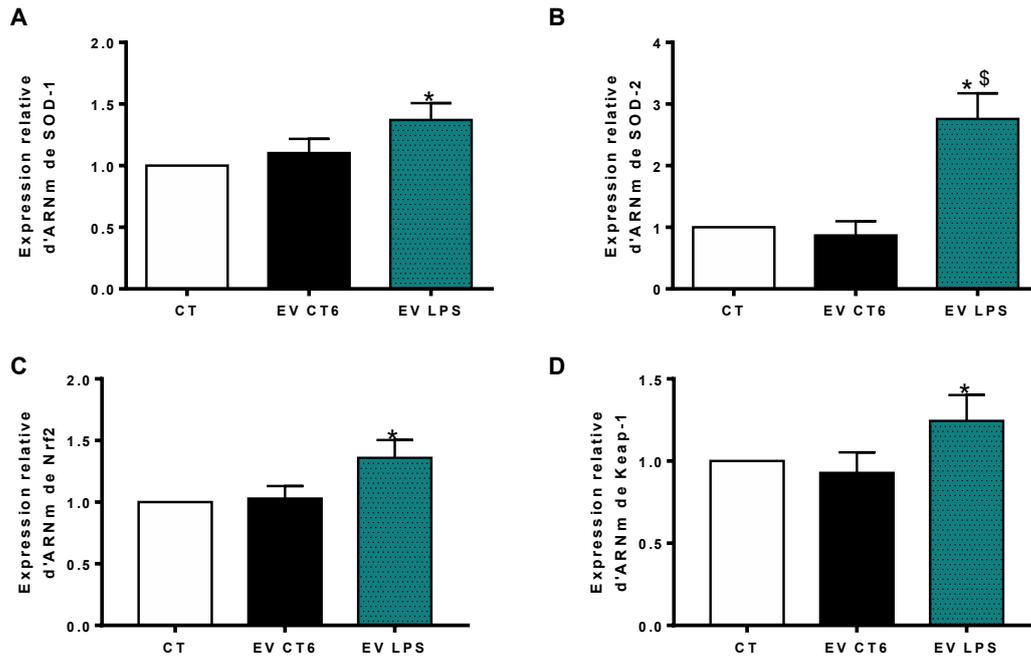


Figure 67 : Effets des vésicules extracellulaires (EVs) de macrophages sur l'expression génique des marqueurs du stress oxydant des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).

Les CMLV ont été incubées avec les EVs de macrophages non traités (EV CT6) ou traités avec 1 $\mu\text{g/ml}$ de LPS-EK (EV LPS) pendant 24 heures. L'expression génique de (A) SOD-1, (B) SOD-2, (C) Nrf2 et (D) Keap1 a été quantifiée par RT-qPCR et normalisée par l'expression de l'ARNm de la β -actine. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicate ($n=4$). * $p < 0,05$ vs. CT ; \$ $p < 0,05$ vs. EV CT6 ; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

4. Les EV LPS augmentent la calcification induite par le Pi via un switch ostéogénique des CMLV

Le stress oxydant et l'inflammation sont deux mécanismes connus pour jouer un rôle important dans le processus de CV. Puisque nos résultats précédents montrent que les EV LPS peuvent induire à la fois une réponse inflammatoire et un stress oxydant dans les CMLV, nous avons ensuite déterminé les effets de ces EVs sur la calcification induite par le Pi dans les CMLV.

Les CMLV ont été traitées avec 4 mM de Pi et avec les EVs dérivées de macrophages pendant 14 jours ou pendant les 7 derniers jours de l'induction de la calcification.

Après 14 jours de traitement, les EV LPS induisent une augmentation significative de la concentration de calcium intracellulaire en comparaison aux CMLV traitées avec le Pi et les EV CT6 ($p < 0,05$ vs. EVs CT6 ; **Figure 68A**). De plus, une augmentation significative de la concentration calcique intracellulaire est également observée après 7 jours de traitement des CMLV traitées avec du Pi et les EV LPS en comparaison aux CMLV traitées au Pi ($* p < 0,05$ vs. Pi (4mM) ; **Figure 68B**). Ces résultats suggèrent que les EV LPS sont capables d'aggraver la calcification des CMLV que ce soit au début du processus de calcification ou même à des stades plus tardifs.

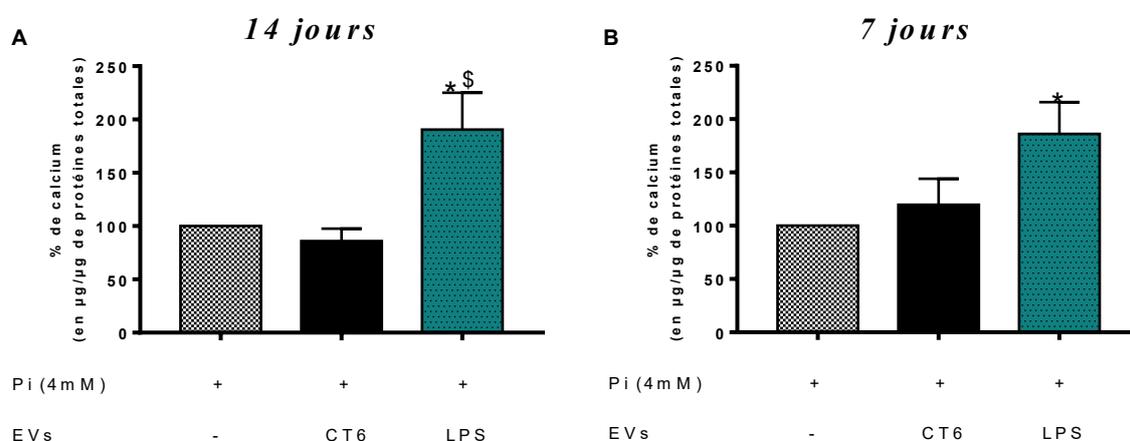


Figure 68 : Effets des vésicules extracellulaires (EVs) de macrophages sur la calcification de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).

La calcification des CMLV est induite par ajout de 4 mM de phosphate inorganique (Pi) dans le milieu pendant 14 jours. Les cellules sont également mises en présence d'EVs de macrophages non traités (EVs CT6) ou traités avec 1 µg/mL de LPS-EK (EVs LPS) (A) pendant 14 jours ou (B) pendant les 7 derniers jours de l'induction de calcification. La calcification des CMLV est ensuite analysée en réalisant un dosage calcium à l'o-crésolphthaléine. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicate ($n=4$). $* p < 0,05$ vs. Pi (4mM) ; $\$ p < 0,05$ vs. EVs CT6 ; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Afin de déterminer si ces effets peuvent être imputés à la présence de LPS dans nos préparations d'EVs, nous avons étudié les effets du LPS-EK seul sur la calcification des CMLV. Nos résultats montrent que le LPS-EK (1 µg/ml) seul (**Figure 69A**) ou en présence de 4 mM de Pi (**Figure 69B**) n'induit pas la calcification des CMLV. Nous pouvons donc confirmer que les effets observés des EV LPS sont des effets intrinsèques aux EVs et non dus à la présence de LPS.

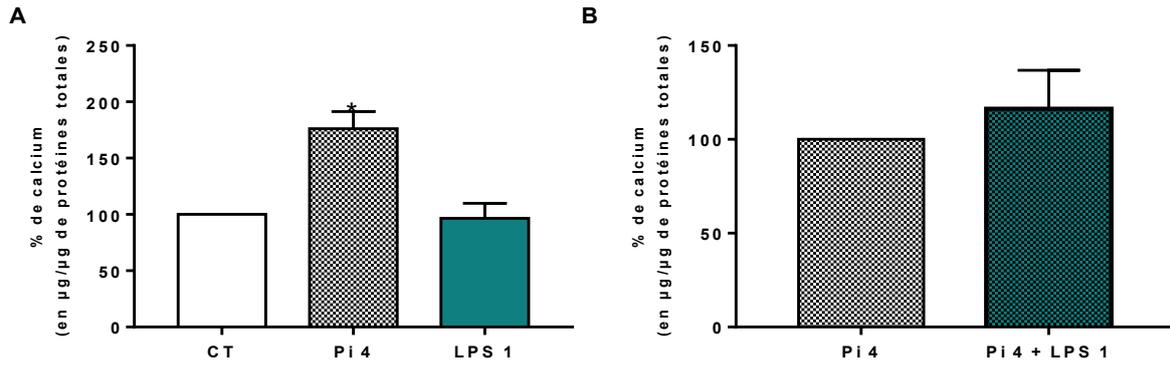


Figure 69 : Effets du lipopolysaccharide-EK (LPS-EK) sur la calcification des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).

(A) Les CMLV sont traitées pendant 14 jours avec 4 mM de phosphate inorganique (Pi 4) ou 1 µg/mL de LPS-EK (LPS 1). (B) Les CMLV sont traitées pendant 14 jours avec 4 mM de phosphate inorganique et 1 µg/mL de LPS-EK (Pi 4 + LPS 1). La calcification des CMLV est ensuite analysée en réalisant un dosage calcium à l'o-crésolphtaléine. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicate (n=4). * $p < 0,05$ vs. CT ; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Nous avons ensuite déterminé l'expression génique de MGP, un inhibiteur de la CV dans les CMLV. L'expression des ARNm de MGP est significativement diminuée après 7 jours de traitement des CMLV avec 4 mM de Pi et les EV LPS (* $p < 0,05$ vs. Pi (4mM) ; **Figure 70**). L'augmentation observée de la calcification pourrait donc être en partie expliquée par la diminution de l'inhibiteur de calcification MGP.

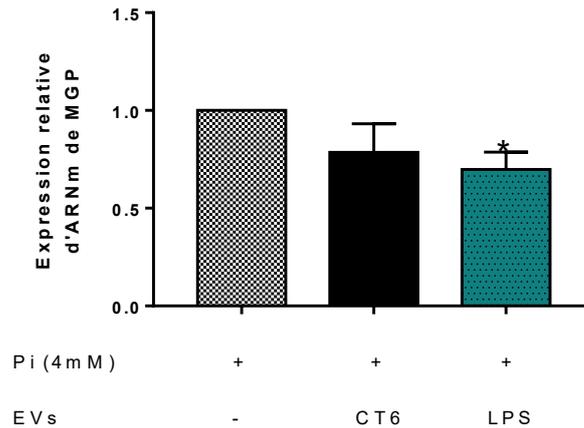


Figure 70 : Effets des vésicules extracellulaires (EVs) de macrophages sur l'expression génique de la protéine Gla de la matrice (MGP) dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).

Les CMLV ont été incubées avec 4 mM de phosphate inorganique (Pi) avec ou sans les EVs de macrophages pendant 7 jours. L'expression génique de MGP a été quantifiée par RT-qPCR et normalisée par l'expression de l'ARNm de la β -actine. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM de 7 expériences indépendantes réalisées en triplicate ($n=7$). * $p < 0,05$ vs. Pi (4mM) ; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Les CMLV peuvent adopter différents phénotypes contractiles, synthétiques ou ostéogéniques. Au cours de la CV, les CMLV subissent un switch ostéogénique. Afin de vérifier si ce changement phénotypique se produit, nous avons analysé l'expression de différents marqueurs ostéogéniques (BMP-2, Runx2, Osx, OCN) mais également contractile tel que l' α -SMA. Tout d'abord, nous avons vérifié l'induction d'un switch ostéogénique des CMLV après traitement avec le Pi seul. Comme attendu, une augmentation significative de l'expression génique des différents marqueurs ostéogéniques (BMP-2, Runx2, Osx, OCN) est observée après traitement des CMLV avec 4 mM de Pi en comparaison aux CMLV non traitées (* $p < 0,05$ vs. CT ; ** $p < 0,01$ vs. CT ; **Figure 71A, B, C, D**). A l'inverse, une diminution significative du marqueur contractile α -SMA a été observée après traitement des CMLV avec 4 mM de Pi en comparaison aux CMLV non traitées (***) $p < 0,001$ vs. CT ; **Figure 71E**). Ces résultats confirment que le Pi induit un switch ostéogénique des CMLV qui serait responsable de l'induction de la CV.

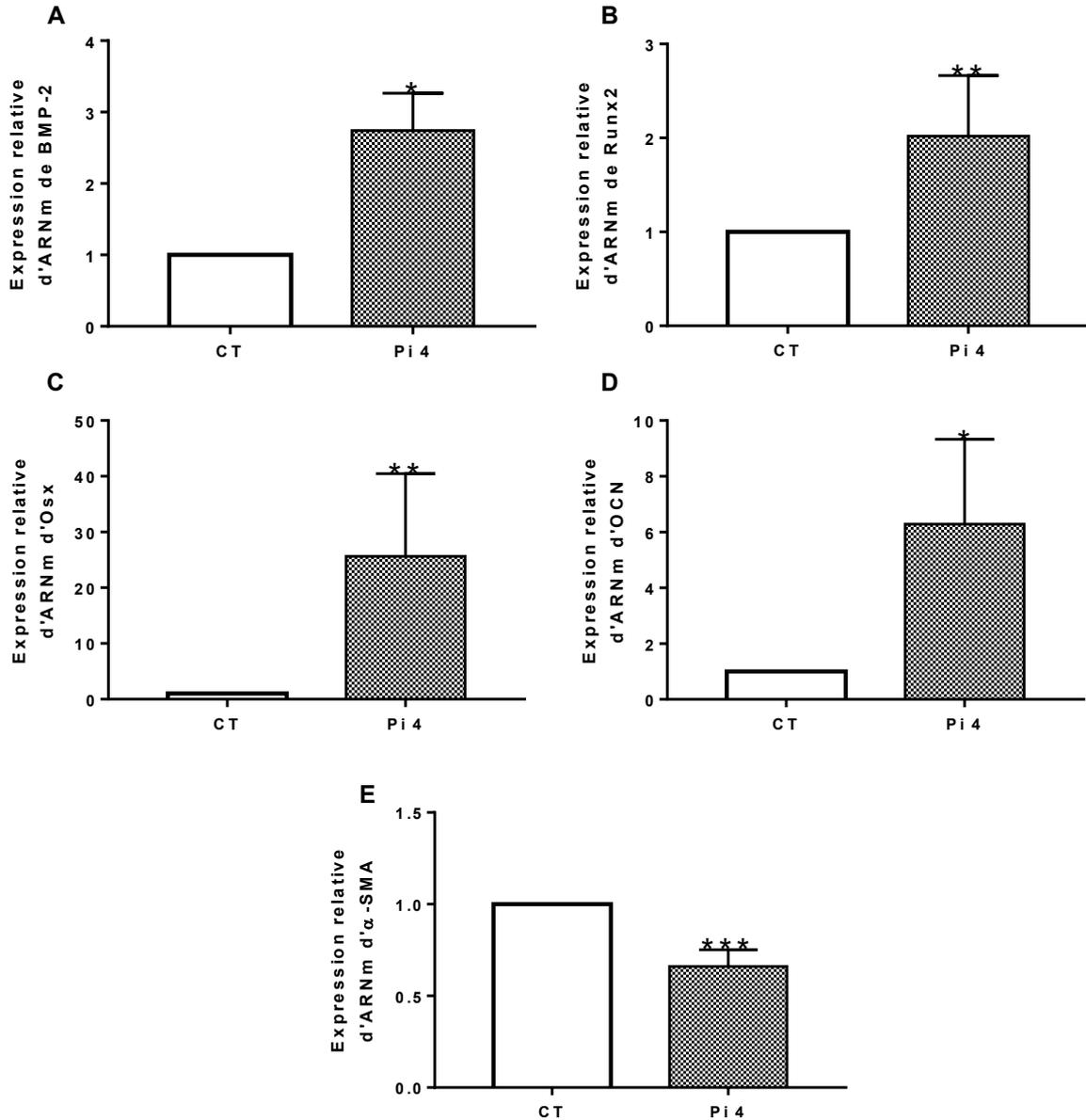


Figure 71 : Effets du phosphate inorganique (Pi) sur l'expression génique de marqueurs ostéogéniques et contractile des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).

Les CMLV ont été incubées avec 4 mM de phosphate inorganique (Pi 4) pendant 7 jours. L'expression génique de (A) BMP-2, (B) Runx2, (C) Osx, (D) OCN et (E) α-SMA a été quantifiée par RT-qPCR et normalisée par l'expression de l'ARNm de la β-actine. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicate (n=4). * p < 0,05 vs. CT; ** p < 0,01 vs. CT; *** p < 0,001 vs. CT; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Puisque nous avons montré précédemment que les EV LPS augmentent la calcification des CMLV induite par le Pi et que lors du processus de calcification les CMLV changent de phénotype, nous avons étudié les effets des EVs dérivées de macrophages sur le switch ostéogénique des CMLV.

Nos résultats montrent que l'expression des ARNm d'Osx et d'OCN est significativement augmentée après traitement des CMLV avec du Pi et les EV LPS par rapport aux CMLV traitées au Pi seul (* $p < 0,05$ vs. Pi (4mM) ; ** $p < 0,01$ vs. Pi (4mM) ; **Figure 72A et B**). Les EV CT6 semblent également augmenter l'expression de ces marqueurs sans atteindre la significativité. Parallèlement, l'expression génique de l' α -SMA est significativement diminuée par rapport aux CMLV traitées au Pi (** $p < 0,01$ vs. Pi (4mM) ; **Figure 72C**). Dans l'ensemble, ces résultats montrent que les EV LPS induisent un switch ostéogénique des CMLV, ce qui peut favoriser la calcification induite par le Pi.

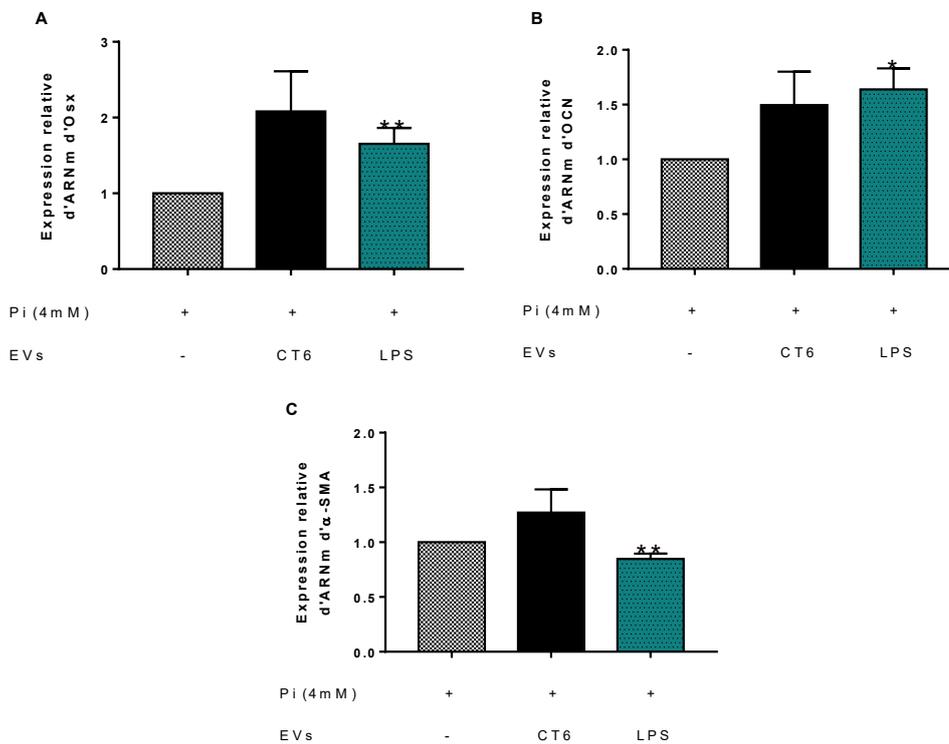


Figure 72 : Effets des vésicules extracellulaires (EVs) de macrophages sur l'expression génique de marqueurs ostéogéniques et contractile des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).

Les CMLV ont été incubées avec 4 mM de phosphate inorganique (Pi) avec ou sans les EVs de macrophages pendant 7 jours. L'expression génique de (A) Osx, (B) OCN et (C) α -SMA a été quantifiée par RT-qPCR et normalisée par l'expression de l'ARNm de la β -actine. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicate ($n=4$). * $p < 0,05$ vs. Pi (4 mM) ; ** $p < 0,01$ vs. Pi (4 mM) ; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

L'ensemble de ces résultats ont permis de montrer que les EV LPS sont capables d'induire une réponse pro-inflammatoire et pro-oxydante dans les CMLV, aggravant ainsi le mécanisme de CV.

5. Analyse du contenu protéique des EVs dérivées de macrophages après traitement avec du LPS-EK

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action des EV LPS dans la propagation de l'inflammation, du stress oxydant et dans l'aggravation de la calcification des CMLV, nous avons analysé le contenu protéique des EVs et plus particulièrement le contenu en cytokines pro-inflammatoires.

Pour ce faire, nous avons dans un premier temps étudié par spectrométrie de masse le contenu protéique des EVs de macrophages. L'enrichissement de nos échantillons d'EVs a été confirmé par la présence de plusieurs marqueurs spécifiques des EVs tels que des tétraspanines (CD9, CD81, CD63), des protéines du complexe ESCRT (Alix, Tsg101, Vps ...) ainsi que des protéines Rab GTPases (**Tableau 6**). D'autres protéines associées avec la physiopathologie des EVs ont également été retrouvées dans nos échantillons (**Tableau 6**).

Familles de protéines d'EVs	Protéines détectées
Tétraspanines	CD9, CD81, CD63
Protéines du complexe ESCRT	Alix, Tsg101, Vps4a, Vps4b, Vps25, Vps28, Vps36, Vps37b, Chmp2a, Chmp2b, Chmp3, Chmp4b, Chmp6, Flotillin-1, Flotillin-2 et Syntenin-1
Protéines Rab GTPases	Rab5a, Rab5b, Rab5c, Rab7a, Rab9a, Rab27a et Rab35
Protéines associées avec la physiopathologie des EVs	<ul style="list-style-type: none"> • Intégrines $\beta 1$ et $\beta 5$ • Annexines A2,5 et 6 • Pyrophosphatase inorganique 2 • Kinases (Tyrosine Kinase et MAPK) • Scramblases 1 and 3 • Phospholipases D4 • Glutathione-S-Transferase • Protéines BAX • Cytokine receptor-like factor 3

Tableau 6 : Détection par spectrométrie de masse de protéines spécifiques de vésicules extracellulaires (EVs) et impliquées dans la physiopathologie des EVs.

L'analyse par spectrométrie de masse a montré un nombre similaire de protéines détectées (environ 2700) dans nos différents échantillons avec un FDR < 5%.

Pour déterminer les effets du LPS-EK sur le contenu des EVs, nous avons comparé les EVs sécrétées par les macrophages après traitement avec du LPS-EK (EV LPS) avec les EVs sécrétées par les macrophages non traités (EV CT6). Les résultats sont représentés sous forme de Volcano plot (**Figure 73**).

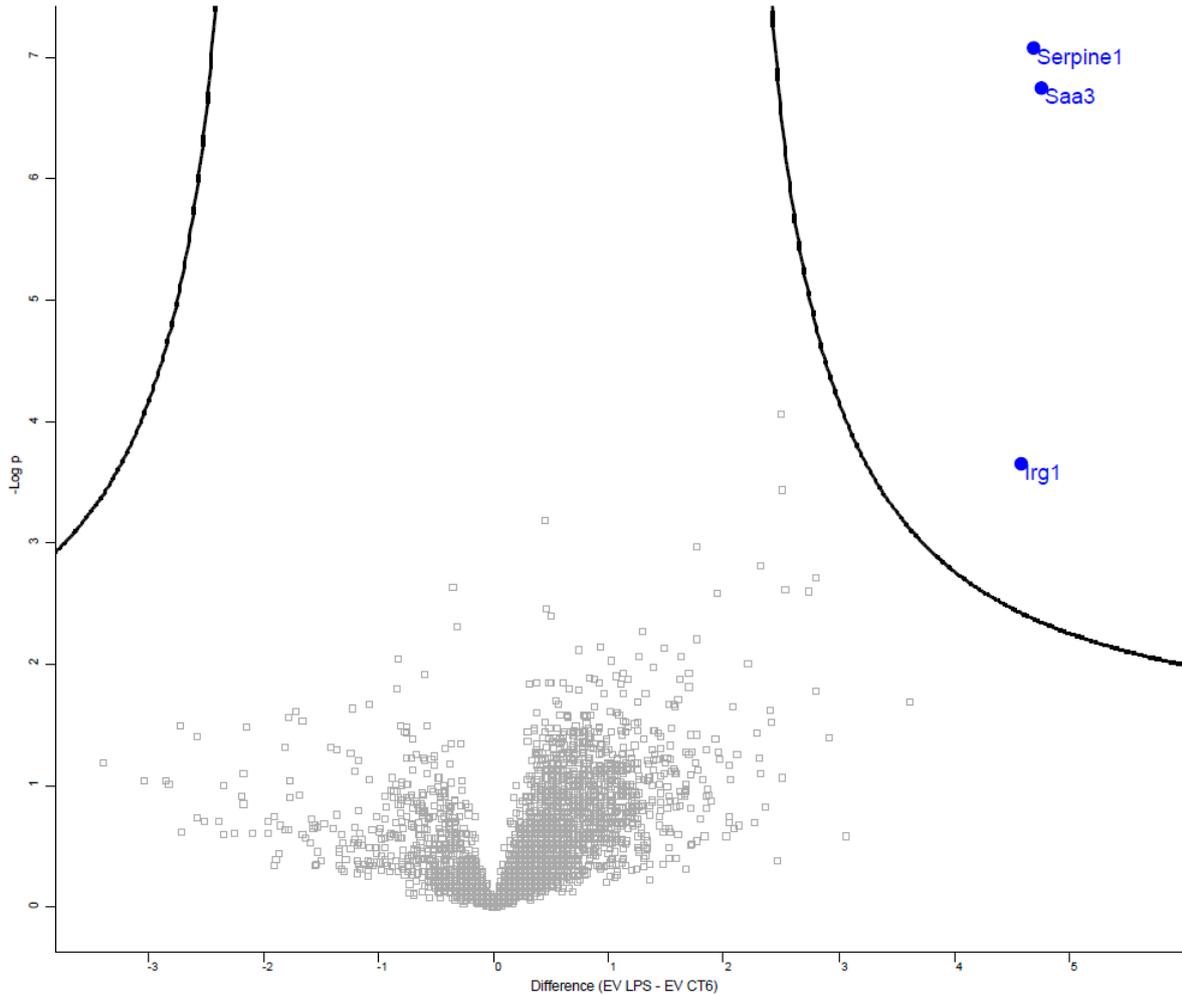


Figure 73 : Volcano Plot représentant les effets du lipopolysaccharide-EK (LPS-EK) sur le contenu protéique des vésicules extracellulaires (EVs) dérivées des macrophages.

Les EVs ont été récoltées à partir de milieu de culture des macrophages non traités (EV CT6) ou traités avec du lipopolysaccharide-EK à une concentration de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (EV LPS). Une analyse par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) couplée à la spectrométrie de masse a été réalisée. Un test de Student non apparié a été mené et une *p*-value inférieur à 0,01 ainsi qu'un taux de fausses découvertes (FDR) inférieur à 5 % ont été utilisés. Cinq expériences indépendantes ont été réalisées.

Nous avons ainsi mis en évidence une surexpression de trois protéines au sein des EV LPS en comparaison aux EV CT6 : la cis-aconitate décarboxylase (CAD) codée par le gène *immunoresponse gene 1 (Irg1)* ; l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1 (PAI-1) codé par le gène *Serpine1* et la protéine sérum amyloïde A-3 (Saa3) codée par le gène *Saa3* ($p < 0,01$ vs. EV CT6 ; **Figure 73**).

Dans un second temps, nous avons analysé l'expression de 10 cytokines pro-inflammatoires dans les EVs sécrétées par les macrophages traités ou non au LPS-EK en utilisant un kit de dosage multiplex (**Annexe 1**). Une augmentation significative des 10 cytokines pro-inflammatoires est observée dans les EV LPS en comparaison aux EV CT6 (* $p < 0,05$ vs. EV CT6 ; **Figure 74**).

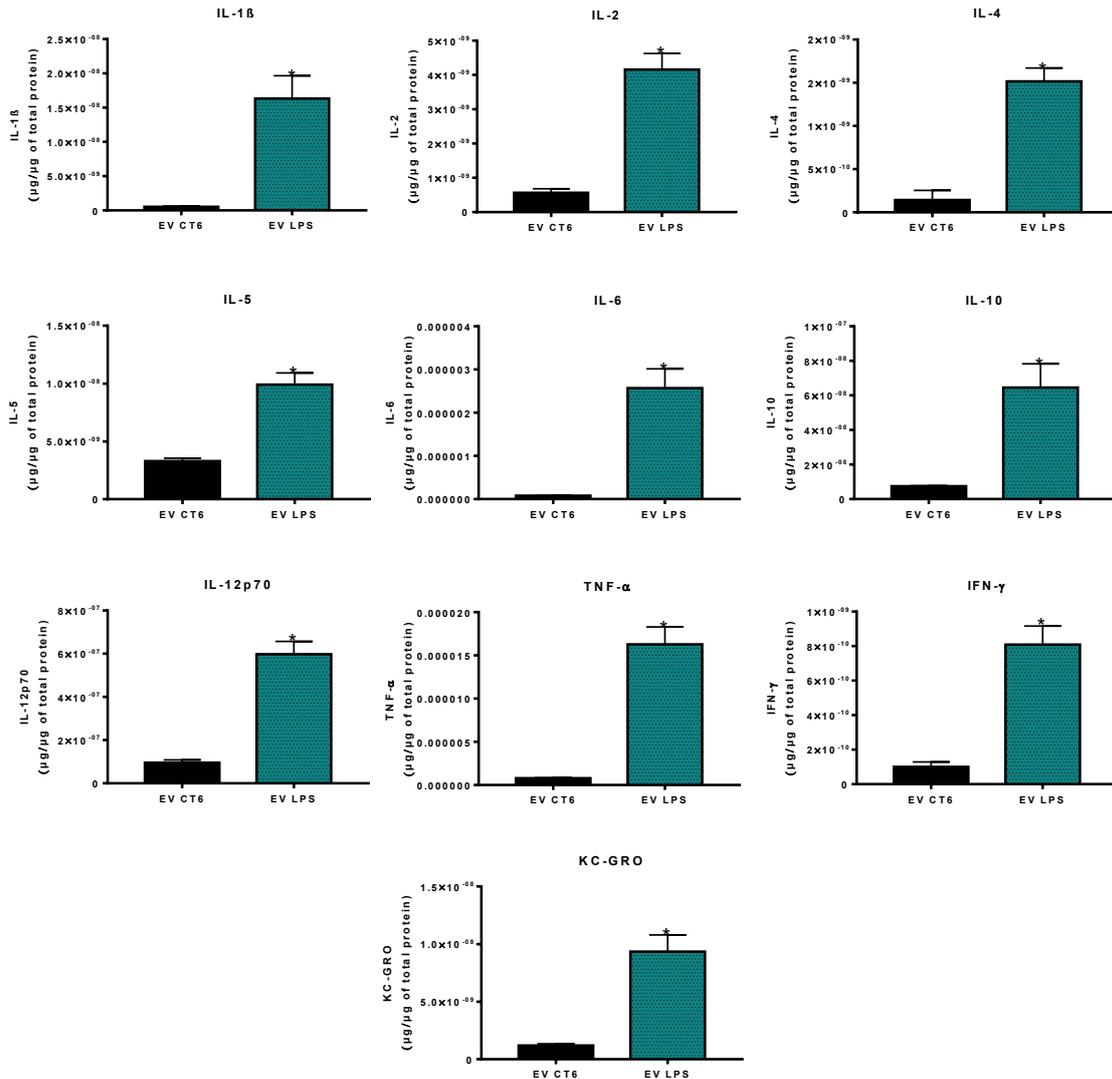


Figure 74 : Effets du lipopolysaccharide-EK (LPS-EK) sur l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans les vésicules extracellulaires (EVs) dérivées des macrophages.

Les EVs ont été isolées du milieu de culture des cellules RAW incubées sans LPS-EK (EV CT6) ou avec 1 µg/ml de LPS-EK (EV LPS) pendant 6 heures. L'expression protéique des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF- α , IFN- γ , KC-GRO) a été mesurée dans les EVs dérivées des macrophages en utilisant un kit de dosage multiplex. * $p < 0,05$ vs. EV CT6 ; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Une analyse en composantes principales (ACP) des résultats du kit multiplex a également été réalisée permettant ainsi de représenter l'ensemble des données obtenues sur le même graphique. Nous pouvons ainsi observer deux populations bien distinctes d'EVs de macrophages selon le traitement (LPS-EK ou CT) (**Figure 75**).

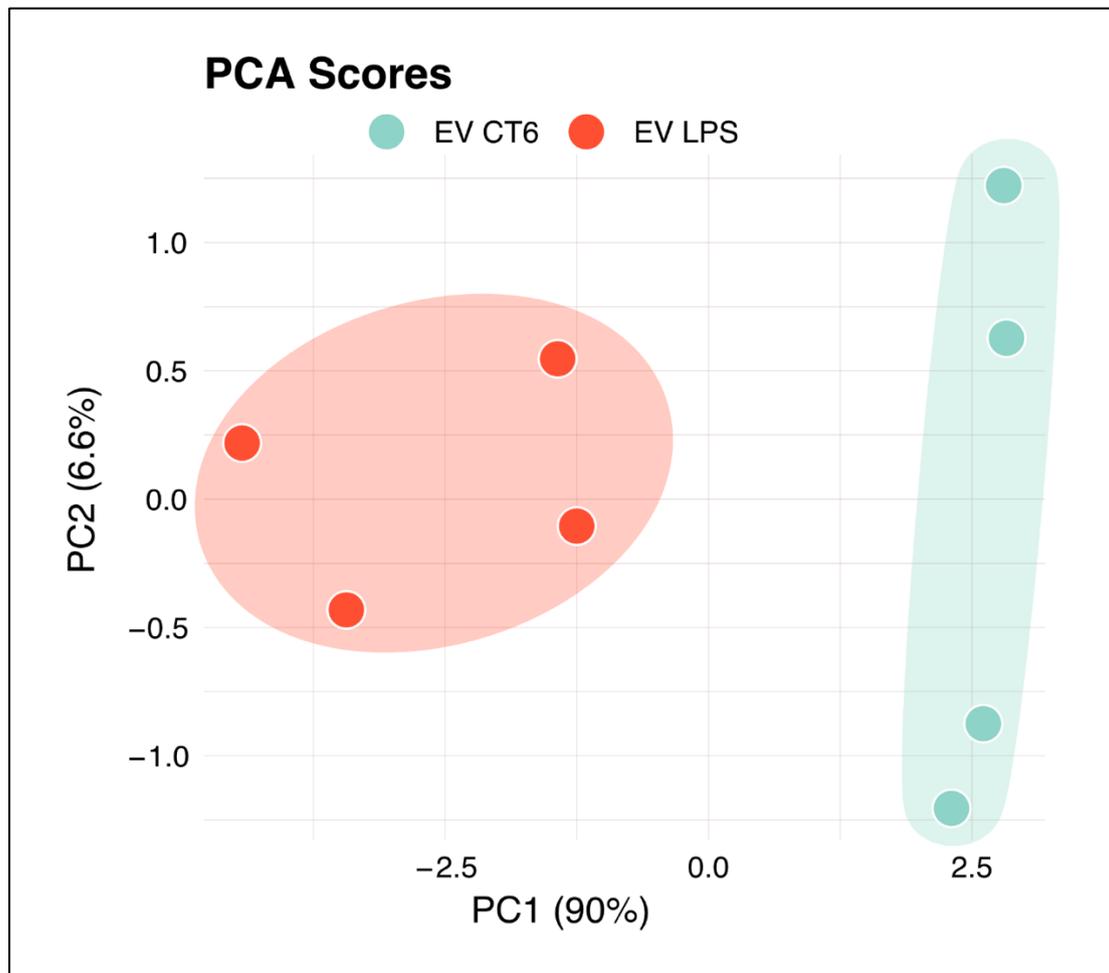


Figure 75 : Analyse en composantes principales (ACP) des effets du lipopolysaccharide-EK (LPS-EK) sur l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans les vésicules extracellulaires (EVs) dérivées de macrophages.

Les EVs ont été isolées du milieu de culture des cellules RAW incubées sans LPS-EK (EV CT6) ou avec 1 µg/ml de LPS-EK (EV LPS) pendant 6 heures. L'expression protéique des cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF-α, IFN-γ, KC-GRO) a été mesurée dans les EVs dérivées des macrophages en utilisant un kit de dosage multiplex.

L'analyse ACP des échantillons montre très clairement une séparation entre le profil inflammatoire des EVs sécrétées par les macrophages traités avec du LPS-EK (EV LPS) et non traités (EV CT6). Ce graphique montre ainsi qu'il existe un profil inflammatoire spécifique qui différencie les 2 groupes d'échantillons ce qui pourrait expliquer l'aggravation de la CV observée précédemment.

Partie II :
Homocystéine

I. Effets de l'homocystéine sur les macrophages

1. Effets de l'homocystéine sur la viabilité cellulaire des macrophages

La viabilité des cellules RAW a été analysée après un traitement de 24 heures avec l'homocystéine à une concentration de 10,5 μM (concentration normale) ou 45,2 μM (concentration urémique). De façon intéressante, le traitement à l'homocystéine ne montre aucune cytotoxicité pour les macrophages (**Figure 76**), mais nous observons une augmentation significative de la prolifération cellulaire par rapport aux cellules non traitées (* $p < 0,05$ vs. CT ; **Figure 76**).

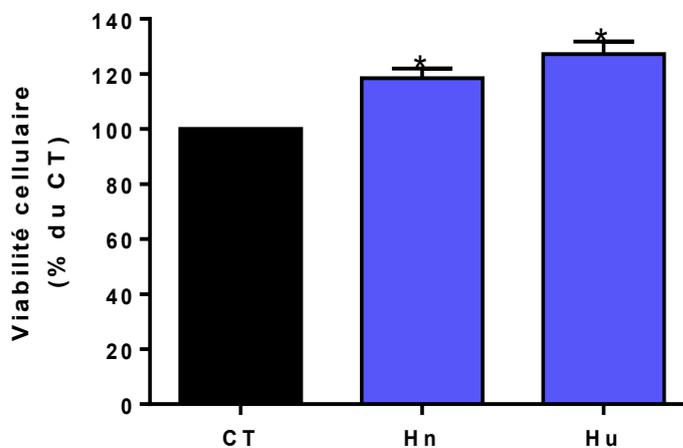


Figure 76 : Effets de l'homocystéine sur la viabilité cellulaire des macrophages.

Les macrophages ont été incubés avec de l'homocystéine à une concentration de 10,5 μM (Hn, concentration normale) ou 45,2 μM (Hu, concentration urémique) pendant 24 heures. La viabilité cellulaire est ensuite mesurée par le test de WST-1. La viabilité de cellules non traitées est rapportée à 100 %. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicate ($n=4$). * $p < 0,05$ vs. CT ; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Cet effet pro-prolifératif de l'homocystéine sur les macrophages est également retrouvé en microscopie optique où l'on observe une plus forte densité cellulaire après traitement d'un même nombre de cellulesensemencées (**Figure 77**).

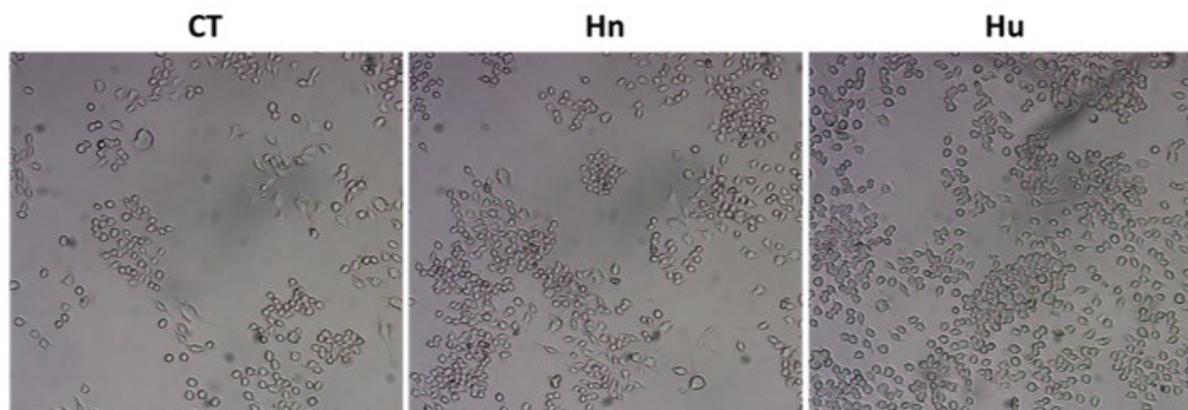


Figure 77 : Observation des macrophages au microscope optique inversé après traitement avec de l'homocystéine.

Les macrophages ont été incubés avec de l'homocystéine à une concentration de $10,5 \mu\text{M}$ (Hn, concentration normale) ou $45,2 \mu\text{M}$ (Hu, concentration urémique) pendant 24 heures. Puis, les cellules ont été observées au microscope optique inversé au grossissement $\times 10$.

2. Effets de l'homocystéine sur l'inflammation des macrophages

Afin d'évaluer les effets de l'homocystéine sur l'inflammation des macrophages, nous avons analysé l'expression des ARNm de différentes cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1 β , TNF- α et MIP-2) par RT-qPCR. L'expression génique de l'IL-6 est significativement augmentée après traitement des macrophages avec l'homocystéine à la concentration urémique par rapport aux macrophages non traités (* $p < 0,05$ vs. CT ; **Figure 78A**). En revanche, aucun effet sur l'expression génique d'IL-1 β , de TNF- α et de MIP-2 en comparaison aux macrophages non traités n'est observé (**Figure 78B, C, D**).

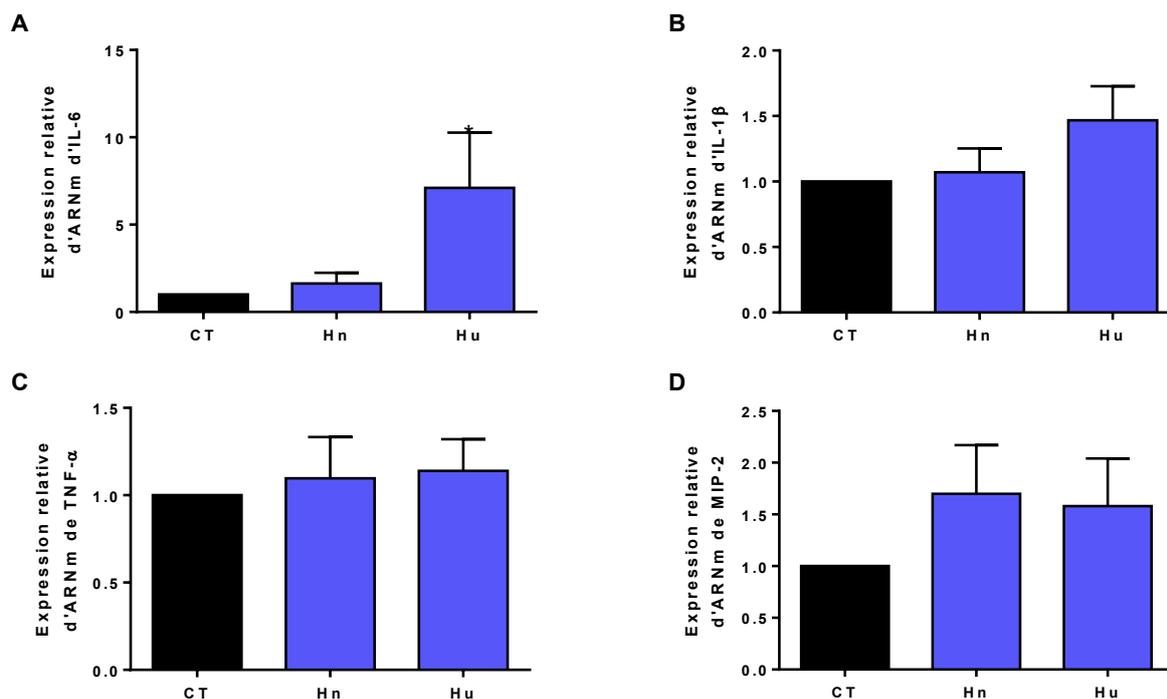


Figure 78 : Effets de l'homocystéine sur l'expression génique des cytokines pro-inflammatoires dans les macrophages.

Les macrophages ont été incubés avec de l'homocystéine à une concentration de 10,5 μM (Hn, concentration normale) ou 45,2 μM (Hu, concentration urémique) pendant 24 heures. L'expression génique de (A) IL-6, (B) IL-1 β , (C) TNF- α , (D) MIP-2 a été quantifiée par RT-qPCR et normalisée par l'expression de l'ARNm de la β -actine. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicate ($n=4$). * $p < 0,05$ vs. CT ; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Nous avons ensuite analysé l'expression de 10 cytokines pro-inflammatoires dans les macrophages traités ou non à l'homocystéine en utilisant un kit de dosage multiplex de chez MSD (**Annexe 1**). L'homocystéine n'a pas d'effet sur le contenu en cytokines pro-inflammatoires des macrophages (**Figure 79**). Ces résultats confirment donc ceux obtenus par RT-qPCR.

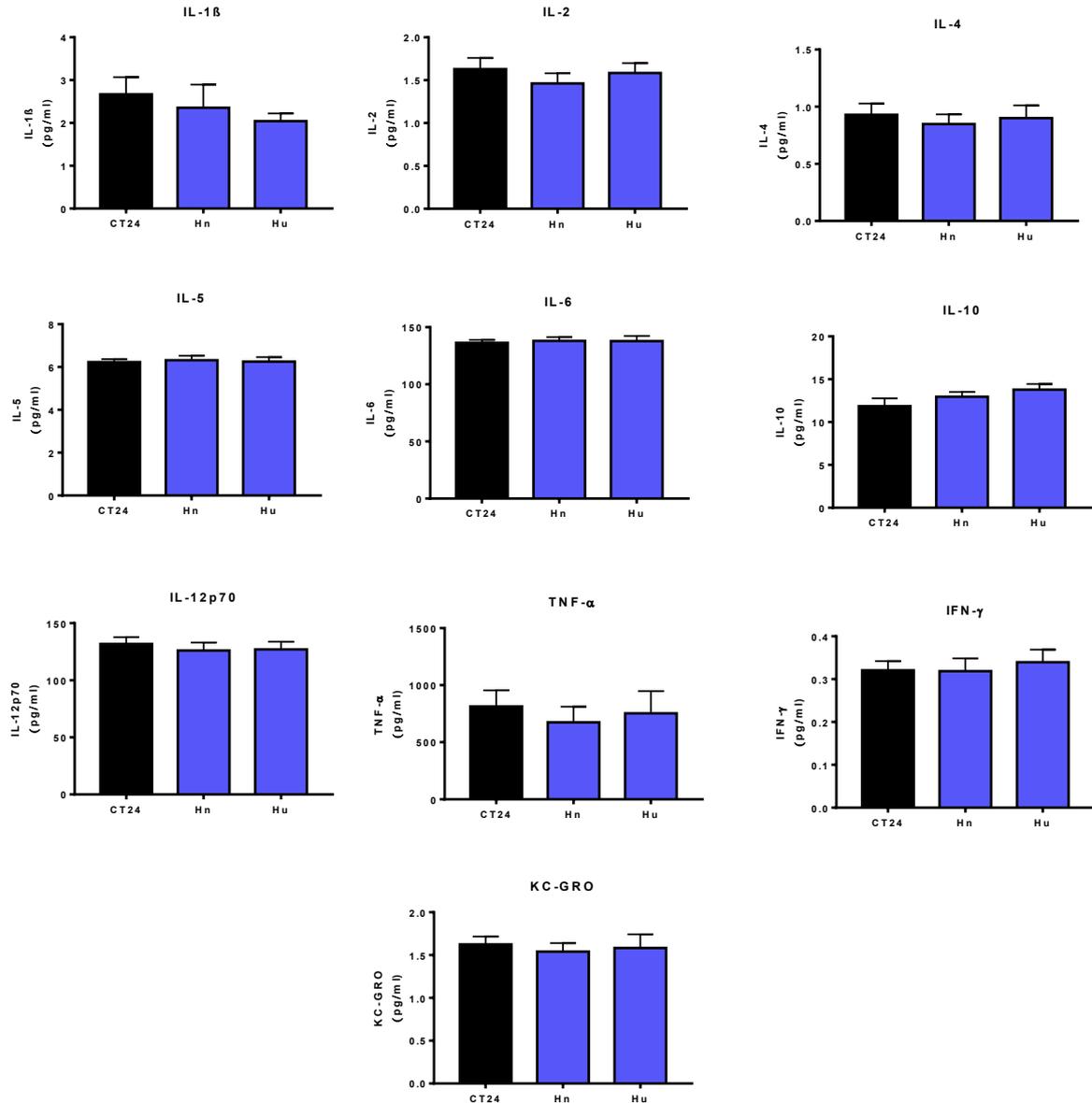


Figure 79 : Effets de l'homocystéine sur l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans les macrophages.

Les macrophages ont été incubés avec de l'homocystéine à une concentration de 10,5 μ M (Hn, concentration normale) ou 45,2 μ M (Hu, concentration urémique) pendant 24 heures. L'expression protéique des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF- α , IFN- γ , KC-GRO) a été mesurée dans les macrophages en utilisant un kit de dosage multiplex.

3. L'homocystéine induit un stress oxydant dans les macrophages

3.1. L'homocystéine augmente la production de ROS

Afin d'étudier les effets de l'homocystéine sur le stress oxydant dans les macrophages, nous avons mesuré la production intracellulaire de ROS en utilisant la sonde fluorescente DCFH-DA. Comme le montre la **Figure 80**, l'homocystéine augmente significativement la production de ROS par rapport aux cellules non traitées avec un effet plus important à la concentration normale (* $p < 0,05$ vs. CT ; *** $p < 0,001$ vs. CT ; \$ $p < 0,05$ vs. Hn ; **Figure 80**).

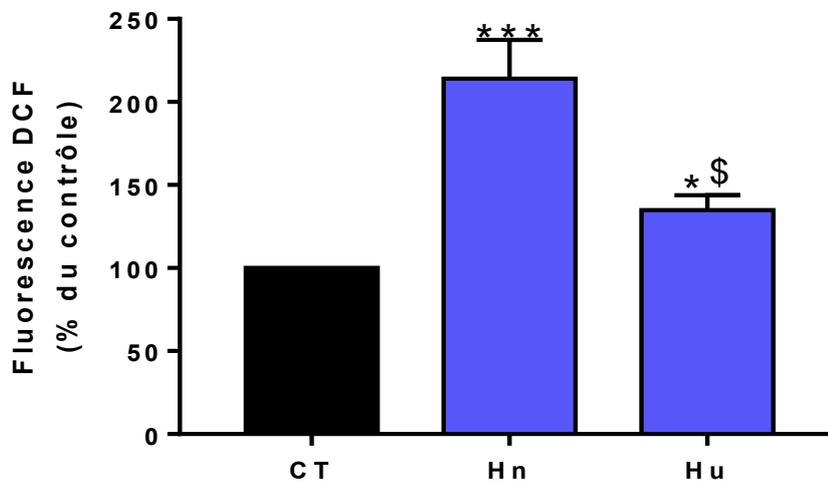


Figure 80 : Effets de l'homocystéine sur la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les macrophages.

Les cellules ont été incubées avec $10 \mu\text{M}$ de DCFH-DA dans du PBS à 37°C pendant 30 minutes. Puis, les macrophages ont été traités avec de l'homocystéine à une concentration de $10,5 \mu\text{M}$ (Hn, concentration normale) ou $45,2 \mu\text{M}$ (Hu, concentration urémique) pendant 24 heures. La production des ROS est déterminée par une mesure de la fluorescence du DCF ($\lambda\text{Ex } 492 \text{ nm}$, $\lambda\text{Em } 535 \text{ nm}$). La production des ROS de cellules non traitées (CT) est rapportée à 100 %. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM de 7 expériences indépendantes réalisées en triplicate ($n=7$). (* $p < 0,05$ vs. CT ; *** $p < 0,001$ vs. CT ; \$ $p < 0,05$ vs. Hn ; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney).

Nous avons également analysé les effets de deux antioxydants de mécanismes d'action différents sur la production de ROS induite par l'homocystéine dans les macrophages afin de vérifier la spécificité de l'augmentation de ce stress oxydant. La **Figure 81** montre que la N-acétyl-l-cystéine (NAC) mais également l' α -tocophérol (vitamine E) diminuent significativement la production de ROS induite par l'homocystéine (* $p < 0,05$ vs. CT ; \$ $p < 0,05$ vs. Hn ; £ $p < 0,05$ vs. Hu ; **Figure 81**). Ces résultats confirment l'induction de stress oxydant par l'homocystéine puisque les antioxydants sont capables d'inhiber ces effets.

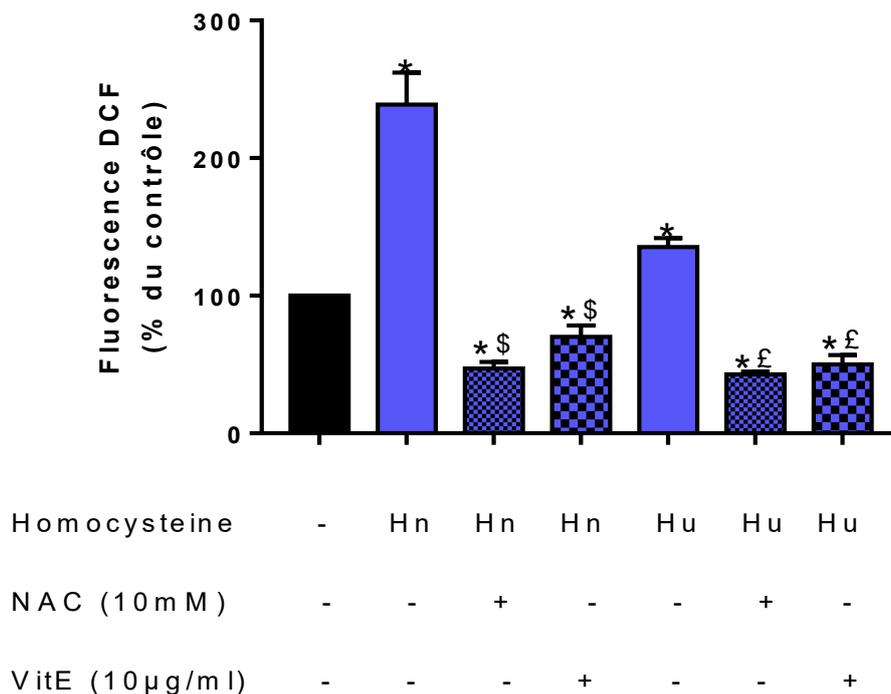


Figure 81 : Effets des antioxydants N-acétyl-l-cystéine (NAC) et α -tocophérol (vitamine E) sur l'induction de ROS par l'homocystéine.

Les cellules ont été incubées avec 10 μ M de DCFH-DA dans du PBS à 37°C pendant 30 minutes. Puis, les macrophages ont été traités avec de l'homocystéine à une concentration de 10,5 μ M (Hn, concentration normale) ou 45,2 μ M (Hu, concentration urémique) pendant 24 heures avec ou sans NAC à 10 mM ou vitamine E à 10 μ g/ml. La production des ROS est déterminée par une mesure de la fluorescence du DCF (λ Ex 492 nm, λ Em 535 nm). La production des ROS de cellules non traitées (CT) est rapportée à 100 %. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicate (n=4). * $p < 0,05$ vs. CT; \$ $p < 0,05$ vs. Hn; £ $p < 0,05$ vs. Hu ; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

3.2. L'homocystéine diminue la production d'O₂⁻

Comme précédemment pour le LPS, nous nous sommes intéressés à une ROS en particulier à savoir l'anion superoxyde (O₂⁻). Nous avons ainsi étudié les effets de l'homocystéine sur la production d'O₂⁻ par les macrophages en utilisant la molécule DHE, fluorophore spécifique d'O₂⁻. Nos résultats montrent que l'homocystéine diminue significativement la production d'O₂⁻ par rapport aux cellules non traitées (* $p < 0,05$ vs. CT ; **Figure 82**).

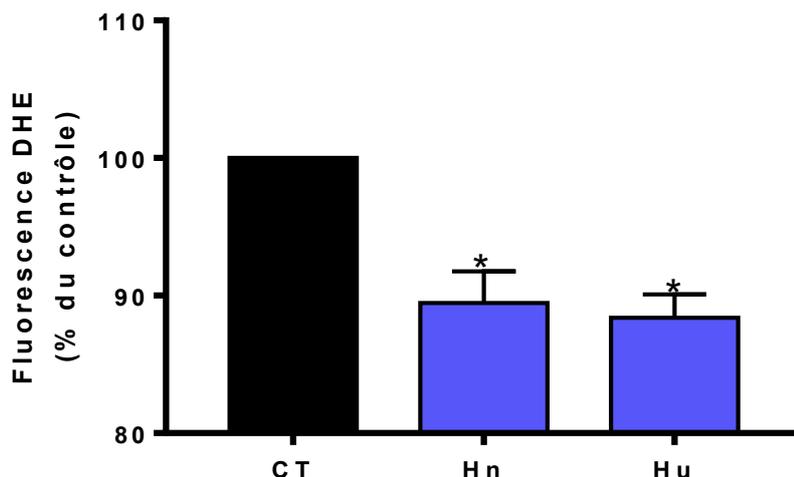


Figure 82 : Effets de l'homocystéine sur la production d'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) par les macrophages.

*Les cellules ont été incubées avec 10 μM de DHE dans du PBS à 37°C pendant 1 heure. Puis, les macrophages ont été traités avec de l'homocystéine à une concentration de 10,5 μM (Hn, concentration normale) ou 45,2 μM (Hu, concentration urémique) pendant 24 heures. La production d' $O_2^{\cdot-}$ est déterminée par une mesure de la fluorescence (λEx 492 nm, λEm 615 nm). La production d' $O_2^{\cdot-}$ de cellules non traitées (CT) est rapportée à 100 %. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicate (n=4). * $p < 0,05$ vs. CT ; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney.*

Nous avons également observé une diminution significative de l'expression des ARNm de SOD-1, SOD-2 et Nox-2 après traitement à l'homocystéine par rapport aux macrophages contrôles (* $p < 0,05$ vs. CT ; **Figure 83**).

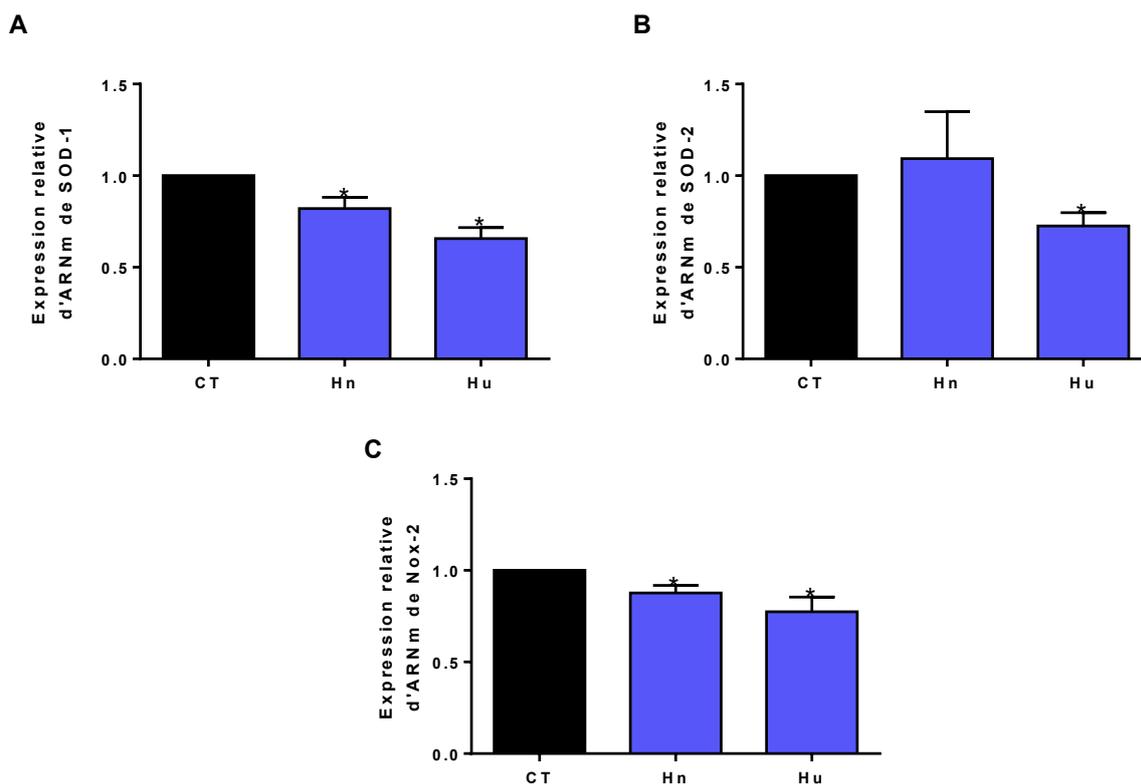


Figure 83 : Effets de l'homocystéine sur l'expression génique de SOD-1, SOD-2 et Nox-2 dans les macrophages.

Les macrophages ont été incubés avec de l'homocystéine à une concentration de $10,5 \mu\text{M}$ (Hn, concentration normale) ou $45,2 \mu\text{M}$ (Hu, concentration urémique) pendant 24 heures. L'expression génique de (A) SOD-1, (B) SOD-2 et (C) Nox-2 a été quantifiée par RT-qPCR et normalisée par l'expression de l'ARNm de la β -actine. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicate ($n=4$). * $p < 0,05$ vs. CT ; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

3.3. L'homocystéine diminue la production de NO

L' O_2^{\bullet} est capable de réagir rapidement avec le NO pour former du ONOO $^-$. Nous avons donc étudié les effets de l'homocystéine sur la production de NO par les macrophages en utilisant la sonde fluorescente DAF. L'homocystéine diminue significativement la production de NO par rapport aux cellules non traitées (* $p < 0,05$ vs. CT ; **Figure 84A**). En revanche, l'homocystéine n'a aucun effet sur l'expression des ARNm de la iNOS, enzyme synthétisant le NO, dans les macrophages (**Figure 84B**).

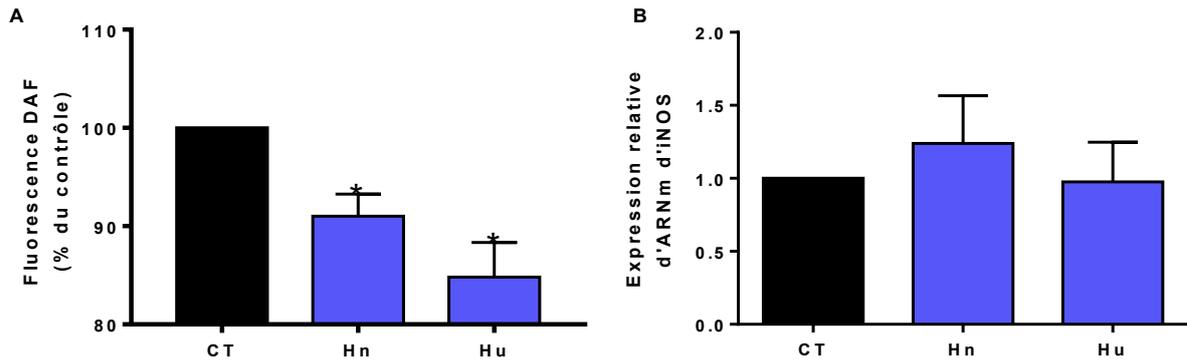


Figure 84 : Effets de l'homocystéine sur la production de monoxyde d'azote (NO) et l'expression génique de l'inductible NO synthase (iNOS) dans les macrophages.

(A) Les cellules ont été incubées avec $0,1 \mu\text{M}$ de DAF dans une solution de Krebs-Ringer à 37°C pendant 1 heure. Puis, les macrophages ont été traités avec de l'homocystéine à une concentration de $10,5 \mu\text{M}$ (Hn, concentration normale) ou $45,2 \mu\text{M}$ (Hu, concentration urémique) pendant 24 heures. La production de NO est déterminée par une mesure de la fluorescence ($\lambda\text{Ex } 492 \text{ nm}$, $\lambda\text{Em } 535 \text{ nm}$). La production de NO de cellules non traitées (CT) est rapportée à 100 %. (B) Les macrophages ont été traités avec de l'homocystéine puis l'expression génique d'iNOS a été quantifiée par RT-qPCR et normalisée par l'expression de l'ARNm de la β -actine. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicate ($n=4$). * $p < 0,05$ vs. CT ; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

L'homocystéine induit donc un stress oxydant dans les macrophages avec une augmentation de la production des ROS. La diminution de la production d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ et du NO observée pourrait s'expliquer par la formation de peroxynitrite, autre molécule oxydante.

4. L'homocystéine diminue l'autophagie dans les macrophages

Comme décrit précédemment, l'autophagie est un processus qui a été récemment reconnu comme étant impliqué dans la biogenèse et la sécrétion des EVs. C'est pourquoi, nous avons analysé les effets de l'homocystéine sur l'expression des ARNm des marqueurs d'autophagie (Atg5, Beclin-1, ULK1, LC3a et LC3b) par RT-qPCR. L'expression des ARNm codant pour Atg5, Beclin-1, ULK1 et LC3b est significativement diminuée après traitement à l'homocystéine (à l'exception d'Atg5 et LC3b en concentration d'homocystéine normale) par rapport aux macrophages non traités (* $p < 0,05$ vs. CT ; **Figure 85A, B, C, E**). En revanche, aucune modification de l'expression des ARNm de LC3a n'est observée dans nos conditions expérimentales (**Figure 85D**).

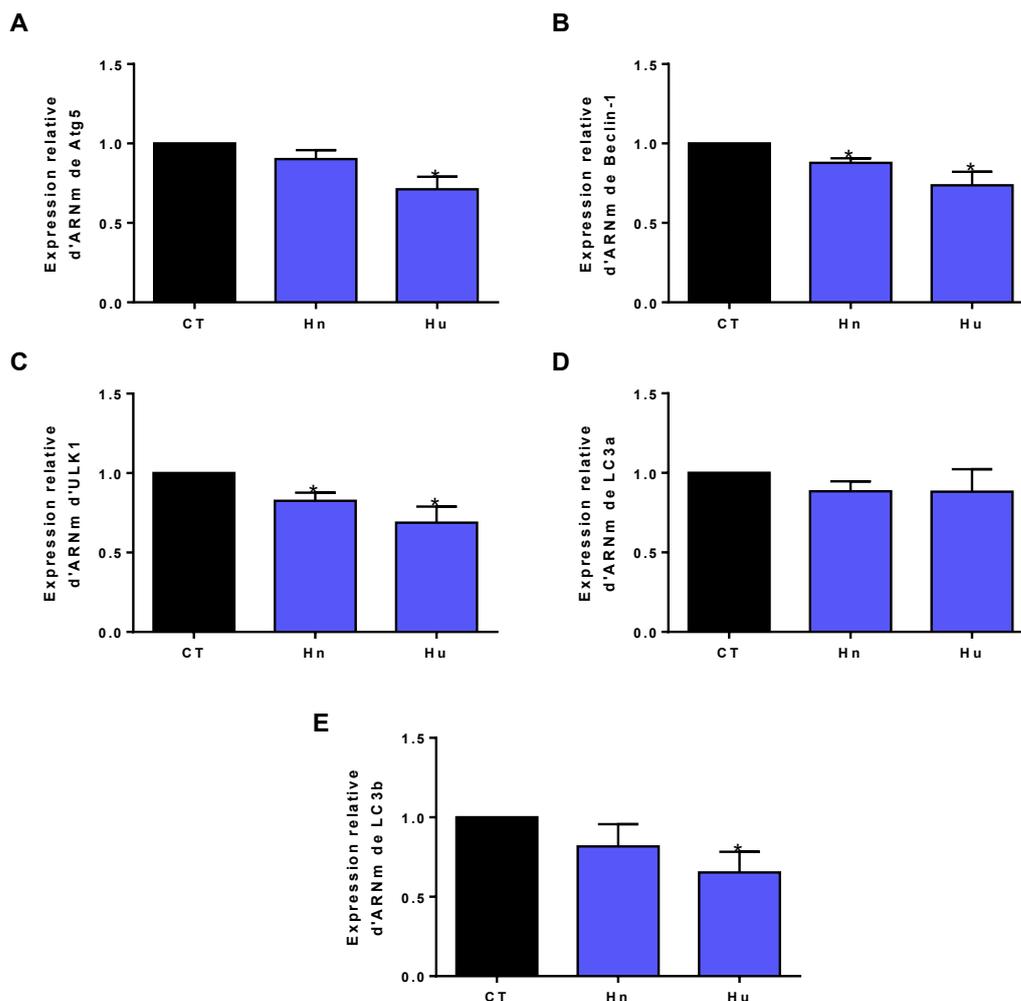


Figure 85 : Effets de l'homocystéine sur l'expression génique des marqueurs d'autophagie dans les macrophages.

Les macrophages ont été incubés avec de l'homocystéine à une concentration de 10,5 μM (Hn, concentration normale) ou 45,2 μM (Hu, concentration urémique) pendant 24 heures. L'expression génique de (A) Atg5, (B) Beclin-1, (C) ULK1, (D) LC3a et (E) LC3b a été quantifiée par RT-qPCR et normalisée par l'expression de l'ARNm de la β -actine. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicate ($n=4$). * $p < 0,05$ vs. CT ; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Nous avons ensuite étudié l'expression génique et protéique de p62. En effet, p62 est une protéine impliquée dans les mécanismes de flux d'autophagie. La **Figure 86A** montre que le traitement des cellules avec l'homocystéine à la concentration urémique augmente significativement l'expression génique de p62 (* $p < 0,05$ vs. CT ; § $p < 0,05$ vs. Hn ; **Figure 86A**) mais n'a aucun effet significatif sur son expression protéique (**Figure 86B**).

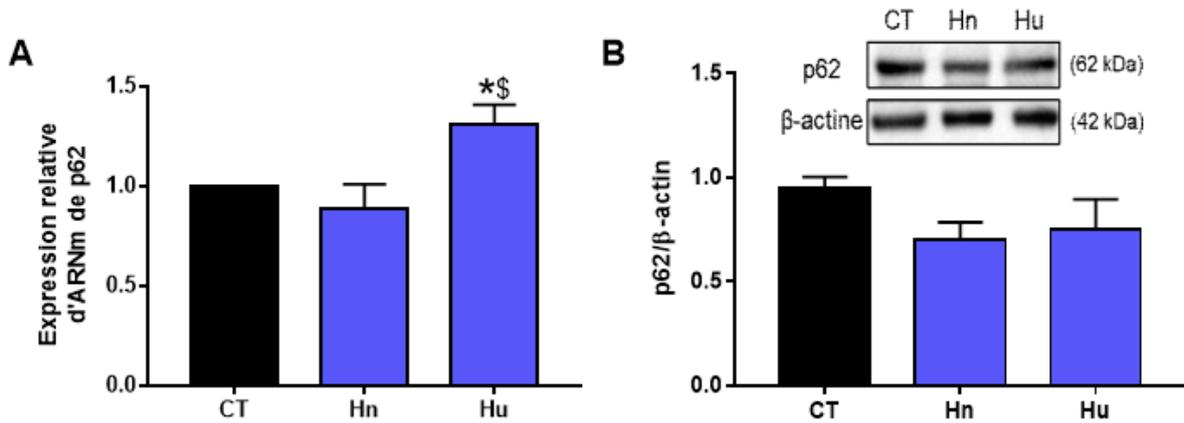


Figure 86 : Effets de l'homocystéine sur l'expression génique et protéique de p62 dans les macrophages.

Les macrophages ont été incubés avec de l'homocystéine à une concentration de 10,5 μM (Hn, concentration normale) ou 45,2 μM (Hu, concentration urémique) pendant 24 heures. **(A)** L'expression génique de p62 a été quantifiée par RT-qPCR et normalisée par l'expression de l'ARNm de la β -actine. **(B)** L'expression protéique de p62 a été quantifiée par Western Blot et normalisée par l'expression de la protéine β -actine. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicate ($n=4$). * $p < 0,05$ vs. CT ; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

L'ensemble de nos résultats suggèrent que l'homocystéine diminue les mécanismes d'autophagie dans les macrophages.

II. Effets de l'homocystéine sur la biogenèse des EVs de macrophages

Nous avons analysé l'expression des ARNm de différents marqueurs de la biogenèse des EVs (SMPD3, phospho-1 et TNAP) par RT-qPCR après traitement des macrophages avec l'homocystéine. Nos résultats montrent que l'homocystéine à la concentration urémique diminue de façon significative l'expression des ARNm de SMPD3 et de phospho-1 (* $p < 0,05$ vs. CT ; **Figure 87A et B**). En revanche, l'homocystéine ne semble pas avoir d'effet significatif sur l'expression de TNAP (**Figure 87C**).

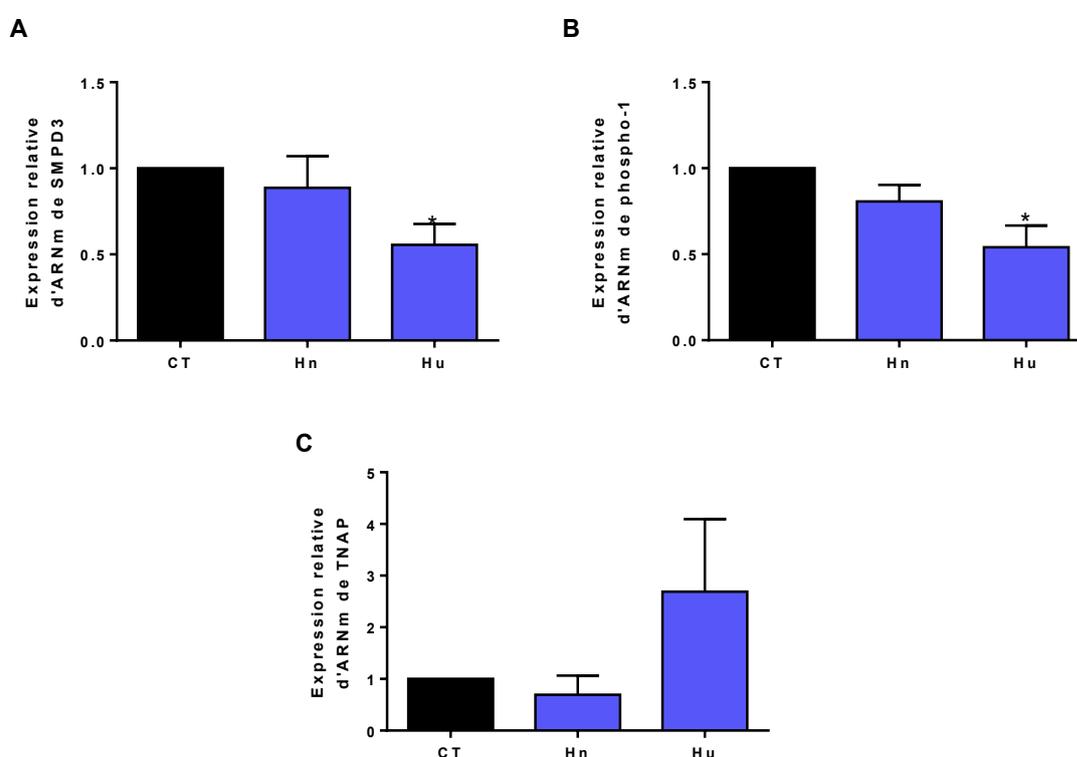


Figure 87 : Effets de l'homocystéine sur l'expression des gènes de la biogenèse des vésicules extracellulaires (EVs) dans les macrophages.

Les macrophages ont été incubés avec de l'homocystéine à une concentration de 10,5 µM (Hn, concentration normale) ou 45,2 µM (Hu, concentration urémique) pendant 24 heures. L'expression génique de (A) SMPD3, (B) phospho-1 et (C) TNAP a été quantifiée par RT-qPCR et normalisée par l'expression de l'ARNm de la β -actine. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicate (n=4). * $p < 0,05$ vs. CT ; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

III. Caractérisation des EVs de macrophages

Les EVs dérivées des macrophages traités ou non avec l'homocystéine ont également été caractérisées à l'aide des techniques décrites précédemment. Les images obtenues par TEM montrent que nos échantillons d'EVs étaient principalement enrichis en exosomes et en microvésicules (**Figure 88**).

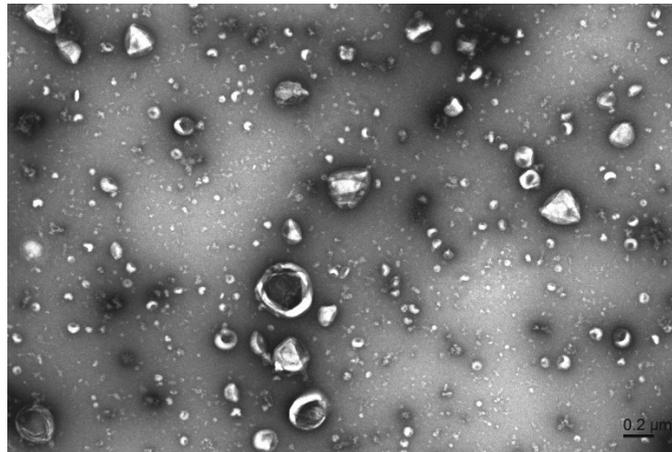


Figure 88 : Analyse des vésicules extracellulaires (EVs) sécrétées par les macrophages en microscopie électronique en transmission (TEM).

Nous avons également analysé par NTA la concentration et la taille des EVs sécrétées par les macrophages après traitement avec l'homocystéine. La taille moyenne des particules détectées par NTA est comprise entre 135 et 159 nm (**Figure 89**) ce qui correspond aux diamètres des exosomes et des microvésicules.

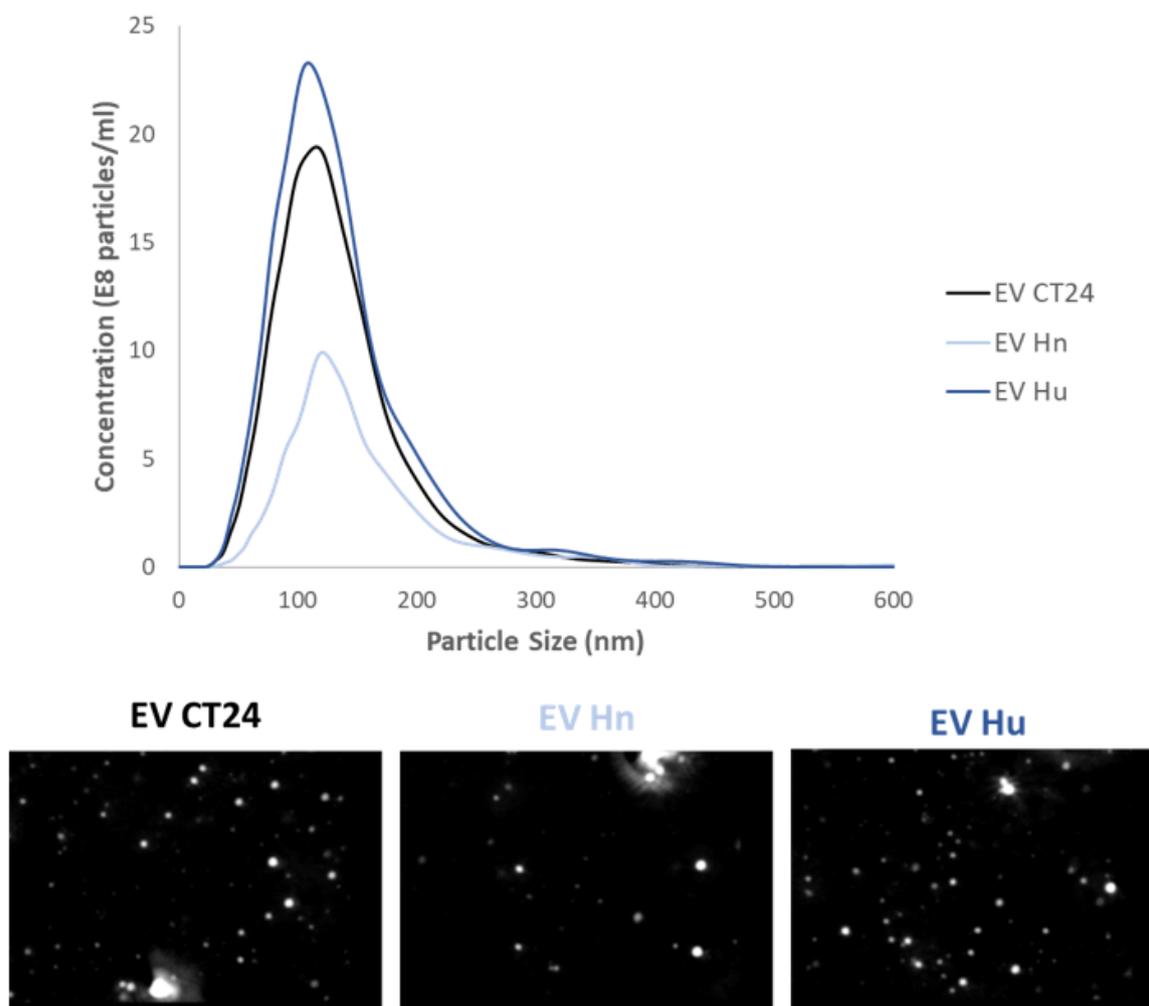


Figure 89 : Analyse de la distribution des vésicules extracellulaires (EVs) sécrétées par les macrophages selon la taille à l'aide de la technique par analyse du suivi individuel de particules (NTA).

Les EVs ont été récoltées à partir du milieu de culture des macrophages non traités (EV CT24) ou traités avec de l'homocystéine à une concentration de 10,5 μ M (concentration normale, EV Hn) ou 45,2 μ M (concentration urémique, EV Hu) pendant 24 heures.

L'analyse NTA de nos préparations d'EVs montre une concentration deux fois plus faible après traitement avec l'homocystéine à la concentration normale par rapport au contrôle ($0,98 \times 10^{11}$ EVs/mL vs $1,99 \times 10^{11}$ EVs/mL). A l'inverse, les préparations d'EVs issues des cellules traitées avec l'homocystéine à la concentration urémique ont une concentration plus importante que la condition contrôle ($2,40 \times 10^{11}$ EVs/mL vs $1,99 \times 10^{11}$ EVs/mL) (**Figure 90**).

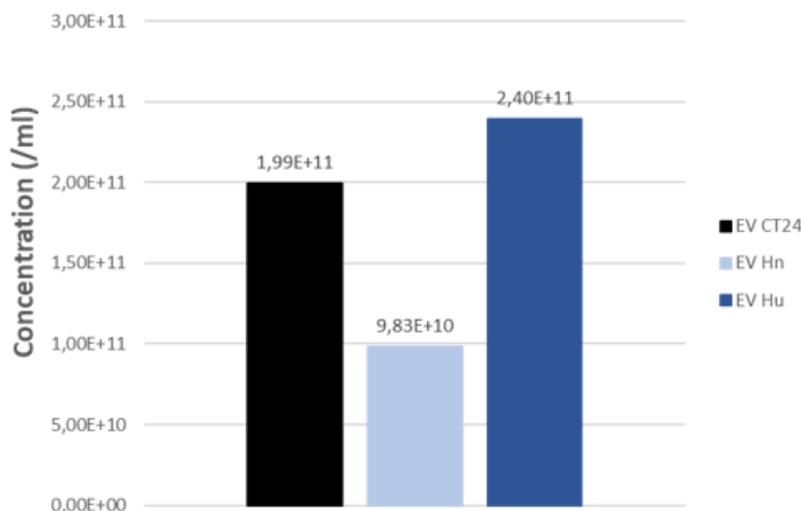


Figure 90 : Analyse de la concentration des vésicules extracellulaires (EVs) sécrétées par les macrophages à l'aide de la technique par analyse du suivi individuel de particules (NTA).

Les EVs ont été récoltées à partir du milieu de culture des macrophages non traités (EV CT24) ou traités avec de l'homocystéine à une concentration de $10,5 \mu\text{M}$ (concentration normale, EV Hn) ou $45,2 \mu\text{M}$ (concentration urémique, EV Hu) pendant 24 heures.

Comme précédemment, nous nous sommes ensuite intéressés à l'activité AChE dans nos échantillons d'EVs afin de les caractériser. Une augmentation significative de l'activité AChE a été mise en évidence dans nos préparations d'EVs (* $p < 0,05$ vs. CT ; **Figure 91**). Par contre, aucune différence n'est observée entre les préparations d'EVs provenant des différentes conditions.

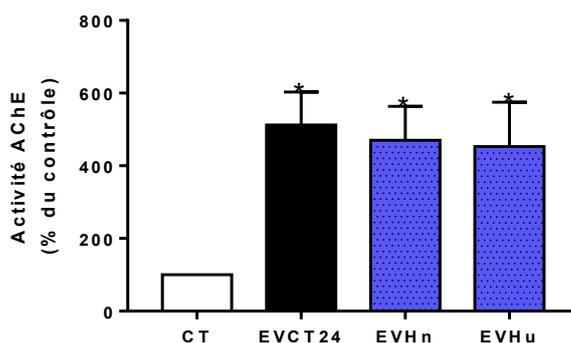


Figure 91 : Étude de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase (AChE) de vésicules extracellulaires (EVs) de macrophages.

Les EVs ont été récoltées à partir du milieu de culture des macrophages non traités (EV CT24) ou traités avec de l'homocystéine à une concentration de $10,5 \mu\text{M}$ (concentration normale, EV Hn) ou $45,2 \mu\text{M}$ (concentration urémique, EV Hu) pendant 24 heures. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicate ($n=4$). * $p < 0,05$ vs. CT ; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Nous avons ensuite analysé l'expression de deux tétraspanines spécifiques d'EVs (CD9 et CD81) ainsi que l'expression de la β -actine afin de caractériser les EVs contenues dans nos échantillons. La détection de ces protéines confirme la présence d'EVs dans nos échantillons (**Figure 92**).

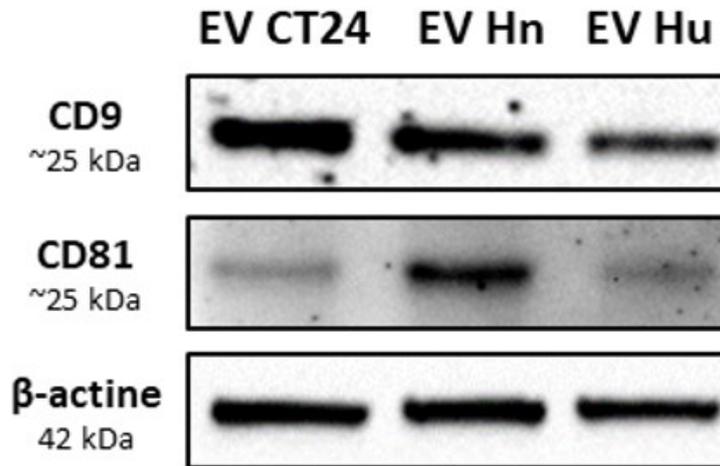


Figure 92 : Analyse par *Western Blot* de l'expression protéique de CD9, CD81 et β -actine de vésicules extracellulaires (EVs) de macrophages.

Les EVs ont été récoltées à partir du milieu de culture des macrophages non traités (EV CT24) ou traités avec de l'homocystéine à une concentration de 10,5 μ M (concentration normale, EV Hn) ou 45,2 μ M (concentration urémique, EV Hu) pendant 24 heures.

L'ensemble de ces résultats permettent donc de confirmer la présence d'EVs dans nos échantillons.

IV. Rôles et mécanismes d'action des EVs sécrétées par les macrophages

1. Effets des EVs dérivées de macrophages sur la viabilité cellulaire des CMLV

La viabilité des CMLV a été analysée après un traitement de 24 heures avec les EVs sécrétées par les macrophages contrôles (EV CT24) ou traités avec l'homocystéine à la concentration normale (EV Hn) ou à la concentration urémique (EV Hu). Les EVs dérivées de macrophages quel que soit le traitement n'ont montré aucune cytotoxicité pour les CMLV. Au contraire, une augmentation significative de la prolifération cellulaire a été observée par rapport aux cellules non traitées (* $p < 0,05$ vs. CT ; Figure 93).

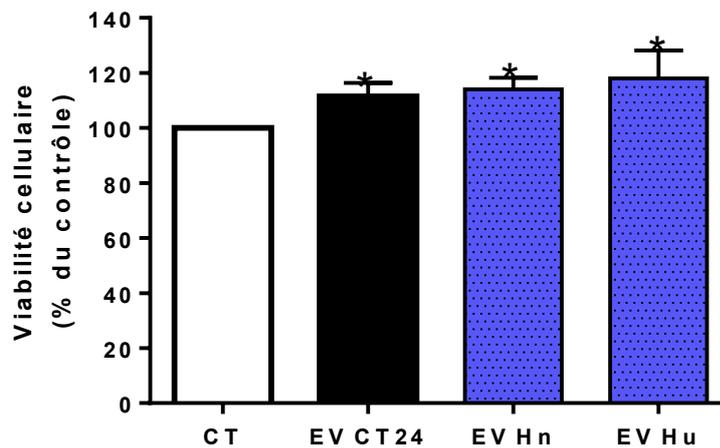


Figure 93 : Effets des vésicules extracellulaires (EVs) de macrophages sur la viabilité cellulaire des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).

Les CMLV ont été incubées avec les EVs de macrophages non traités (EV CT24) ou traités avec de l'homocystéine à une concentration de $10,5 \mu\text{M}$ (concentration normale, EV Hn) ou $45,2 \mu\text{M}$ (concentration urémique, EV Hu) pendant 24 heures. La viabilité cellulaire est ensuite mesurée par le test de WST-1. La viabilité de cellules non traitées (CT) est rapportée à 100 %. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicate ($n=4$). * $p < 0,05$ vs. CT ; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

2. Effets des EVs de macrophages traités avec de l'homocystéine sur l'inflammation de CMLV

Afin d'étudier les effets des EVs dérivées de macrophages traités ou non sur l'inflammation dans les CMLV, nous avons analysé l'expression des ARNm de différentes cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1 β et TNF- α) par RT-qPCR. Aucun effet des EVs de macrophages n'est observé sur l'expression génique des cytokines pro-inflammatoires des CMLV (**Figure 94**).

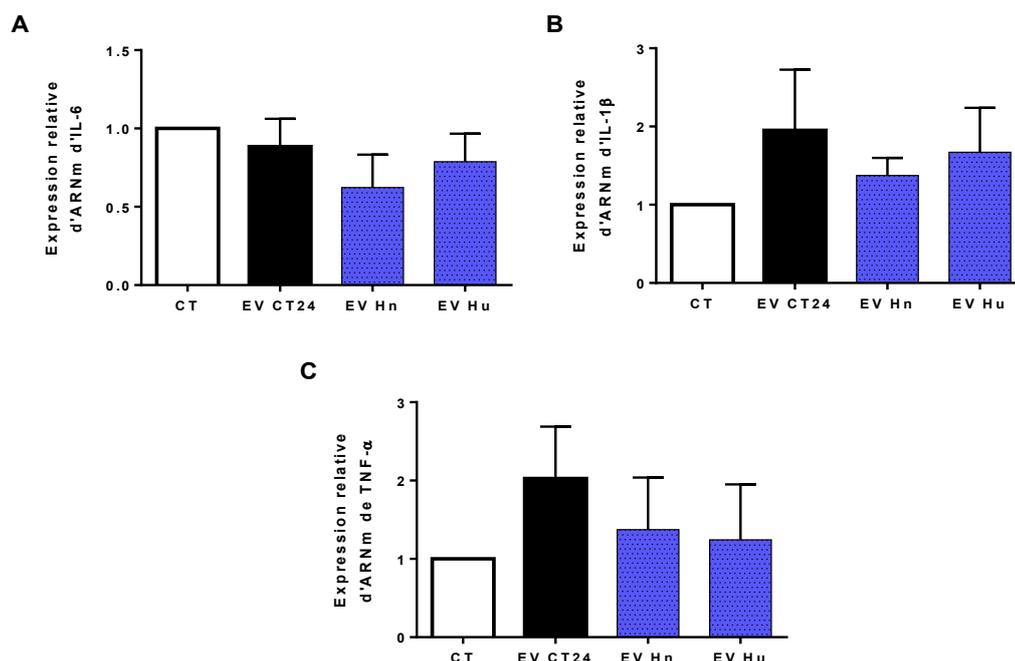


Figure 94 : Effets des vésicules extracellulaires (EVs) de macrophages sur l'expression génique de marqueurs d'inflammation des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).

Les CMLV ont été incubées avec les EVs de macrophages non traités (EV CT24) ou traités avec de l'homocystéine à une concentration de 10,5 μ M (concentration normale, EV Hn) ou 45,2 μ M (concentration urémique, EV Hu) pendant 24 heures. L'expression génique de (A) IL-6, (B) IL-1 β et (C) TNF- α a été quantifiée par RT-qPCR et normalisée par l'expression de l'ARNm de la β -actine. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicate (n=4).

3. Effets des EVs de macrophages traités avec de l'homocystéine sur le stress oxydant de CMLV

Pour étudier les effets des EVs dérivées de macrophages traités avec de l'homocystéine sur le stress oxydant dans les CMLV, nous avons mesuré la production intracellulaire de ROS en utilisant la sonde fluorescente DCFH-DA. Comme le montre la **Figure 95**, les EVs dérivées de macrophages n'ont aucun effet sur la production de ROS dans les CMLV quel que soit le traitement des macrophages (**Figure 95**).

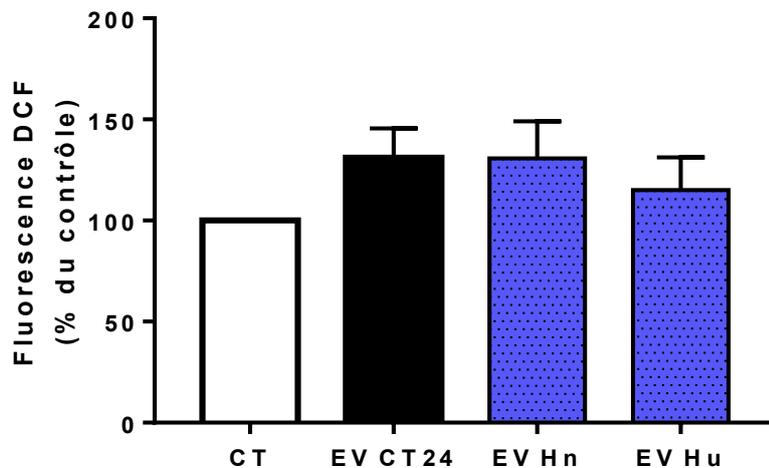


Figure 95 : Effets des vésicules extracellulaires (EVs) dérivées de macrophages sur la production de ROS dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).

Les CMLV ont été incubées avec 10 μM de DCFH-DA dans du PBS à 37°C pendant 30 minutes, puis traitées avec les EVs dérivées de macrophages non traités (EV CT24) ou traités avec de l'homocystéine à une concentration de 10,5 μM (concentration normale, EV Hn) ou 45,2 μM (concentration urémique, EV Hu) pendant 24 heures. La production des ROS est déterminée par une mesure de la fluorescence du DCF (λEx 492 nm, λEm 535 nm). La production des ROS de cellules non traitées (CT) est rapportée à 100 %. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicate ($n=4$).

De plus, les EVs dérivées de macrophages traités à l'homocystéine n'ont pas d'effet sur l'expression des ARNm des marqueurs du stress oxydant (SOD-1, SOD-2, iNOS, Nox2, Nrf2, Keap1) dans les CMLV (**Figure 96**).

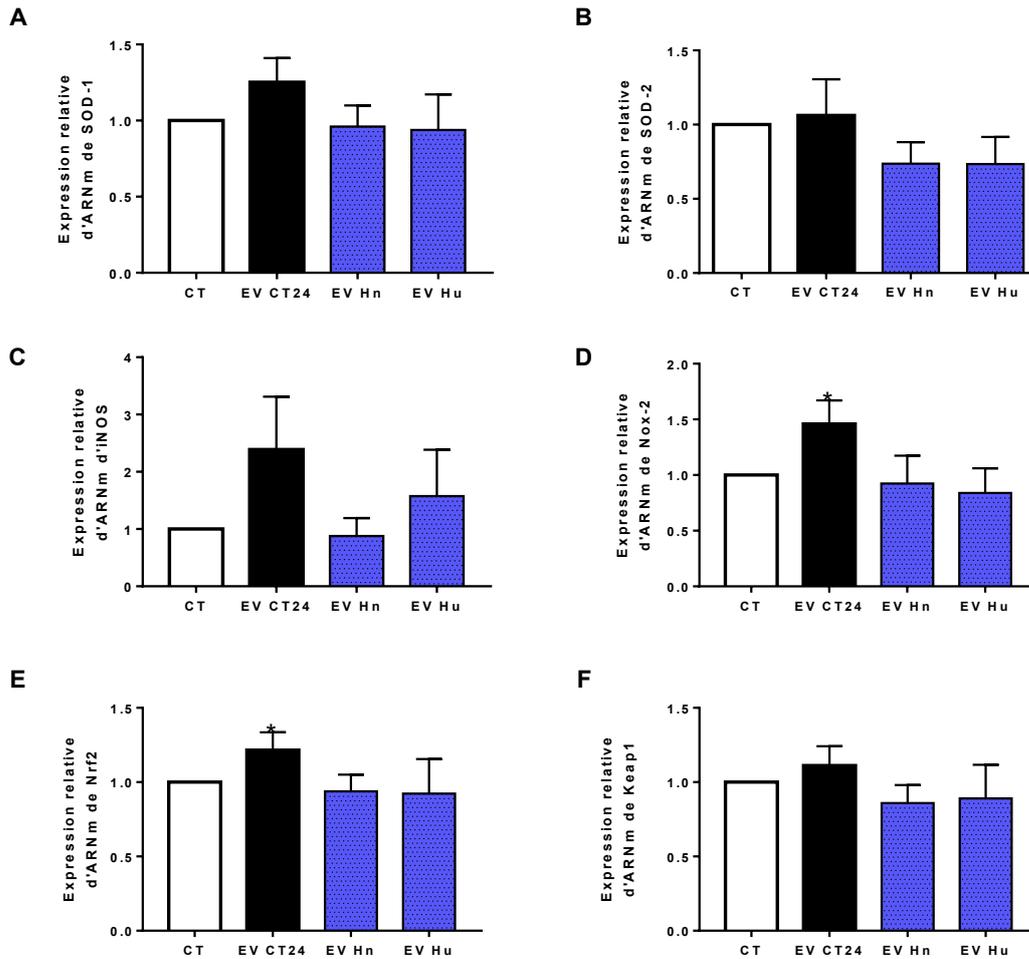


Figure 96 : Effets des vésicules extracellulaires (EVs) de macrophages sur l'expression génique des marqueurs du stress oxydant des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).

Les CMLV ont été incubées avec les EVs de macrophages non traités (EV CT24) ou traités avec de l'homocystéine à une concentration de 10,5 μM (concentration normale, EV Hn) ou 45,2 μM (concentration urémique, EV Hu) pendant 24 heures. L'expression génique de (A) SOD-1, (B) SOD-2, (C) iNOS, (D) Nox-2, (E) Nrf2, (F) Keap1 a été quantifiée par RT-qPCR et normalisée par l'expression de l'ARNm de la β -actine. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicate ($n=4$). * $p < 0,05$ vs. CT ; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

4. Les EV Hu augmentent la calcification induite par le Pi via un switch ostéogénique des CMLV

Pour analyser les effets des EVs dérivées de macrophages sur la calcification des CMLV, les cellules MOVAS ont été traitées pendant 14 jours avec 4 mM de Pi et les EVs dérivées de macrophages. Une augmentation significative de la concentration de calcium intracellulaire est observée après un traitement de 14 jours des CMLV avec du Pi et des EV Hu par rapport aux cellules traitées uniquement avec du Pi (* $p < 0,05$ vs. Pi (4mM), **Figure 97**).

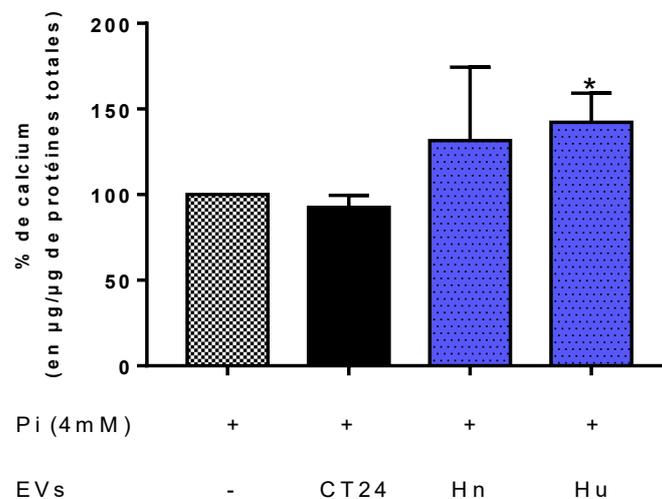


Figure 97 : Effets des vésicules extracellulaires (EVs) de macrophages sur la calcification de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).

La calcification des CMLV est induite par ajout de 4 mM de phosphate inorganique (Pi) dans le milieu pendant 14 jours. Les cellules sont également mises en présence d'EVs de macrophages non traités (EV CT24) ou traités avec de l'homocystéine à une concentration de 10,5 µM (concentration normale, EV Hn) ou 45,2 µM (concentration urémique, EV Hu). La calcification des CMLV est ensuite analysée en réalisant un dosage calcium à l'o-crésolphthaléine. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicate (n=4). * $p < 0,05$ vs. Pi (4mM) ; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Nous nous sommes également intéressés aux effets de l'homocystéine seule sur la calcification des CMLV. En effet, nous pouvons supposer que l'homocystéine transportée dans les EVs exerce un effet pro-calcifiant sur les CMLV. Dans notre modèle, l'homocystéine n'induit pas la calcification des CMLV (**Figure 98A**). De plus, l'homocystéine n'a pas d'effet sur la calcification des CMLV induite au Pi (**Figure 98B**). Nous pouvons donc exclure que les effets des EV Hu soient dus à la présence d'homocystéine dans les EVs puisque l'homocystéine seule avec ou sans le Pi n'a aucun effet sur la calcification des CMLV.

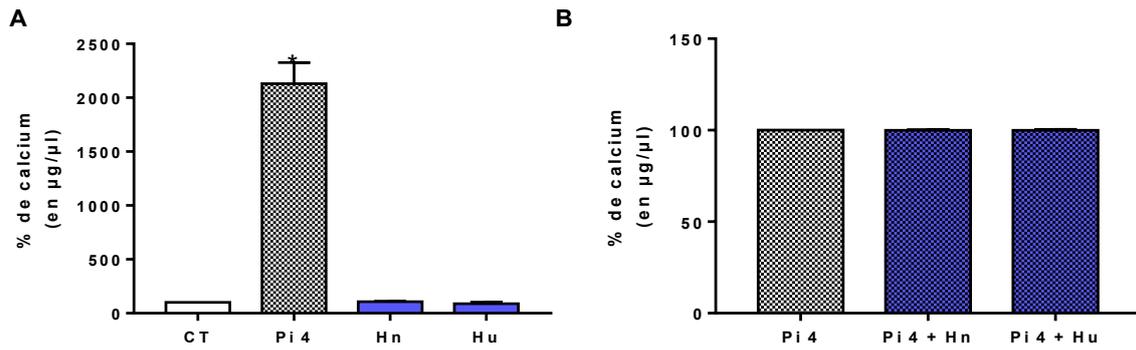


Figure 98 : Effets de l'homocystéine sur la calcification des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).

(A) Les CMLV sont traitées pendant 14 jours avec 4 mM de phosphate inorganique (Pi 4) ou de l'homocystéine à une concentration de 10,5 μM (Hn, concentration normale) ou 45,2 μM (Hu, concentration urémique). (B) Les CMLV sont traitées pendant 14 jours avec 4 mM de phosphate inorganique et de l'homocystéine à la concentration normale (Pi 4 + Hn) ou à la concentration urémique (Pi 4 + Hu). La calcification des CMLV est ensuite analysée en réalisant un dosage calcium à l'o-crésolphthaléine. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicate (n=4). * $p < 0,05$ vs. CT ; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

De plus, une diminution significative de l'expression des ARNm de MGP, inhibiteur de la calcification, est observée après 7 jours de traitement des CMLV avec du Pi et les EV Hu par rapport aux cellules traitées uniquement avec du Pi (** $p < 0,01$ vs. Pi (4mM) ; **Figure 99**).

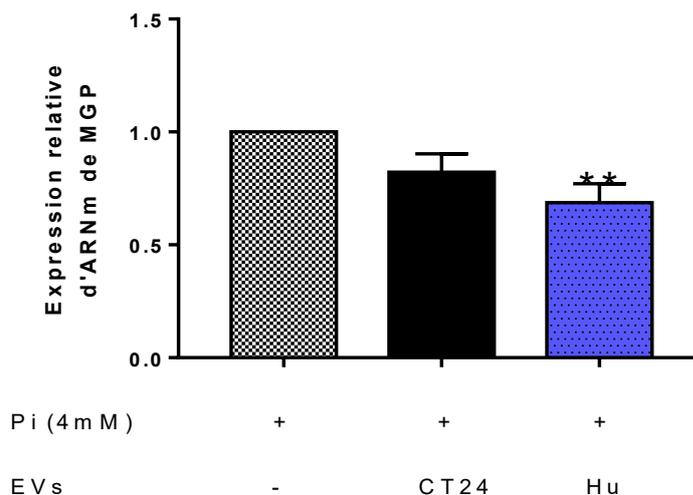


Figure 99 : Effets des vésicules extracellulaires (EVs) de macrophages sur l'expression génique de la protéine Gla de la matrice (MGP) dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).

Les CMLV ont été incubées avec 4 mM de phosphate inorganique (Pi) avec ou sans les EVs de macrophages pendant 7 jours. L'expression génique de MGP a été quantifiée par RT-qPCR et normalisée par l'expression de l'ARNm de la β -actine. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM de 6 expériences indépendantes réalisées en triplicate ($n=6$). ** $p < 0,01$ vs. Pi (4mM) ; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

L'expression des ARNm de différents marqueurs ostéogéniques (BMP-2, Osx et OCN) est significativement augmentée après traitement des CMLV avec du Pi et les EV Hu par rapport aux CMLV traitées uniquement avec du Pi (* $p < 0,05$ vs. Pi (4mM) ; **Figure 100A, B, C**). Dans les mêmes conditions, l'expression des ARNm du marqueur contractile α -SMA est significativement diminuée par rapport aux CMLV traitées uniquement au Pi (* $p < 0,05$ vs. Pi (4mM) ; **Figure 100D**). Nous nous sommes également intéressés aux effets des EVs de macrophages sur l'expression de marqueurs synthétiques SMemb (*smooth muscle myosin heavy chain*) et vimentine (VIM) dans les CMLV. En effet, lors de la CV, les CMLV se différencient plutôt vers un phénotype ostéogénique qu'un phénotype synthétique. Dans notre modèle, l'expression génique de SMemb et VIM est significativement diminuée par rapport aux CMLV traitées uniquement au Pi (* $p < 0,05$ vs. Pi (4mM) ; **Figure 100E et F**).

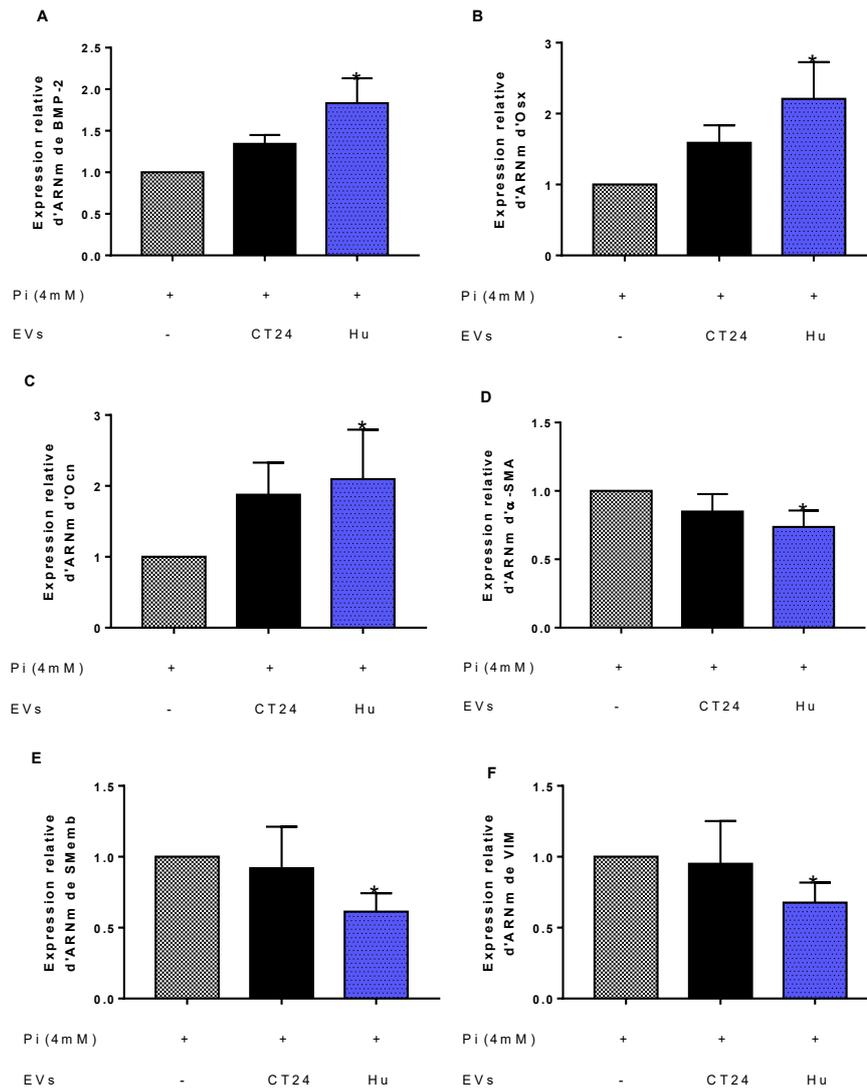


Figure 100 : Effets des vésicules extracellulaires (EVs) de macrophages sur l'expression génique de marqueurs ostéogéniques, contractile et synthétiques des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV).

Les CMLV ont été incubées avec 4 mM de phosphate inorganique (Pi) avec ou sans les EVs de macrophages pendant 7 jours. L'expression génique de (A) BMP-2, (B) Osx, (C) OCN, (D) α -SMA, (E) SMemb et (F) VIM a été quantifiée par RT-qPCR et normalisée par l'expression de l'ARNm de la β -actine. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes réalisées en triplicate ($n=4$). * $p < 0,05$ vs. Pi (4 mM) ; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney.

En conclusion, nos résultats montrent que les EV Hu aggravent la CV non seulement en induisant un switch ostéogénique des CMLV mais également en diminuant l'expression de l'inhibiteur de calcification MGP.

5. Analyse du contenu protéique des EVs sécrétées par les macrophages après traitement avec l'homocystéine

Afin d'élucider le mécanisme d'action des EV Hu dans l'aggravation de la calcification des CMLV, nous avons analysé le contenu protéique et inflammatoire des EVs de macrophages après traitement avec de l'homocystéine. Nous avons bien détecté, par spectrométrie de masse, des protéines spécifiques d'EVs confirmant ainsi la présence d'EVs dans nos échantillons comme c'était le cas précédemment en présence de LPS-EK (**Tableau 6**).

Nous avons ensuite réalisé une analyse hiérarchique des clusters afin de comparer le contenu protéique des EVs dans nos différentes conditions expérimentales. Cette analyse est une approche pour l'exploration multivariée des données qui permet ainsi d'identifier des groupes de profils similaires ou au contraire différents. La **Figure 101** montre le profil des 23 protéines les plus discriminantes (lignes) en fonction des conditions expérimentales (colonnes). Comme attendu, les réplicats de chaque condition sont regroupés ensemble (**Figure 101**). Cette analyse montre une séparation claire du profil protéique des différentes préparations d'EVs (**Figure 101**). Nous distinguons ainsi 3 clusters protéiques appartenant à la condition contrôle (EV CT24), à la condition de concentration d'homocystéine normale (EV Hn) et à la condition de concentration d'homocystéine urémique (EV Hu) (**Figure 101**). De façon intéressante, nous pouvons observer un profil protéique intermédiaire dans les EV Hn (**Figure 101**).

En étudiant plus précisément cette analyse, la **Figure 101** montre une variation significative de l'expression des 23 protéines entre les EV Hu par rapport aux EV CT24 (**Figure 101**). Parmi les 23 protéines, seules 2 protéines sont significativement augmentées : la protéine tyrosine kinase Fgr et l'intégrine $\beta 2$ (**Figure 101**). L'expression des 21 autres protéines est au contraire significativement diminuée dans les EV Hu par rapport aux EV CT24 (**Figure 101**).

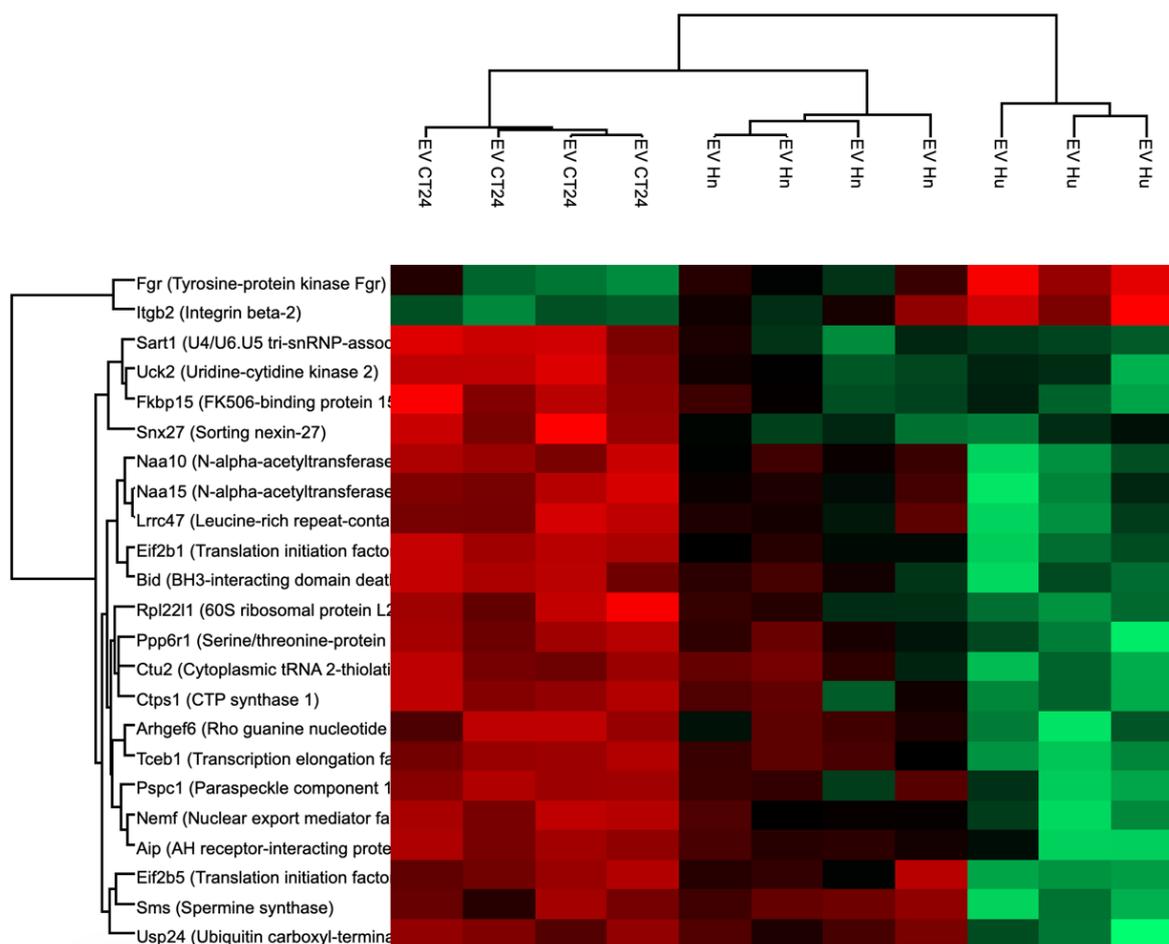


Figure 101 : Heatmap et dendrogramme montrant l'expression relative des 23 protéines les plus discriminantes et le clustering respectif des protéines quantifiées.

Les EVs ont été récoltées à partir du milieu de culture des macrophages non traités (EV CT24) ou traités avec de l'homocystéine à une concentration de 10,5 μM (concentration normale, EV Hn) ou 45,2 μM (concentration urémique, EV Hu) pendant 24 heures. Une analyse par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) couplée à la spectrométrie de masse a été réalisée. L'analyse hiérarchique des clusters montrent l'expression relative des 23 protéines les plus discriminantes entre les différentes conditions expérimentales. La normalisation du Z-score de l'abondance des protéines est signalée par une échelle de couleur avec le vert indiquant les protéines moins exprimées et le rouge les protéines plus exprimées.

Nous avons ensuite analysé l'expression de 10 cytokines pro-inflammatoires dans les EVs sécrétées par les macrophages traités ou non à l'homocystéine en utilisant un kit de dosage multiplex de chez MSD (**Annexe 1**). L'homocystéine n'a pas d'effet sur le contenu en cytokines pro-inflammatoires des EVs dérivées des macrophages traités avec de l'homocystéine (**Figure 102**).

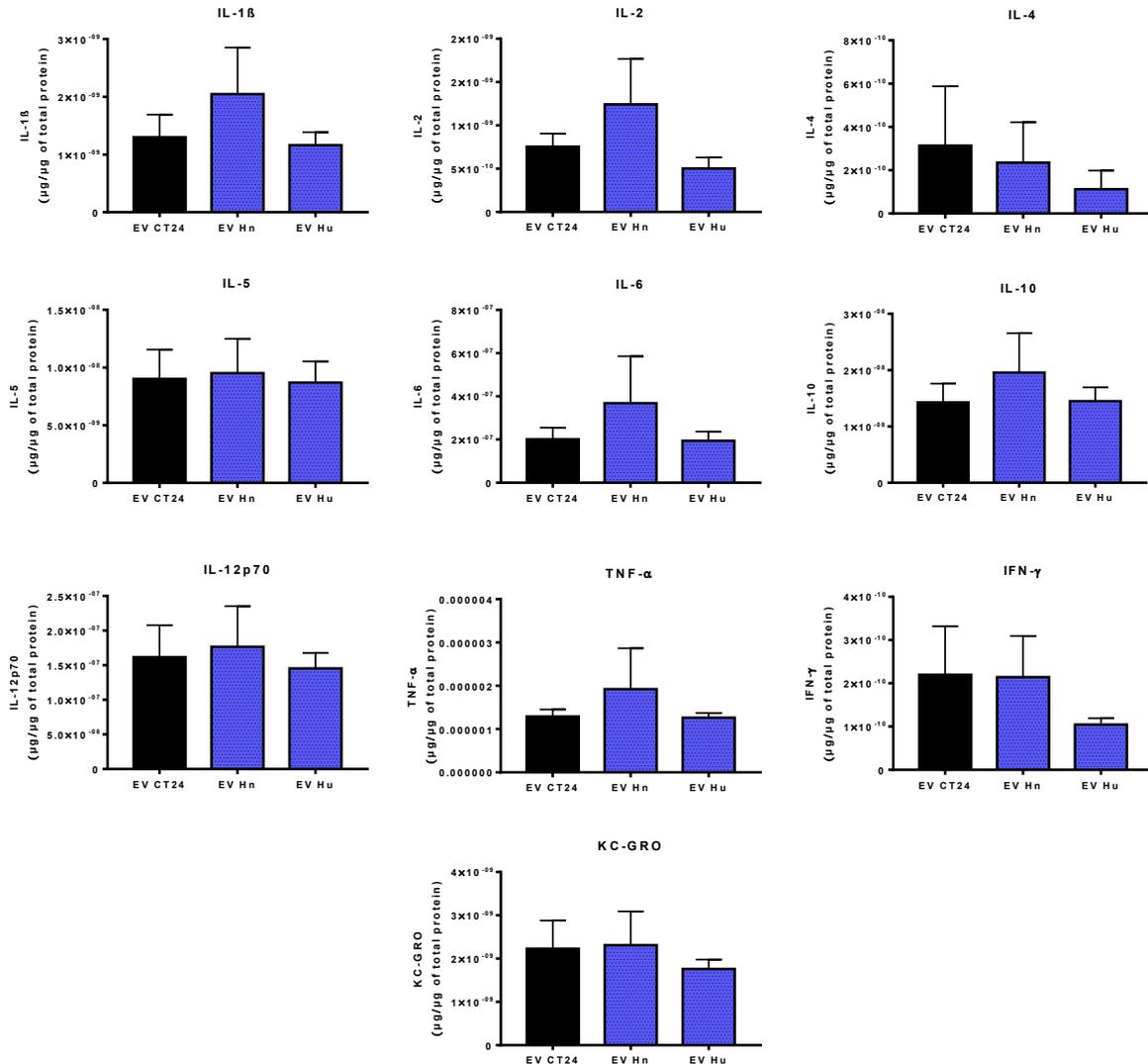


Figure 102 : Effets de l'homocystéine sur l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans les vésicules extracellulaires (EVs) dérivées des macrophages.

Les EVs ont été récoltées à partir du milieu de culture des macrophages non traités (EV CT24) ou traités avec de l'homocystéine à une concentration de 10,5 μM (concentration normale, EV Hn) ou 45,2 μM (concentration urémique, EV Hu) pendant 24 heures. L'expression protéique des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF- α , IFN- γ , KC-GRO) a été mesurée dans les EVs dérivées des macrophages en utilisant un kit de dosage multiplex.

L'aggravation de la CV observée dans les CMLV serait donc due à une modification du contenu protéique des EVs.

Discusión

La calcification vasculaire (CV) est un processus complexe impliquant différents mécanismes cellulaires et moléculaires tels que le switch ostéogénique des CMLV, la perte d'expression des inhibiteurs de la CV, l'apoptose, la dérégulation de l'homéostasie Ca^{2+}/Pi ou encore la dégradation et la modification de la matrice extracellulaire [233].

L'insuffisance rénale chronique (IRC) et le déséquilibre de la balance minérale sont responsables d'une augmentation de la calcification [234] et du relargage d'EVs. Il a d'ailleurs été mis en évidence un nombre plus élevé d'EVs chez les patients atteints d'IRC et de CV [152]. De plus, différentes études *in vivo* ont montré que les EVs provenant de différents types cellulaires tels que les cellules endothéliales [159], les CMLV [152] ou les macrophages [235] sont des promoteurs de la calcification chez les patients atteints d'IRC [154]. Par exemple, Soriano *et al.* ont ainsi montré que les microvésicules endothéliales de patients atteints d'IRC pouvaient induire l'expression du marqueur ostéogénique OCN dans des EPCs, des CMLV et des fibroblastes, avec un effet plus important des EVs dérivées de patients IRC atteints de CV [152]. Viegas *et al.* ont aussi démontré que les EVs provenant de patients atteints d'IRC au stade 5 induisaient la CV *via* une réponse inflammatoire et une différenciation ostéochondrogénique des CMLV [154]. Il a également été montré que les exosomes dérivés de CMLV de rats IRC contenaient moins de fetuin-A, un inhibiteur de la calcification, et pouvaient induire la calcification de CMLV *via* l'activation des voies de signalisation Nox-1, MEK1 et Erk1/2 [162].

Ces différentes études ont ainsi mis en évidence un rôle majeur des EVs dérivées des cellules endothéliales et des CMLV dans le processus de CV au cours de l'IRC. Cependant, les macrophages et leurs EVs sécrétées semblent également jouer un rôle important dans ce processus [236]. Les macrophages représentent une des principales sources d'inflammation et de stress oxydant [237] qui est associée à la calcification artérielle au cours de l'IRC [238]. Aikawa *et al.* avaient par ailleurs montré par imagerie une co-localisation des calcifications et des macrophages dans des plaques athérosclérotiques de souris déficientes en apolipoprotéines E suggérant ainsi un rôle important de ces cellules et de l'inflammation dans la calcification [239]. Enfin, plus récemment, il a été montré que la polarisation des macrophages vers le phénotype M1 conduit à une inflammation chronique *via* la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6...) qui favorisent la différenciation des CMLV en cellules ostéogéniques [236]. D'autres études plus récentes ont identifié les EVs dérivées des macrophages comme des médiateurs de CV [167,168,240].

Dans notre projet de recherche, nous avons émis l'hypothèse que les EVs sécrétées par les macrophages dans des conditions pro-inflammatoires et pro-oxydantes augmenteraient la calcification des CMLV *via* la propagation de l'inflammation et du stress oxydant. Pour tester notre hypothèse, nous avons incubé une lignée cellulaire murine de CMLV avec des EVs dérivées de macrophages murins traités avec du LPS-EK ou avec l'homocystéine, toxine urémique accumulée chez les patients IRC. Nous avons ensuite analysé les effets des EVs dérivées de ces macrophages sur la calcification et l'expression de marqueurs ostéogéniques, inflammatoires et de stress oxydant dans les CMLV. Nous avons également analysé le contenu protéique et le profil inflammatoire des EVs sécrétées par les macrophages traités ou non.

Partie 1 : LPS-EK

Les patients atteints d'IRC présentent une endotoxémie élevée et notamment une augmentation des concentrations sériques de LPS favorisant ainsi l'activation de réponses immunitaires innées et donc le maintien d'un état pro-inflammatoire [63]. C'est pourquoi, nous avons choisi d'utiliser le modèle de cellules RAW 264.7 traitées au LPS, modèle qui est couramment utilisé dans la littérature, afin d'étudier les mécanismes d'inflammation et de stress oxydant [229]. Nous avons dans un premier temps analysé l'effet du LPS-EK sur la viabilité des macrophages. Dans notre modèle, un traitement de 24 heures des macrophages avec le LPS-EK induit une cytotoxicité de 25%. Les cellules RAW sont connues pour être particulièrement sensibles au LPS [241] ce qui peut expliquer l'inhibition de la croissance cellulaire observée dans notre expérience. Nous avons par conséquent traité les macrophages avec le LPS-EK à des temps plus courts (6h). Après avoir vérifié l'absence de toxicité cellulaire, nous avons opté pour ces conditions pour la suite de nos expériences.

L'induction d'une réponse inflammatoire après traitement des macrophages avec le LPS-EK a été mise en évidence par l'augmentation significative de l'expression génique et protéique des cytokines pro-inflammatoires mesurée par RT-qPCR et par le kit multiplex MSD respectivement. Ces résultats sont tout à fait concordants avec les résultats obtenus dans la littérature [242]. En effet, le LPS-EK active le récepteur TLR4 par deux voies dépendantes ou non de la protéine de réponse primaire de différenciation myéloïde 88 (MyD88) [242]. La voie MyD88-dépendante permet la transcription de gènes codants pour des cytokines pro-inflammatoires tandis que la voie MyD88-indépendante permet la production d'interférons [242]. Comme décrit dans la littérature [243], nous avons également mis en évidence une augmentation significative de l'expression génique de NLRP3 après traitement des

macrophages avec le LPS-EK. NLRP3 est une protéine activatrice de l'inflammasome qui permet le clivage protéolytique de la pro-caspase-1 en caspase-1 active capable de convertir le pro-IL-1 β et pro-IL-18 en IL-1 β et IL-18, formes biologiquement actives [243]. Nos résultats montrent que le LPS-EK induit une polarisation M1 pro-inflammatoire des cellules RAW, résultat en accord avec l'étude de Li *et al.* dans une lignée de monocytes U937 [244].

Nous avons également montré que le LPS-EK induit un stress oxydant dans les macrophages avec tout d'abord une augmentation significative de la production de ROS comme décrit dans la littérature [245]. En parallèle, nous avons aussi mis en évidence une diminution significative de l'expression des gènes du système antioxydant Nrf2/Keap1 après traitement des macrophages avec le LPS-EK. Nrf2 est un facteur de transcription permettant d'induire la transcription de gènes antioxydants [246]. En conditions basales, Keap1 forme un complexe avec Nrf2 ce qui entraîne sa dégradation par le protéasome [246]. En conditions de stress oxydant, la modification de résidus cystéines sur la protéine Keap1 inhibe son interaction avec Nrf2 [246]. Ceci permet alors la translocation nucléaire de Nrf2 qui peut alors exercer son rôle de facteur de transcription et permettre de protéger la cellule face à un excès de production de ROS [246]. La diminution d'expression génique de Keap1 observée dans notre modèle peut être expliquée par l'induction d'un mécanisme de défense mis en place par la cellule afin de favoriser la stabilisation de Nrf2 pour pallier l'induction de ROS. En revanche, la diminution de l'expression génique de Nrf2 pourrait s'expliquer par l'induction d'un stress oxydant important entraînant une impossibilité de la cellule à y faire face. Il est également important de souligner que ce résultat ne reflète pas l'activité de ce facteur de transcription. En effet, il serait intéressant d'analyser la translocation nucléaire de Nrf2 ou l'expression protéique de Nrf2 au niveau cytosolique et nucléaire. Malgré une augmentation du stress oxydant, nous avons mis en évidence une diminution de la production de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) due à la fois à la diminution de sa synthèse par Nox-2 et à une augmentation de sa dégradation par SOD2. Ce résultat est surprenant car il est décrit que le LPS augmente la production d' $O_2^{\cdot-}$ dans les macrophages [247,248]. Cependant, cette diminution de $O_2^{\cdot-}$ peut s'expliquer par le couplage rapide de l' $O_2^{\cdot-}$ avec le NO formant ainsi du peroxynitrite ONOO-, molécule pouvant médier en retour des réponses oxydantes importantes [249]. En effet, une diminution de la production de NO a été observée malgré une augmentation de l'expression génique de l'iNOS, enzyme permettant la production de NO, comme décrit dans la littérature [250].

Nous avons ensuite étudié les effets du LPS-EK sur la biogenèse des EVs et montré que le LPS-EK inhibait la biogenèse des EVs en diminuant de façon significative l'expression génique de SMPD3, de phospho-1, de TNAP et l'activité AChE, inhibition confirmée par la réduction de la quantité d'EVs détectée par NTA. Ces résultats sont en accord avec la littérature [251,252] et notamment l'étude de Liu *et al.* qui a montré que le LPS diminuait l'expression de SMPD3 dans les macrophages RAW [251]. L'autophagie jouant un rôle important dans la biogenèse des EVs, nous avons étudié les effets du LPS-EK sur des marqueurs de l'autophagie. Dans notre modèle cellulaire, le LPS-EK diminue également de manière significative l'expression des marqueurs autophagiques et augmente significativement l'expression génique de la protéine p62. Ces résultats sont concordants avec la littérature car il a été montré que la protéine p62 s'accumule lors d'une inhibition des mécanismes d'autophagie [231]. De façon intéressante, une étude a mis en évidence un lien entre l'autophagie et la polarisation des macrophages [253]. L'inhibition de l'autophagie favoriserait la polarisation des macrophages vers un phénotype M1 pro-inflammatoire [253], phénotype que nous observons dans nos cellules après traitement avec le LPS-EK. L'autophagie étant également connue pour être liée à la biogenèse des EVs [230], nous pouvons supposer que le LPS-EK induit une inhibition de ces deux mécanismes. Ces résultats pourraient être expliqués par l'induction d'un mécanisme de protection mis en place par les cellules afin d'éviter la propagation de l'inflammation et du stress oxydant *via* la sécrétion d'EVs. Zhao *et al.* ont aussi montré que l'autophagie contribuait à l'homéostasie redox, et ce, de façon antioxydante non seulement par la clairance de composants cellulaires oxydés, mais également en promouvant les défenses antioxydantes *via* la voie p62/Keap1/Nrf2 [254]. Par conséquent, une déficience en autophagie comme observée dans notre modèle cellulaire, diminuerait les défenses antioxydantes ce qui pourrait également expliquer l'augmentation du stress oxydant observée.

Les résultats obtenus grâce à la TEM et au NTA nous ont permis de mettre en évidence que nos préparations d'EVs étaient principalement enrichies en exosomes et en microvésicules et la cryo-EM a confirmé l'intégrité des membranes des EVs. Cette caractérisation a été confirmée par la présence dans nos échantillons de tétraspanines membranaires (CD9, CD81), de la β -actine, d'une activité AChE et de protéines spécifiques d'EVs mis en évidence par l'étude protéomique.

De façon intéressante, nos résultats montrent que les EVs produites par les macrophages inflammatoires (EV LPS) ont la capacité d'induire une réponse inflammatoire dans les CMLV avec une augmentation significative de l'expression génique des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1 β et TNF- α). L'étude du profil inflammatoire des EVs sécrétées montre que les EVs LPS étaient enrichies en cytokines pro-inflammatoires notamment IL-6, IL-1 β et TNF- α , résultat cohérent avec la polarisation M1 des cellules RAW après traitement avec le LPS-EK. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Li *et al.* qui a montré que le milieu conditionné des macrophages traités par le LPS contenait de l'IL-6 et du TNF- α [244]. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que les cytokines pro-inflammatoires des macrophages M1 sont transportées par les EVs sécrétées par ces cellules et induisent un état pro-inflammatoire dans les cellules réceptrices telles que les CMLV. Différentes études ont d'ailleurs montré que les cytokines inflammatoires ont des effets biologiques sur les CMLV [255]. Par exemple, Barillari *et al.* ont montré que l'IL-1 β , le TNF- α et l'IFN- γ sécrétés par des cellules immunitaires activées augmentent l'expression de l'intégrine α 5 β 1, un récepteur de la fibronectine, conduisant à une augmentation de la prolifération et de la migration des CMLV, deux mécanismes nécessaires à la formation des lésions d'athérosclérose [256].

Ces EVs induisent également un stress oxydant avec une augmentation significative de la production de ROS. Cependant, les EVs provenant des macrophages contrôles (EV CT6) augmentent aussi la production de ROS dans les CMLV. Il est important de souligner que nous avons traité les CMLV avec le même volume d'échantillon d'EVs. Or, nous avons mis en évidence une diminution du nombre de particules dans les préparations EV LPS. Nous avons donc sûrement traité les CMLV avec un nombre plus important d'EV CT6 et les effets observés des EV LPS sont donc probablement sous-estimés. Nous avons également mis en évidence une augmentation significative de l'expression génique des marqueurs SOD-1, SOD-2, Nrf2 et Keap1 après traitement des CMLV avec les macrophages traités au LPS-EK. Les enzymes SOD-1 et SOD-2 impliquées dans la dégradation de l'O₂⁻ ainsi que Nrf2 représentent de puissants acteurs du système de défense antioxydant [257]. Les CMLV stimulent probablement la transcription de ces gènes pour faire face à la production de ROS induite par les EV LPS. L'augmentation de l'expression génique de Keap1 pourrait être expliquée par un mécanisme d'autorégulation de la cellule afin de palier à la surexpression de Nrf2.

Ces résultats confirment donc notre hypothèse, à savoir que les EVs sécrétées dans des conditions pro-inflammatoires et pro-oxydantes sont capables de propager l'inflammation et le stress oxydant dans des cellules environnantes telles que les CMLV.

Cette propagation influence la calcification puisque nous avons montré que ces EVs augmentaient significativement la calcification des CMLV induite par le Pi pendant 14 jours ou pendant les 7 derniers jours de l'induction de la calcification par le Pi. Le LPS seul n'ayant aucun effet sur la calcification des CMLV permet d'exclure que les effets des EV LPS soient dus à la présence de LPS dans les EVs. Cette augmentation de la calcification serait vraisemblablement due à la diminution de l'inhibiteur de calcification MGP et à l'induction d'un switch ostéogénique des CMLV observées dans nos expériences. D'ailleurs, de façon similaire, l'étude de Li *et al.* a montré que le milieu conditionné de macrophages traités avec du LPS induisait un switch ostéogénique des cellules interstitielles valvulaires en augmentant l'OPN, le BMP-2 et l'ALP [244]. De plus, cette étude a montré que l'augmentation de l'IL-6, l'IL-1 β et le TNF- α dans le milieu conditionné est associée avec une augmentation de la production de MMP qui contribuent à la dégradation de la matrice extracellulaire, le remodelage et la calcification valvulaire [244].

L'étude protéomique a permis d'identifier trois protéines (CAD, PAI-1 et Saa3) surexprimées dans les EV LPS par rapport aux EV CT6. La **cis-aconitate décarboxylase (CAD)**, une enzyme mitochondriale codée par le gène *Irg1* et impliquée dans la production d'itaconate, est connue pour être surexprimée en conditions pro-inflammatoires dans les macrophages [258–261]. L'itaconate possède des propriétés immunorégulatrices et antioxydantes [261–264]. Cependant, une étude a également identifié l'itaconate comme activateur de la production d'IL-1 β lorsqu'il est administré à haute dose dans des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse [265]. De plus, la production de ROS peut être médiée *via* l'induction de l'expression d'*Irg1* [266]. Dans notre étude, les EV LPS étaient enrichies en protéines CAD, nous pouvons donc supposer que cette enzyme permet une production importante d'itaconate dans les CMLV conduisant ainsi à l'induction d'une réponse inflammatoire et oxydante, qui pourrait à son tour induire la calcification.

Nous avons également mis en évidence une surexpression de **l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1 (PAI-1)** dans les EV LPS. Tout d'abord, différentes études ont mis en évidence une augmentation de l'expression du PAI-1 dans des cellules traitées au LPS [267,268] mais également un rôle immunorégulateur du PAI-1 *via* la voie de signalisation du TLR4 [269]. Une augmentation de l'expression du PAI-1 est également observée en conditions de stress oxydant [270]. La surexpression de la protéine PAI-1 retrouvée dans les EV LPS peut donc être expliquée par l'activation des macrophages par le LPS-EK. De plus, il a été montré dans de nombreuses études que la protéine PAI-1 était associée à la présence

d'athérosclérose. En effet, PAI-1 est augmentée dans les artères coronaires de patients atteints d'athérosclérose [271–274]. Cette protéine est également surexprimée chez les patients atteints d'IRC par rapport aux individus sains [275]. Une corrélation positive a été observée entre l'expression du PAI-1 et la concentration calcique de 65 valves aortiques calcifiées indiquant donc que PAI-1 est liée à la CV [276]. Enfin, l'expression du PAI-1 est aussi positivement corrélée à l'épaisseur de la média vasculaire [275]. Le PAI-1 contenu dans les EV LPS pourrait donc participer à l'aggravation du processus de CV observée dans nos conditions expérimentales.

Enfin, la **protéine sérum amyloïde A-3 (Saa3)**, également augmentée dans les EV LPS, fait partie de la famille des apolipoprotéines associées aux HDL dans le plasma. Comme la protéine CAD et le PAI-1, la protéine Saa3 est surexprimée après traitement au LPS [277,278]. Différentes études ont identifié des rôles similaires entre les cytokines et les protéines Saa avec notamment des capacités à activer plusieurs récepteurs comme les TLR ou des facteurs de transcription tels que NF- κ B [279]. De plus, les protéines Saa sont impliquées dans les mécanismes de CV [280–282]. En effet, ces molécules sont capables d'induire la production de cytokines pro-inflammatoires et la différenciation ostéogénique de CSM *via* l'activation du récepteur TLR4 [280]. Zhang *et al.* ont également montré que les protéines Saa peuvent induire un changement ostéogénique des CMLV *via* l'activation de la voie de signalisation p38 MAPK [281]. Les protéines Saa augmentent également l'entrée de calcium dans les CMLV d'artères coronaires humaines [282]. Nous pouvons donc supposer que la protéine Saa3 transportée par les EV LPS augmente l'entrée de Pi dans les CMLV favorisant ainsi le switch ostéogénique des CMLV et l'aggravation de la CV.

En conclusion de cette première partie, nos résultats montrent que les EV LPS sont enrichies en protéines impliquées dans l'inflammation, le stress oxydant et aggravent les mécanismes de CV dans les CMLV et notamment les microcalcifications.

Partie 2 : Homocystéine

Lors de l'IRC, la fonction rénale diminue et des toxines urémiques telles que l'homocystéine s'accumulent chez les patients. L'hyperhomocystéinémie favorise le maintien d'un état pro-inflammatoire et pro-oxydant chez les patients IRC [85]. De plus, l'hyperhomocystéinémie représente un facteur de risque de progression vers des stades sévères de CV [283]. Nous nous sommes donc intéressés aux effets de l'homocystéine sur les macrophages et le rôle des EVs sécrétées par ces macrophages sur la calcification des CMLV.

Nos résultats montrent, d'une part, que l'homocystéine ne présente pas de toxicité sur la viabilité cellulaire des macrophages mais a plutôt un effet prolifératif dose dépendant. Ces résultats sont concordants avec ceux rapportés dans la littérature, sur un autre type cellulaire, les CMLV, et qui montrent que l'homocystéine augmentait la prolifération des cellules *via* une régulation de l'expression des cyclines A et D1 [284]. D'autre part, nos résultats montrent que, contrairement au traitement avec le LPS-EK, seule une augmentation significative de l'expression génique de l'IL-6 a été observée après traitement des macrophages avec de l'homocystéine à la concentration urémique en comparaison aux macrophages non traités. Ces résultats sont sensiblement contradictoires avec la littérature. En effet, une augmentation significative de l'expression des cytokines IL-1 β et TNF- α après traitement des macrophages RAW avec de l'homocystéine à une concentration de 5 mM pendant 1 heure [285] ou 100 μ M pendant 24 heures [286] a été précédemment publiée. De plus, Winchester *et al.* ont montré que les macrophages RAW traités avec de l'homocystéine à une concentration de 500 μ M pendant 24 heures adoptent un phénotype M1 pro-inflammatoire [287]. Les auteurs ont mis en évidence une surexpression des MMP-9, du marqueur du phénotype M1 CD40 et de la protéine *ECM metalloproteinase inducer* (EMMPRIN) induite par des facteurs pro-inflammatoires tels que l'IL-18 [287]. Il est toutefois important de noter que lors de nos expérimentations, nous avons utilisé des concentrations d'homocystéine (10,5 μ M et 45,2 μ M) à savoir 10 fois plus faibles que celles choisies dans les études citées précédemment car ces concentrations se rapprochent davantage des conditions cliniques retrouvées chez les patients et définies dans la base de données d'EUTox. Nous pouvons supposer que la lignée de macrophages que nous avons utilisée est moins sensible à l'induction d'une réponse inflammatoire par des concentrations d'homocystéine aussi faibles.

Nous avons également montré que l'homocystéine induit dans les macrophages un stress oxydant *via* une augmentation de la production des ROS, ce qui corrobore avec la littérature [285,287]. Cet effet est d'autant plus marqué à la concentration normale qu'à la concentration urémique ce qui suggère que la cellule n'induit pas de mécanismes de défense antioxydante à la concentration la plus faible d'homocystéine et donc une production plus importante de ROS à cette concentration. Dans la littérature, il a été démontré une augmentation de la production d'O₂⁻ après traitement de macrophages avec l'homocystéine [288]. Cependant, dans notre étude, comme pour le LPS-EK, l'homocystéine induit au contraire une diminution de la production d'O₂⁻ qui peut s'expliquer par la diminution de Nox-2. Nous avons également mis en évidence une diminution de la production de NO après traitement des macrophages avec

l'homocystéine sans variation d'expression génique d'iNOS. Tout comme pour le LPS-EK, nous pouvons supposer que la production de NO et d'O₂^{•-} est diminuée pour permettre la production de peroxy-nitrite, molécule ayant des propriétés pro-oxydantes.

L'ensemble de nos résultats montrent donc que l'homocystéine induit un stress oxydant dans les macrophages et une augmentation de l'expression génique de l'IL-6 aux conditions expérimentales définies dans notre étude.

Nous avons ensuite étudié l'effet de l'homocystéine sur l'autophagie et la biogenèse des EVs de macrophages car ces deux mécanismes partagent des voies moléculaires similaires [27]. Comme pour le LPS-EK, nous avons ainsi mis en évidence une diminution de l'expression génique des marqueurs d'autophagie (Atg5, Beclin-1, ULK1 et LC3b) et une augmentation de l'expression génique de p62. Nous avons également mis en évidence une diminution de l'expression génique des marqueurs de biogenèse des EVs (SMPD3 et phospho-1) après traitement des macrophages avec l'homocystéine. De façon intéressante, Khayati *et al.* ont démontré que l'homocystéine est capable d'inhiber l'autophagie de neurones humains et murins conduisant à la production de protéines anormales [289]. Cependant, il a aussi été démontré une augmentation de la production de microvésicules après traitement d'HUVECs avec 50 µM d'homocystéine [144]. Tout comme le LPS-EK, nous pouvons supposer que dans nos conditions expérimentales, les macrophages induisent un mécanisme de défense afin d'éviter la propagation du stress oxydant *via* la production d'EVs.

L'étude par TEM et NTA des fractions d'EVs de macrophages traités ou non avec de l'homocystéine montrent, comme c'était le cas après exposition au LPS-EK, la présence d'exosomes et de microvésicules, ce qui a été confirmé par l'étude protéomique, par *Western Blot* (CD9, CD81 et β-actine) et une activité AChE augmentée. Concernant le NTA, nous avons mis en évidence une diminution du nombre de particules dans l'échantillon EV Hn et une légère augmentation dans l'échantillon EV Hu. Ces résultats peuvent être expliqués par l'induction d'un stress oxydant important après traitement des macrophages avec de l'homocystéine à la concentration normale favorisant ainsi l'induction d'un mécanisme de défense par la cellule *via* l'inhibition de la biogenèse d'EVs. Malgré l'absence d'effet de l'homocystéine à la concentration normale sur l'expression génique de SMPD3, marqueur de la biogenèse des exosomes, nous pouvons supposer une diminution du nombre de microvésicules et non d'exosomes. Il est toutefois important de rappeler que l'homocystéine possède un effet prolifératif sur les macrophages, pouvant sous-estimer les effets précédemment décrits et à l'inverse justifier l'augmentation du nombre d'EVs observée à la concentration urémique. Ces

EVs ne sont pas toxiques sur les CMLV mais entraînent une augmentation de leur prolifération. Or, nous avons démontré un effet prolifératif de l'homocystéine dans les macrophages. Il est possible que les EV Hn et EV Hu contiennent des molécules favorisant la prolifération cellulaire bien qu'il soit important de souligner également l'effet prolifératif des EV CT24 sur les CMLV laissant penser à une non-spécificité du traitement à l'homocystéine.

Malgré une absence d'effet des EV Hn et EV Hu sur l'expression génique des marqueurs d'inflammation, de stress oxydant et la production des ROS des CMLV, nous avons observé une aggravation de la calcification par induction d'un switch ostéogénique des CMLV et par une diminution significative de l'expression génique de l'inhibiteur de calcification MGP. Cet effet est intrinsèque aux EVs car l'homocystéine seule n'a aucun effet sur l'induction ou l'aggravation de la calcification des CMLV. Cela suggère donc que les EV Hu sont capables d'aggraver la calcification des CMLV *via* un mécanisme qui reste à élucider. Une piste envisageable pourrait être celle de la production d'IL-6 par les macrophages exposés à l'homocystéine. En effet, Kurozumi *et al.* ont récemment prouvé la contribution de l'IL-6 au développement de la CV lors de l'inflammation chronique en induisant une activation de l'expression de Runx2 conduisant à un switch ostéogénique de CMLV humaines [290]. En réduisant la transcription de STAT3, ils ont pu bloquer l'expression de l'IL-6 et réduire de façon drastique la calcification de ces cellules [290]. Une étude similaire devra être conduite sur notre modèle pour confirmer cette hypothèse.

Le contenu protéique des EVs a été étudié par spectrométrie de masse et nous avons ainsi mis en évidence une surexpression de 2 protéines dans les EV Hu en comparaison aux EV CT24 : **l'intégrine $\beta 2$** et la **protéine tyrosine kinase Fgr**.

Les intégrines représentent une famille de molécules d'adhésion cellulaire ayant un rôle important dans de nombreux types cellulaires dont les cellules ostéoblastiques [291]. Ces molécules sont capables de se lier à différents composants de la matrice extracellulaire tels que le collagène, la laminine ou la fibronectine permettant ainsi de réguler l'homéostasie et le développement osseux [291]. Une étude a notamment mis en évidence un rôle de l'intégrine $\alpha 5$ dans l'ostéogenèse. L'activation pharmacologique de cette protéine dans des cellules mésenchymateuses induit une augmentation de la différenciation de ces cellules en ostéoblastes promouvant ainsi la formation osseuse [292]. De plus, Hodroge *et al.* ont montré que les EVs interagissaient avec le collagène de type 1 *via* des couples d'intégrines $\alpha 1/\beta 1$ et $\alpha 2/\beta 1$ présentes à leur surface et que l'inhibition de cette interaction à l'aide d'un hexasaccharide d'acide galacturonique (DP8) diminue la calcification de ces cellules [164]. Nous pouvons supposer

que l'augmentation d'expression de l'intégrine $\beta 2$ dans les EV Hu favorise l'interaction des EVs avec le collagène du milieu extracellulaire des CMLV entraînant ainsi une aggravation de la CV.

La protéine Fgr fait partie de la famille des protéines kinases non récepteur qui sont exprimées dans de nombreuses cellules. De façon intéressante, la protéine tyrosine kinase Fgr est principalement exprimée dans le système hématopoïétique. Acín-Pérez *et al.* ont montré que les ROS activent la protéine Fgr et que son expression est augmentée dans les macrophages pro-inflammatoires [293]. De plus, l'inactivation du gène codant pour la protéine Fgr diminue la polarisation des macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire [293]. En revanche, dans notre modèle, aucun effet de l'homocystéine sur l'inflammation n'a été observée dans les CMLV incubées avec les EVs. Ces résultats sont cohérents avec les résultats de l'étude du profil inflammatoire des EVs sécrétées par les macrophages après traitement qui ne montrent aucune variation de cytokines pro-inflammatoires dans les EVs. Il serait intéressant d'analyser l'inflammation à des temps plus longs. Aucune donnée n'a été publiée concernant le rôle de la protéine Fgr dans la calcification ou la différenciation ostéogénique des CMLV. Cependant, ceci n'est pas forcément lié à l'absence d'effet de cette protéine dans la CV. Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour identifier le lien entre la surexpression de cette protéine dans les EV Hu et l'aggravation de la CV observée dans notre modèle.

Nous avons également mis en évidence une sous-expression de 21 protéines dans les EV Hu en comparaison aux EV CT24. Parmi ces protéines, **l'acétyltransférase Naa10** a été identifiée comme ayant un rôle dans la différenciation ostéogénique et la formation osseuse [294]. En effet, Yoon *et al.* ont montré que Naa10 est capable d'inhiber le facteur de transcription Runx2 en l'acétylant ce qui entraîne une inhibition de la différenciation de cellules ostéoblastiques [294]. La sous-expression de cette protéine dans les EV Hu pourrait par exemple entraîner une stabilisation de la protéine Runx2 favorisant ainsi l'aggravation de la CV. Selon la littérature, aucun lien n'a été identifié entre la CV et les autres protéines sous exprimées dans les EV Hu. Cependant, nous ne pouvons pas exclure un rôle de ces variations d'expression de ces protéines dans l'aggravation de la CV. Il est probable que les effets des EV Hu sur l'aggravation de la CV soient imputables à de multiples variations d'expression protéique. Pour finir, un point intéressant est que le profil protéique intermédiaire a été observé dans les EV Hn suggérant un effet dose dépendant de l'homocystéine sur les variations du contenu protéique des EVs.

D'après nos résultats, les EVs sécrétées par les macrophages après traitement avec de l'homocystéine présentent donc une modification de leur contenu protéique induisant ainsi un switch ostéogénique des CMLV et une diminution de l'expression de l'inhibiteur de calcification MGP conduisant *in fine* à une aggravation de la CV.

Conclusion
&
Perspectives

En conclusion, nous avons montré une contribution directe des macrophages dans le processus de microcalcification *via* le relargage des EVs, voie alternative en plus du switch ostéogénique des CMLV. En effet, nous avons montré que les EVs sécrétées par des macrophages activés (+ LPS-EK ou homocystéine) sont capables d'aggraver le processus de CV (**Figure 103** et **Figure 104**). Ainsi, les macrophages M1 secrètent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et le TNF- α qui seront transportées dans les EVs créant ainsi un microenvironnement inflammatoire pour les cellules avoisinantes telles que les CMLV qui de ce fait subiront un switch ostéogénique, augmentant ainsi la CV. Cet effet s'accompagnera d'une diminution d'expression de l'inhibiteur de calcification MGP. Ces effets étaient accompagnés d'une modification du contenu protéique des EVs de macrophages. Cependant, les mécanismes d'action des EVs semblent différents en fonction du stimulus utilisé pour activer les macrophages. Tout d'abord, le contenu protéique des EV LPS et EV Hu diffère. De plus, les EV LPS propagent l'inflammation et le stress oxydant aux CMLV aggravant ainsi la CV alors que les effets des EV Hu sur l'aggravation de la CV semblent indépendants du stress oxydant et partiellement dépendants de l'inflammation. Ces résultats suggèrent que l'aggravation de la CV des CMLV observée chez les patients atteints d'IRC peut être régulée par différents mécanismes *via* les EVs en fonction du mode d'activation des cellules environnantes telles que les macrophages.

Une étude plus précise du mécanisme d'action des protéines sur- ou sous-exprimées dans les EV LPS et EV Hu serait nécessaire en analysant par exemple l'activation des voies de signalisation liées à ces molécules dans les CMLV. Il est aussi important de rappeler que nos résultats *in vitro* doivent être vérifiés *in vivo*. En effet, les EVs sécrétées par de nombreux types cellulaires jouent un rôle dans les mécanismes de CV et de multiples effets synergiques ou antagonistes pourraient être observés *in vivo*. De plus, chez les patients atteints d'IRC, une accumulation de nombreuses toxines urémiques est retrouvée pouvant entraîner de multiples effets pathologiques. L'expression des protéines sur- ou sous-exprimées dans les EV LPS et EV Hu pourrait être analysée dans des échantillons d'EVs de sérum, d'urine de rats ou de souris IRC présentant des CV ou même chez des patients IRC avec CV.

Ce projet montre que les EVs pourraient être utilisées comme biomarqueurs non-invasifs dans l'évaluation du risque des CV. Les plaques d'athérome avec microcalcifications étant plus susceptibles de se rompre et d'entraîner des accidents vasculaires, l'étude de ces EVs permettrait la stratification des patients à haut risque de CV notamment les patients IRC. Ces EVs pourraient donc être des cibles thérapeutiques pour limiter le développement et l'aggravation des CV.

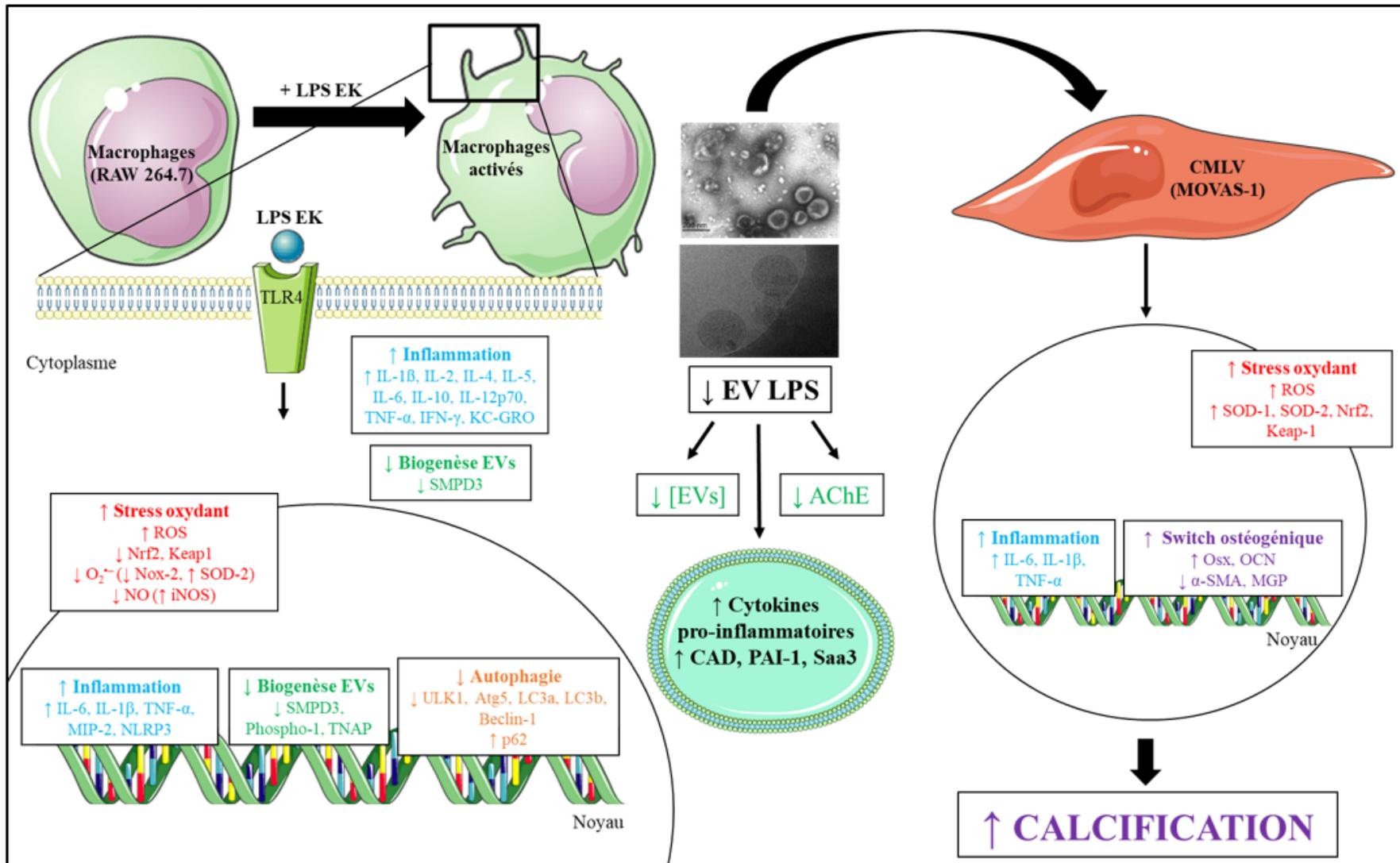


Figure 103 : Représentation schématique des rôles et mécanismes d'action des vésicules extracellulaires (EVs) de macrophages traités avec du lipopolysaccharide (LPS-EK) dans l'aggravation de la calcification vasculaire.

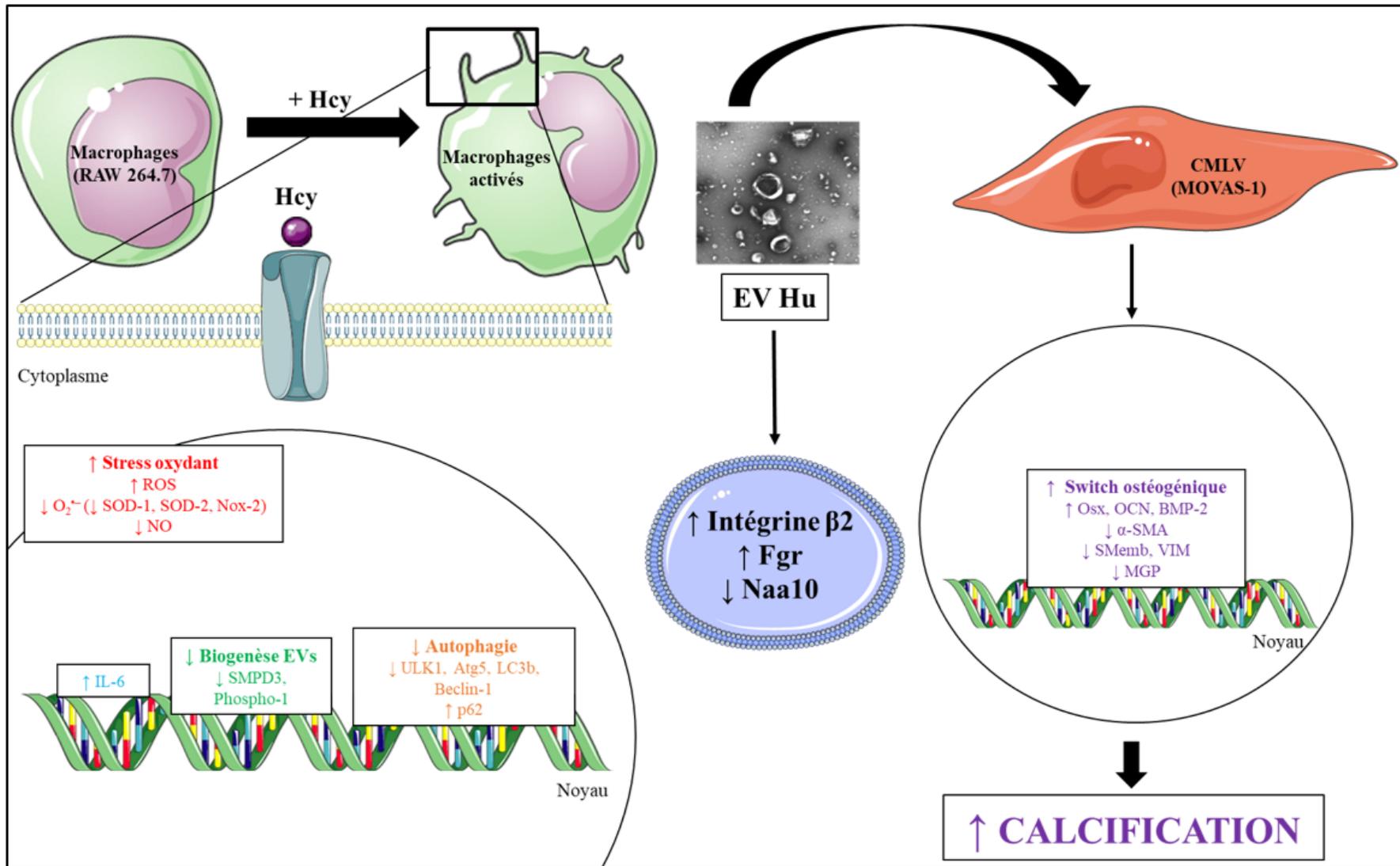


Figure 104 : Représentation schématique des rôles et mécanismes d'action des vésicules extracellulaires (EVs) de macrophages traités avec de l'homocystéine (Hcy) dans l'aggravation de la calcification vasculaire.

Valorisation
du travail de
thèse

❖ **Publications**

Yaker L, Kamel S, Ausseil J, Boullier A. *Effects of Chronic Kidney Disease and Uremic Toxins on Extracellular Vesicle Biology*. *Toxins*, 12, 811 (Dec 2020). *Impact Factor* 3,531

Mansour A, Darwiche W, **Yaker L**, Da Nascimento S, Gomila C, Rossi C, Sonnet P, Kamel S, Guerrera C, Boullier A*, Ausseil J*. *GFOGER peptide modifies Extracellular Vesicles protein content and inhibits vascular calcification*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology, section Molecular Medicine*, 8 (Nov 2020). *Impact Factor* 5,201

Les résultats de la partie LPS font actuellement l'objet d'une publication en cours de soumission. Concernant les résultats de la partie homocystéine, un article est en cours de rédaction.

❖ **Communication orale**

Yaker L, Kamel S, Ausseil J, Boullier A. *Role of extracellular vesicles in the propagation of inflammation and oxidative stress during vascular calcification*. OD17.02 *Journal of Extracellular Vesicles - Virtual Congress, International Society for Extracellular Vesicles (ISEV)* (Mai 2021).

❖ **Communication affichée**

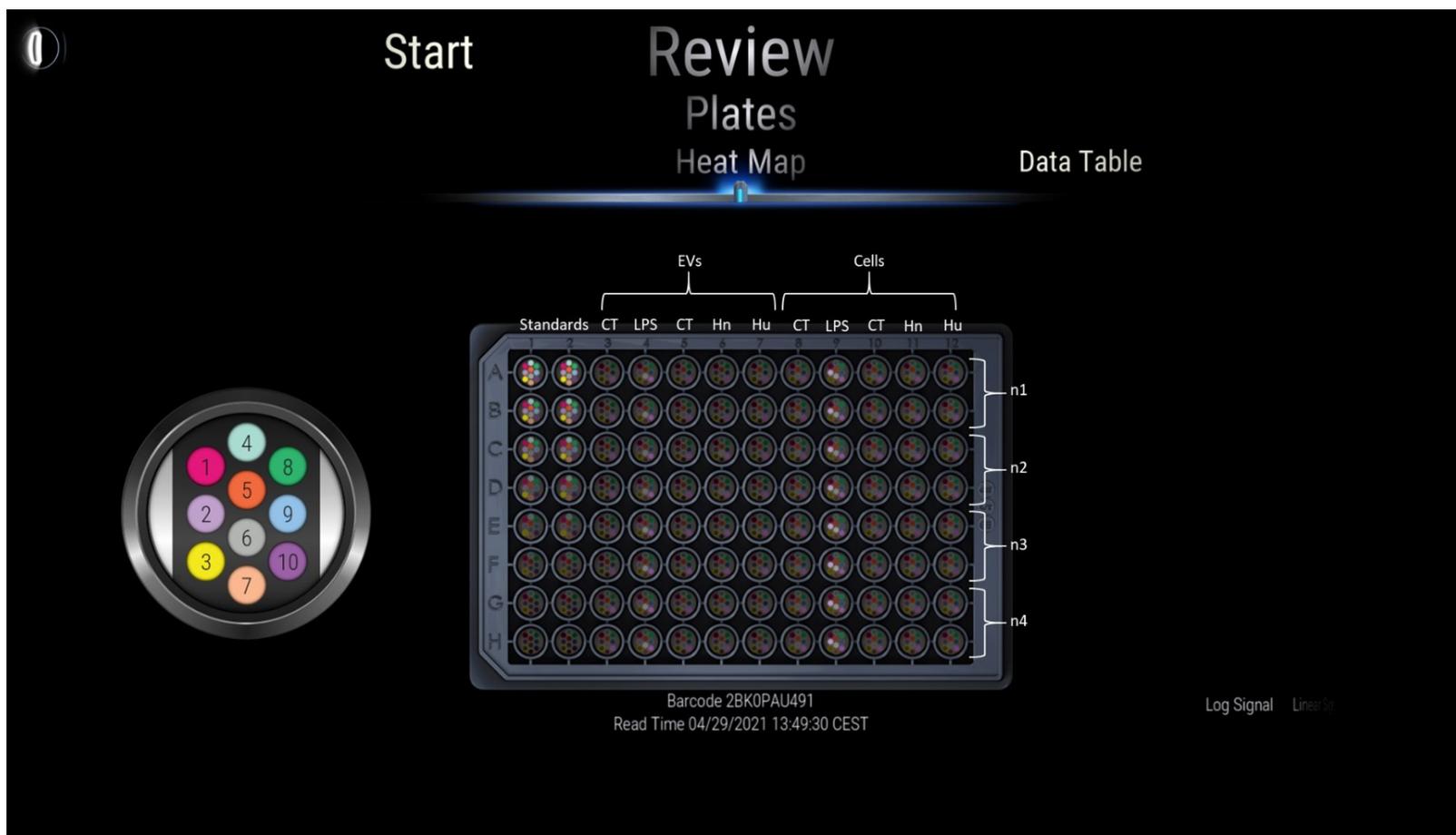
Yaker L, Kamel S, Ausseil J, Boullier A. *Role of extracellular vesicles in the propagation of inflammation and oxidative stress during vascular calcification*. *Virtual Congress, European Atherosclerosis Society (EAS)* (Mai 2021).

❖ **Prix**

- *Young Investigator Fellowship* – Congrès virtuel de l'*European Atherosclerosis Society (EAS)*, 2021.
- *French Society of Extracellular Vesicles (FSEV) Grant – Oral Communication ISEV2021*

Annexes

❖ **Annexe 1 : Résultat obtenu après lecture de la plaque du kit V-plex de chez *Meso Scale Diagnostics*[®] (MSD).**



Les macrophages ont été incubés pendant 6 heures avec 1 µg/ml de LPS-EK (LPS) ou avec de l'homocystéine à une concentration de 10,5 µM (Hn, concentration normale) ou 45,2 µM (Hu, concentration urémique) pendant 24 heures. Les EVs ont été isolées du milieu de culture des cellules RAW incubées avec ou sans les différents traitements. L'expression protéique des cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF-α, IFN-γ, KC-GRO) a été mesurée dans les macrophages et les EVs dérivées des macrophages en utilisant un kit de dosage multiplex de chez MSD.

Bibliographie

1. van der Pol, E.; Böing, A.N.; Harrison, P.; Sturk, A.; Nieuwland, R. Classification, Functions, and Clinical Relevance of Extracellular Vesicles. *Pharmacol Rev* **2012**, *64*, 676–705, doi:10.1124/pr.112.005983.
2. Yáñez-Mó, M.; Siljander, P.R.-M.; Andreu, Z.; Zavec, A.B.; Borràs, F.E.; Buzas, E.I.; Buzas, K.; Casal, E.; Cappello, F.; Carvalho, J.; et al. Biological Properties of Extracellular Vesicles and Their Physiological Functions. *Journal of Extracellular Vesicles* **2015**, *4*, 27066, doi:10.3402/jev.v4.27066.
3. Kalra, H.; Drummen, G.P.C.; Mathivanan, S. Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *Int J Mol Sci* **2016**, *17*, 170, doi:10.3390/ijms17020170.
4. Yaker, L.; Kamel, S.; Ausseil, J.; Boullier, A. Effects of Chronic Kidney Disease and Uremic Toxins on Extracellular Vesicle Biology. *Toxins* **2020**, *12*, 811, doi:10.3390/toxins12120811.
5. van Niel, G.; D'Angelo, G.; Raposo, G. Shedding Light on the Cell Biology of Extracellular Vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 213–228, doi:10.1038/nrm.2017.125.
6. Groot, M.; Lee, H. Sorting Mechanisms for MicroRNAs into Extracellular Vesicles and Their Associated Diseases. *Cells* **2020**, *9*, doi:10.3390/cells9041044.
7. Colombo, M.; Raposo, G.; Théry, C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2014**, *30*, 255–289, doi:10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.
8. Momen-Heravi, F.; Balaj, L.; Alian, S.; Mantel, P.-Y.; Halleck, A.E.; Trachtenberg, A.J.; Soria, C.E.; Oquin, S.; Bonebreak, C.M.; Saracoglu, E.; et al. Current Methods for the Isolation of Extracellular Vesicles. *Biol Chem* **2013**, *394*, 1253–1262, doi:10.1515/hsz-2013-0141.
9. Théry, C.; Witwer, K.W.; Aikawa, E.; Alcaraz, M.J.; Anderson, J.D.; Andriantsitohaina, R.; Antoniou, A.; Arab, T.; Archer, F.; Atkin-Smith, G.K.; et al. Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles 2018 (MISEV2018): A Position Statement of the International Society for Extracellular Vesicles and Update of the MISEV2014 Guidelines. *J Extracell Vesicles* **2018**, *7*, 1535750, doi:10.1080/20013078.2018.1535750.
10. Gustafson, D.; Veitch, S.; Fish, J.E. Extracellular Vesicles as Protagonists of Diabetic Cardiovascular Pathology. *Front Cardiovasc Med* **2017**, *4*, 71, doi:10.3389/fcvm.2017.00071.
11. Hessvik, N.P.; Llorente, A. Current Knowledge on Exosome Biogenesis and Release. *Cell. Mol. Life Sci.* **2018**, *75*, 193–208, doi:10.1007/s00018-017-2595-9.
12. Zhang, Y.; Liu, Y.; Liu, H.; Tang, W.H. Exosomes: Biogenesis, Biologic Function and Clinical Potential. *Cell Biosci* **2019**, *9*, doi:10.1186/s13578-019-0282-2.
13. Rezaie, J.; Ajezi, S.; Avci, Ç.B.; Karimipour, M.; Geranmayeh, M.H.; Nourazarian, A.; Sokullu, E.; Rezabakhsh, A.; Rahbarghazi, R. Exosomes and Their Application in Biomedical Field: Difficulties and Advantages. *Mol Neurobiol* **2018**, *55*, 3372–3393, doi:10.1007/s12035-017-0582-7.
14. Matsuo, H.; Chevallier, J.; Mayran, N.; Blanc, I.L.; Ferguson, C.; Fauré, J.; Blanc, N.S.; Matile, S.; Dubochet, J.; Sadoul, R.; et al. Role of LBPA and Alix in Multivesicular Liposome Formation and Endosome Organization. *Science* **2004**, *303*, 531–534, doi:10.1126/science.1092425.
15. Dreyer, F.; Baur, A. Biogenesis and Functions of Exosomes and Extracellular Vesicles. *Methods Mol Biol* **2016**, *1448*, 201–216, doi:10.1007/978-1-4939-3753-0_15.
16. Kapustin Alexander N.; Chatrou Martijn L.L.; Drozdov Ignat; Zheng Ying; Davidson Sean M.; Soong Daniel; Furmanik Malgorzata; Sanchis Pilar; De Rosales Rafael Torres

- Martin; Alvarez-Hernandez Daniel; et al. Vascular Smooth Muscle Cell Calcification Is Mediated by Regulated Exosome Secretion. *Circulation Research* **2015**, *116*, 1312–1323, doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.305012.
17. Kapustin, A.N.; Shanahan, C.M. Emerging Roles for Vascular Smooth Muscle Cell Exosomes in Calcification and Coagulation. *The Journal of Physiology* **2016**, *594*, 2905–2914, doi:10.1113/JP271340.
 18. Hugel, B.; Martínez, M.C.; Kunzelmann, C.; Freyssinet, J.-M. Membrane Microparticles: Two Sides of the Coin. *Physiology* **2005**, *20*, 22–27, doi:10.1152/physiol.00029.2004.
 19. Savina, A.; Vidal, M.; Colombo, M.I. The Exosome Pathway in K562 Cells Is Regulated by Rab11. *J Cell Sci* **2002**, *115*, 2505–2515.
 20. Alonso, R.; Mazzeo, C.; Rodriguez, M.C.; Marsh, M.; Fraile-Ramos, A.; Calvo, V.; Avila-Flores, A.; Merida, I.; Izquierdo, M. Diacylglycerol Kinase α Regulates the Formation and Polarisation of Mature Multivesicular Bodies Involved in the Secretion of Fas Ligand-Containing Exosomes in T Lymphocytes. *Cell Death & Differentiation* **2011**, *18*, 1161–1173, doi:10.1038/cdd.2010.184.
 21. Alonso, R.; Mazzeo, C.; Mérida, I.; Izquierdo, M. A New Role of Diacylglycerol Kinase Alpha on the Secretion of Lethal Exosomes Bearing Fas Ligand during Activation-Induced Cell Death of T Lymphocytes. *Biochimie* **2007**, *89*, 213–221, doi:10.1016/j.biochi.2006.07.018.
 22. Loomis, R.J.; Holmes, D.A.; Elms, A.; Solski, P.A.; Der, C.J.; Su, L. Citron Kinase, a RhoA Effector, Enhances HIV-1 Virion Production by Modulating Exocytosis. *Traffic* **2006**, *7*, 1643–1653, doi:10.1111/j.1600-0854.2006.00503.x.
 23. Liégeois, S.; Benedetto, A.; Garnier, J.-M.; Schwab, Y.; Labouesse, M. The V0-ATPase Mediates Apical Secretion of Exosomes Containing Hedgehog-Related Proteins in *Caenorhabditis Elegans*. *J. Cell Biol.* **2006**, *173*, 949–961, doi:10.1083/jcb.200511072.
 24. Mulcahy, L.A.; Pink, R.C.; Carter, D.R.F. Routes and Mechanisms of Extracellular Vesicle Uptake. *J Extracell Vesicles* **2014**, *3*, doi:10.3402/jev.v3.24641.
 25. Morelli, A.E.; Larregina, A.T.; Shufesky, W.J.; Sullivan, M.L.G.; Stolz, D.B.; Papworth, G.D.; Zahorchak, A.F.; Logar, A.J.; Wang, Z.; Watkins, S.C.; et al. Endocytosis, Intracellular Sorting, and Processing of Exosomes by Dendritic Cells. *Blood* **2004**, *104*, 3257–3266, doi:10.1182/blood-2004-03-0824.
 26. Kaur, J.; Debnath, J. Autophagy at the Crossroads of Catabolism and Anabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2015**, *16*, 461–472, doi:10.1038/nrm4024.
 27. Colletti, M.; Ceglie, D.; Di Giannatale, A.; Nazio, F. Autophagy and Exosomes Relationship in Cancer: Friends or Foes? *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **2021**, *8*, 1802, doi:10.3389/fcell.2020.614178.
 28. Hromada, C.; Mühleder, S.; Grillari, J.; Redl, H.; Holnthoner, W. Endothelial Extracellular Vesicles-Promises and Challenges. *Frontiers in Physiology* **2017**, *8*, 275, doi:10.3389/fphys.2017.00275.
 29. Berezin, A.E.; Berezin, A.A. Endothelial Cell-Derived Extracellular Vesicles in Atherosclerosis: The Emerging Value for Diagnosis, Risk Stratification and Prognostication. *Vessel Plus* **2020**, *4*, doi:10.20517/2574-1209.2020.03.
 30. Słomka, A.; Urban, S.K.; Lukacs-Kornek, V.; Żekanowska, E.; Kornek, M. Large Extracellular Vesicles: Have We Found the Holy Grail of Inflammation? *Frontiers in Immunology* **2018**, *9*, doi:10.3389/fimmu.2018.02723.
 31. Tao, S.-C.; Guo, S.-C.; Zhang, C.-Q. Platelet-Derived Extracellular Vesicles: An Emerging Therapeutic Approach. *International Journal of Biological Sciences* **2017**, *13*, 828–834, doi:10.7150/ijbs.19776.

32. Gasecka, A.; Nieuwland, R.; Siljander, P.R.-M. 22 - Platelet-Derived Extracellular Vesicles. In *Platelets (Fourth Edition)*; Michelson, A.D., Ed.; Academic Press: Cambridge, Massachusetts, USA, 2019; pp. 401–416 ISBN 978-0-12-813456-6.
33. Comelli, L.; Rocchiccioli, S.; Smirni, S.; Salvetti, A.; Signore, G.; Citti, L.; Trivella, M.G.; Cecchetti, A. Characterization of Secreted Vesicles from Vascular Smooth Muscle Cells. *Molecular bioSystems* **2014**, *10*, 1146–1152, doi:10.1039/c3mb70544g.
34. Ma, Y.; Yang, X.; Chatterjee, V.; Meegan, J.E.; Beard Jr., R.S.; Yuan, S.Y. Role of Neutrophil Extracellular Traps and Vesicles in Regulating Vascular Endothelial Permeability. *Front Immunol* **2019**, *10*, doi:10.3389/fimmu.2019.01037.
35. Oggero, S.; Austin-Williams, S.; Norling, L.V. The Contrasting Role of Extracellular Vesicles in Vascular Inflammation and Tissue Repair. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, doi:10.3389/fphar.2019.01479.
36. Hong, C.-W. Extracellular Vesicles of Neutrophils. *Immune Network* **2018**, *18*, doi:10.4110/in.2018.18.e43.
37. Liu, J.; Li, D.; Wu, X.; Dang, L.; Lu, A.; Zhang, G. Bone-Derived Exosomes. *Current Opinion in Pharmacology* **2017**, *34*, 64–69, doi:10.1016/j.coph.2017.08.008.
38. Li, Y.; Yin, P.; Guo, Z.; Lv, H.; Deng, Y.; Chen, M.; Gu, Y.; Tang, P.; Zhang, L. Bone-Derived Extracellular Vesicles: Novel Players of Interorgan Crosstalk. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2019**, *10*, doi:10.3389/fendo.2019.00846.
39. Li, D.; Liu, J.; Guo, B.; Liang, C.; Dang, L.; Lu, C.; He, X.; Cheung, H.Y.-S.; Xu, L.; Lu, C.; et al. Osteoclast-Derived Exosomal MiR-214-3p Inhibits Osteoblastic Bone Formation. *Nature Communications* **2016**, *7*, 10872, doi:10.1038/ncomms10872.
40. Sun, W.; Zhao, C.; Li, Y.; Wang, L.; Nie, G.; Peng, J.; Wang, A.; Zhang, P.; Tian, W.; Li, Q.; et al. Osteoclast-Derived MicroRNA-Containing Exosomes Selectively Inhibit Osteoblast Activity. *Cell Discov* **2016**, *2*, 16015, doi:10.1038/celldisc.2016.15.
41. Cui, Y.; Luan, J.; Li, H.; Zhou, X.; Han, J. Exosomes Derived from Mineralizing Osteoblasts Promote ST2 Cell Osteogenic Differentiation by Alteration of MicroRNA Expression. *FEBS Letters* **2016**, *590*, 185–192, doi:https://doi.org/10.1002/1873-3468.12024.
42. Tsiapalis, D.; O’Driscoll, L. Mesenchymal Stem Cell Derived Extracellular Vesicles for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications. *Cells* **2020**, *9*, doi:10.3390/cells9040991.
43. Fitzgerald, W.; Freeman, M.L.; Lederman, M.M.; Vasilieva, E.; Romero, R.; Margolis, L. A System of Cytokines Encapsulated in ExtraCellular Vesicles. *Sci Rep* **2018**, *8*, 8973, doi:10.1038/s41598-018-27190-x.
44. Aiello, A.; Giannesi, F.; Percario, Z.A.; Affabris, E. An Emerging Interplay between Extracellular Vesicles and Cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2020**, *51*, 49–60, doi:10.1016/j.cytogfr.2019.12.003.
45. Cypryk, W.; Nyman, T.A.; Matikainen, S. From Inflammasome to Exosome—Does Extracellular Vesicle Secretion Constitute an Inflammasome-Dependent Immune Response? *Front Immunol* **2018**, *9*, doi:10.3389/fimmu.2018.02188.
46. Robbins, P.D.; Morelli, A.E. Regulation of Immune Responses by Extracellular Vesicles. *Nat Rev Immunol* **2014**, *14*, 195–208, doi:10.1038/nri3622.
47. Hiemstra, T.F.; Charles, P.D.; Gracia, T.; Hester, S.S.; Gatto, L.; Al-Lamki, R.; Floto, R.A.; Su, Y.; Skepper, J.N.; Lilley, K.S.; et al. Human Urinary Exosomes as Innate Immune Effectors. *J Am Soc Nephrol* **2014**, *25*, 2017–2027, doi:10.1681/ASN.2013101066.
48. Femminò, S.; Penna, C.; Margarita, S.; Comità, S.; Brizzi, M.F.; Pagliaro, P. Extracellular Vesicles and Cardiovascular System: Biomarkers and Cardioprotective Effectors. *Vascular Pharmacology* **2020**, *135*, 106790, doi:10.1016/j.vph.2020.106790.

49. Macron-Noguès, F.; Vernay, M.; Ekong, E.; Thiard, B.; Salanave, B.; Fender, P.; Allemand, H. The Prevalence of ESRD Treated With Renal Dialysis in France in 2003. *American Journal of Kidney Diseases* **2005**, *46*, 309–315, doi:10.1053/j.ajkd.2005.04.017.
50. Hill, N.R.; Fatoba, S.T.; Oke, J.L.; Hirst, J.A.; O’Callaghan, C.A.; Lasserson, D.S.; Hobbs, F.D.R. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease – A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* **2016**, *11*, doi:10.1371/journal.pone.0158765.
51. Verhelst, D. [Characteristics and epidemiology of chronic kidney disease]. *Soins* **2018**, *63*, 14–16, doi:10.1016/j.soins.2018.04.004.
52. Les données du rapport REIN-2019.
53. Kazancioğlu, R. Risk Factors for Chronic Kidney Disease: An Update. *Kidney Int Suppl (2011)* **2013**, *3*, 368–371, doi:10.1038/kisup.2013.79.
54. Inker, L.A.; Astor, B.C.; Fox, C.H.; Isakova, T.; Lash, J.P.; Peralta, C.A.; Tamura, M.K.; Feldman, H.I. KDOQI US Commentary on the 2012 KDIGO Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of CKD. *American Journal of Kidney Diseases* **2014**, *63*, 713–735, doi:10.1053/j.ajkd.2014.01.416.
55. Drawz, P.; Rahman, M. Chronic Kidney Disease. *Ann Intern Med* **2015**, *162*, ITC1–ITC16, doi:10.7326/AITC201506020.
56. Les symptômes et les complications de l’IRC - VIDAL.
57. Zhong, J.; Yang, H.-C.; Fogo, A.B. A Perspective on Chronic Kidney Disease Progression. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **2016**, *312*, F375–F384, doi:10.1152/ajprenal.00266.2016.
58. Webster, A.C.; Nagler, E.V.; Morton, R.L.; Masson, P. Chronic Kidney Disease. *Lancet* **2017**, *389*, 1238–1252, doi:10.1016/S0140-6736(16)32064-5.
59. Matovinović, M.S. 1. Pathophysiology and Classification of Kidney Diseases. *EJIFCC* **2009**, *20*, 2–11.
60. Liu, Y. Renal Fibrosis: New Insights into the Pathogenesis and Therapeutics. *Kidney Int* **2006**, *69*, 213–217, doi:10.1038/sj.ki.5000054.
61. Rapa, S.F.; Di Iorio, B.R.; Campiglia, P.; Heidland, A.; Marzocco, S. Inflammation and Oxidative Stress in Chronic Kidney Disease—Potential Therapeutic Role of Minerals, Vitamins and Plant-Derived Metabolites. *Int J Mol Sci* **2019**, *21*, 263, doi:10.3390/ijms21010263.
62. Mihai, S.; Codrici, E.; Popescu, I.D.; Enciu, A.-M.; Albulescu, L.; Necula, L.G.; Mambet, C.; Anton, G.; Tanase, C. Inflammation-Related Mechanisms in Chronic Kidney Disease Prediction, Progression, and Outcome. *J Immunol Res* **2018**, *2018*, 2180373, doi:10.1155/2018/2180373.
63. McIntyre, C.W.; Harrison, L.E.A.; Eldehni, M.T.; Jefferies, H.J.; Szeto, C.-C.; John, S.G.; Sigrist, M.K.; Burton, J.O.; Hothi, D.; Korsheed, S.; et al. Circulating Endotoxemia: A Novel Factor in Systemic Inflammation and Cardiovascular Disease in Chronic Kidney Disease. *Clin J Am Soc Nephrol* **2011**, *6*, 133–141, doi:10.2215/CJN.04610510.
64. Hauser, A.B.; Stinghen, A.E.M.; Gonçalves, S.M.; Bucharles, S.; Pecoits-Filho, R. A Gut Feeling on Endotoxemia: Causes and Consequences in Chronic Kidney Disease. *Nephron Clin Pract* **2011**, *118*, c165-172; discussion c172, doi:10.1159/000321438.
65. Annuk, M.; Zilmer, M.; Lind, L.; Linde, T.; Fellström, B. Oxidative Stress and Endothelial Function in Chronic Renal Failure. *J Am Soc Nephrol* **2001**, *12*, 2747–2752, doi:10.1681/ASN.V12122747.
66. Boulanger, E.; Wautier, M.-P.; Wautier, J.-L.; Boval, B.; Panis, Y.; Wernert, N.; Danze, P.-M.; Dequiedt, P. AGEs Bind to Mesothelial Cells via RAGE and Stimulate VCAM-1 Expression. *Kidney Int* **2002**, *61*, 148–156, doi:10.1046/j.1523-1755.2002.00115.x.

67. Vanholder, R.; Abou-Deif, O.; Argiles, A.; Baurmeister, U.; Beige, J.; Brouckaert, P.; Brunet, P.; Cohen, G.; De Deyn, P.P.; Drüeke, T.B.; et al. The Role of EUTox in Uremic Toxin Research. *Semin Dial* **2009**, *22*, 323–328, doi:10.1111/j.1525-139X.2009.00574.x.
68. Niwa, T.; Ise, M. Indoxyl Sulfate, a Circulating Uremic Toxin, Stimulates the Progression of Glomerular Sclerosis. *J. Lab. Clin. Med.* **1994**, *124*, 96–104.
69. Namba, S.; Okuda, Y.; Morimoto, A.; Kojima, T.; Morita, T. [Serum indoxyl sulfate is a useful predictor for progression of chronic kidney disease]. *Rinsho Byori* **2010**, *58*, 448–453.
70. Wu, I.-W.; Hsu, K.-H.; Lee, C.-C.; Sun, C.-Y.; Hsu, H.-J.; Tsai, C.-J.; Tzen, C.-Y.; Wang, Y.-C.; Lin, C.-Y.; Wu, M.-S. P-Cresyl Sulphate and Indoxyl Sulphate Predict Progression of Chronic Kidney Disease. *Nephrol Dial Transplant* **2011**, *26*, 938–947, doi:10.1093/ndt/gfq580.
71. Yamaguchi, J.; Tanaka, T.; Inagi, R. Effect of AST-120 in Chronic Kidney Disease Treatment: Still a Controversy? *Nephron* **2017**, *135*, 201–206, doi:10.1159/000453673.
72. Schulman, G.; Vanholder, R.; Niwa, T. AST-120 for the Management of Progression of Chronic Kidney Disease. *Int J Nephrol Renovasc Dis* **2014**, *7*, 49–56, doi:10.2147/IJNRD.S41339.
73. Lu, C.-L.; Zheng, C.-M.; Lu, K.-C.; Liao, M.-T.; Wu, K.-L.; Ma, M.-C. Indoxyl-Sulfate-Induced Redox Imbalance in Chronic Kidney Disease. *Antioxidants (Basel)* **2021**, *10*, 936, doi:10.3390/antiox10060936.
74. Chao, C.-T.; Lin, S.-H. Uremic Toxins and Frailty in Patients with Chronic Kidney Disease: A Molecular Insight. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, 6270, doi:10.3390/ijms22126270.
75. Stockler-Pinto, M.B.; Fouque, D.; Soulage, C.O.; Croze, M.; Mafra, D. Indoxyl Sulfate and P-Cresyl Sulfate in Chronic Kidney Disease. Could These Toxins Modulate the Antioxidant Nrf2-Keap1 Pathway? *J Ren Nutr* **2014**, *24*, 286–291, doi:10.1053/j.jrn.2013.11.006.
76. Miyazaki, T.; Ise, M.; Hirata, M.; Endo, K.; Ito, Y.; Seo, H.; Niwa, T. Indoxyl Sulfate Stimulates Renal Synthesis of Transforming Growth Factor-Beta 1 and Progression of Renal Failure. *Kidney Int. Suppl.* **1997**, *63*, S211-214.
77. Enomoto, A.; Takeda, M.; Tojo, A.; Sekine, T.; Cha, S.H.; Khamdang, S.; Takayama, F.; Aoyama, I.; Nakamura, S.; Endou, H.; et al. Role of Organic Anion Transporters in the Tubular Transport of Indoxyl Sulfate and the Induction of Its Nephrotoxicity. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2002**, *13*, 1711–1720, doi:10.1097/01.asn.0000022017.96399.b2.
78. Ichii, O.; Otsuka-Kanazawa, S.; Nakamura, T.; Ueno, M.; Kon, Y.; Chen, W.; Rosenberg, A.Z.; Kopp, J.B. Podocyte Injury Caused by Indoxyl Sulfate, a Uremic Toxin and Aryl-Hydrocarbon Receptor Ligand. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e108448, doi:10.1371/journal.pone.0108448.
79. Young, G.-H.; Wu, V.-C. KLOTTHO Methylation Is Linked to Uremic Toxins and Chronic Kidney Disease. *Kidney Int.* **2012**, *81*, 611–612, doi:10.1038/ki.2011.461.
80. Sun, C.-Y.; Hsu, H.-H.; Wu, M.-S. P-Cresol Sulfate and Indoxyl Sulfate Induce Similar Cellular Inflammatory Gene Expressions in Cultured Proximal Renal Tubular Cells. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **2012**, *28*, doi:10.1093/ndt/gfs133.
81. Taki, K.; Nakamura, S.; Miglinas, M.; Enomoto, A.; Niwa, T. Accumulation of Indoxyl Sulfate in OAT1/3-Positive Tubular Cells in Kidneys of Patients with Chronic Renal Failure. *J Ren Nutr* **2006**, *16*, 199–203, doi:10.1053/j.jrn.2006.04.020.
82. Watanabe, K.; Tominari, T.; Hirata, M.; Matsumoto, C.; Hirata, J.; Murphy, G.; Nagase, H.; Miyaura, C.; Inada, M. Indoxyl Sulfate, a Uremic Toxin in Chronic Kidney Disease,

- Suppresses Both Bone Formation and Bone Resorption. *FEBS Open Bio* **2017**, *7*, 1178–1185, doi:10.1002/2211-5463.12258.
83. Gelasco, A.K.; Raymond, J.R. Indoxyl Sulfate Induces Complex Redox Alterations in Mesangial Cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **2006**, *290*, F1551–F1558, doi:10.1152/ajprenal.00281.2004.
84. Azzini, E.; Ruggeri, S.; Polito, A. Homocysteine: Its Possible Emerging Role in At-Risk Population Groups. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21*, 1421, doi:10.3390/ijms21041421.
85. Ostrakhovitch, E.A.; Tabibzadeh, S. Homocysteine in Chronic Kidney Disease. *Adv Clin Chem* **2015**, *72*, 77–106, doi:10.1016/bs.acc.2015.07.002.
86. Capelli, I.; Cianciolo, G.; Gasperoni, L.; Zappulo, F.; Tondolo, F.; Cappuccilli, M.; La Manna, G. Folic Acid and Vitamin B12 Administration in CKD, Why Not? *Nutrients* **2019**, *11*, E383, doi:10.3390/nu11020383.
87. Bild, D.E.; Detrano, R.; Peterson, D.; Guerci, A.; Liu, K.; Shahar, E.; Ouyang, P.; Jackson, S.; Saad, M.F. Ethnic Differences in Coronary Calcification: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Circulation* **2005**, *111*, 1313–1320, doi:10.1161/01.CIR.0000157730.94423.4B.
88. Brancaccio, D.; Bellasi, A.; Cozzolino, M.; Galassi, A.; Gallieni, M. Arterial Accelerated Aging in Dialysis Patients: The Clinical Impact of Vascular Calcification. *Curr Vasc Pharmacol* **2009**, *7*, 374–380, doi:10.2174/157016109788340730.
89. Wang, X.-R.; Zhang, J.-J.; Xu, X.-X.; Wu, Y.-G. Prevalence of Coronary Artery Calcification and Its Association with Mortality, Cardiovascular Events in Patients with Chronic Kidney Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ren Fail* **2019**, *41*, 244–256, doi:10.1080/0886022X.2019.1595646.
90. Jono, S.; Shioi, A.; Ikari, Y.; Nishizawa, Y. Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease. *J Bone Miner Metab* **2006**, *24*, 176–181, doi:10.1007/s00774-005-0668-6.
91. Shanahan, C.M.; Crouthamel, M.H.; Kapustin, A.; Giachelli, C.M. Arterial Calcification in Chronic Kidney Disease: Key Roles for Calcium and Phosphate. *Circ Res* **2011**, *109*, 697–711, doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.234914.
92. Dube, P.; DeRiso, A.; Patel, M.; Battepati, D.; Khatib-Shahidi, B.; Sharma, H.; Gupta, R.; Malhotra, D.; Dworkin, L.; Haller, S.; et al. Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease: Diversity in the Vessel Wall. *Biomedicines* **2021**, *9*, 404, doi:10.3390/biomedicines9040404.
93. Leopold, J.A. Cellular Mechanisms of Aortic Valve Calcification. *Circ Cardiovasc Interv* **2012**, *5*, 605–614, doi:10.1161/CIRCINTERVENTIONS.112.971028.
94. Fletcher, A.J.; Singh, T.; Syed, M.B.J.; Dweck, M.R. Imaging Aortic Valve Calcification: Significance, Approach and Implications. *Clinical Radiology* **2021**, *76*, 15–26, doi:10.1016/j.crad.2020.04.007.
95. Sarnak, M.J.; Levey, A.S.; Schoolwerth, A.C.; Coresh, J.; Culeton, B.; Hamm, L.L.; McCullough, P.A.; Kasiske, B.L.; Kelepouris, E.; Klag, M.J.; et al. Kidney Disease as a Risk Factor for Development of Cardiovascular Disease: A Statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Hypertension* **2003**, *42*, 1050–1065, doi:10.1161/01.HYP.0000102971.85504.7c.
96. Chen, N.X.; Moe, S.M. Vascular Calcification: Pathophysiology and Risk Factors. *Curr Hypertens Rep* **2012**, *14*, 228–237, doi:10.1007/s11906-012-0265-8.
97. Savoia, C.; Burger, D.; Nishigaki, N.; Montezano, A.; Touyz, R.M. Angiotensin II and the Vascular Phenotype in Hypertension. *Expert Rev Mol Med* **2011**, *13*, e11, doi:10.1017/S1462399411001815.

98. Chen, N.X.; Duan, D.; O'Neill, K.D.; Moe, S.M. High Glucose Increases the Expression of Cbfa1 and BMP-2 and Enhances the Calcification of Vascular Smooth Muscle Cells. *Nephrol Dial Transplant* **2006**, *21*, 3435–3442, doi:10.1093/ndt/gfl429.
99. Parhami, F.; Basseri, B.; Hwang, J.; Tintut, Y.; Demer, L.L. High-Density Lipoprotein Regulates Calcification of Vascular Cells. *Circ Res* **2002**, *91*, 570–576, doi:10.1161/01.res.0000036607.05037.da.
100. Palit, S.; Kendrick, J. Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease: Role of Disordered Mineral Metabolism. *Curr Pharm Des* **2014**, *20*, 5829–5833.
101. Neves, K.-R.; Graciolli, F.-G.; dos Reis, L.-M.; Graciolli, R.-G.; Neves, C.-L.; Magalhães, A.-O.; Custódio, M.-R.; Batista, D.-G.; Jorgetti, V.; Moysés, R.M.A. Vascular Calcification: Contribution of Parathyroid Hormone in Renal Failure. *Kidney International* **2007**, *71*, 1262–1270, doi:10.1038/sj.ki.5002241.
102. Durham, A.L.; Speer, M.Y.; Scatena, M.; Giachelli, C.M.; Shanahan, C.M. Role of Smooth Muscle Cells in Vascular Calcification: Implications in Atherosclerosis and Arterial Stiffness. *Cardiovasc Res* **2018**, *114*, 590–600, doi:10.1093/cvr/cvy010.
103. Shroff, R.C.; McNair, R.; Skepper, J.N.; Figg, N.; Schurgers, L.J.; Deanfield, J.; Rees, L.; Shanahan, C.M. Chronic Mineral Dysregulation Promotes Vascular Smooth Muscle Cell Adaptation and Extracellular Matrix Calcification. *JASN* **2010**, *21*, 103–112, doi:10.1681/ASN.2009060640.
104. Wang, Y.; Osborne, M.T.; Tung, B.; Li, M.; Li, Y. Imaging Cardiovascular Calcification. *J Am Heart Assoc* **2018**, *7*, e008564, doi:10.1161/JAHA.118.008564.
105. Shioi, A.; Ikari, Y. Plaque Calcification During Atherosclerosis Progression and Regression. *J Atheroscler Thromb* **2018**, *25*, 294–303, doi:10.5551/jat.RV17020.
106. Johnson, J.L. Emerging Regulators of Vascular Smooth Muscle Cell Function in the Development and Progression of Atherosclerosis. *Cardiovasc Res* **2014**, *103*, 452–460, doi:10.1093/cvr/cvu171.
107. New, S.E.P.; Aikawa, E. Cardiovascular Calcification: An Inflammatory Disease. *Circ J* **2011**, *75*, 1305–1313, doi:10.1253/circj.cj-11-0395.
108. Karpman, D.; Ståhl, A.-L.; Arvidsson, I. Extracellular Vesicles in Renal Disease. *Nat Rev Nephrol* **2017**, *13*, 545–562, doi:10.1038/nrneph.2017.98.
109. Erdbrügger, U.; Le, T.H. Extracellular Vesicles in Renal Diseases: More than Novel Biomarkers? *J. Am. Soc. Nephrol.* **2016**, *27*, 12–26, doi:10.1681/ASN.2015010074.
110. Jalal, D.; Sanford, B.; Renner, B.; Ten Eyck, P.; Laskowski, J.; Cooper, J.; Sun, M.; Zakharia, Y.; Spitz, D.; Dokun, A.; et al. Detection of pro Angiogenic and Inflammatory Biomarkers in Patients with CKD. *Sci Rep* **2021**, *11*, 8786, doi:10.1038/s41598-021-87710-0.
111. Lv, L.-L.; Feng, Y.; Wen, Y.; Wu, W.-J.; Ni, H.-F.; Li, Z.-L.; Zhou, L.-T.; Wang, B.; Zhang, J.-D.; Crowley, S.D.; et al. Exosomal CCL2 from Tubular Epithelial Cells Is Critical for Albumin-Induced Tubulointerstitial Inflammation. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2018**, *29*, 919–935, doi:10.1681/ASN.2017050523.
112. Lv, L.-L.; Cao, Y.-H.; Pan, M.-M.; Liu, H.; Tang, R.-N.; Ma, K.-L.; Chen, P.-S.; Liu, B.-C. CD2AP mRNA in Urinary Exosome as Biomarker of Kidney Disease. *Clinica Chimica Acta* **2014**, *428*, 26–31, doi:10.1016/j.cca.2013.10.003.
113. Benito-Martin, A.; Ucerro, A.C.; Zubiri, I.; Posada-Ayala, M.; Fernandez-Fernandez, B.; Cannata-Ortiz, P.; Sanchez-Nino, M.D.; Ruiz-Ortega, M.; Egido, J.; Alvarez-Llamas, G.; et al. Osteoprotegerin in Exosome-like Vesicles from Human Cultured Tubular Cells and Urine. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e72387, doi:10.1371/journal.pone.0072387.
114. Dursun, I.; Poyrazoglu, H.M.; Gunduz, Z.; Ulger, H.; Yykyilmaz, A.; Dusunsel, R.; Patyroglu, T.; Gurgoze, M. The Relationship between Circulating Endothelial Microparticles and Arterial Stiffness and Atherosclerosis in Children with Chronic

- Kidney Disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2009**, *24*, 2511–2518, doi:10.1093/ndt/gfp066.
115. Amabile, N.; Guérin, A.P.; Tedgui, A.; Boulanger, C.M.; London, G.M. Predictive Value of Circulating Endothelial Microparticles for Cardiovascular Mortality in End-Stage Renal Failure: A Pilot Study. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2012**, *27*, 1873–1880, doi:10.1093/ndt/gfr573.
 116. Merino, A.; Portolés, J.; Selgas, R.; Ojeda, R.; Buendia, P.; Ocaña, J.; Bajo, M.A.; del Peso, G.; Carracedo, J.; Ramírez, R.; et al. Effect of Different Dialysis Modalities on Microinflammatory Status and Endothelial Damage. *Clin J Am Soc Nephrol* **2010**, *5*, 227–234, doi:10.2215/CJN.03260509.
 117. Hsu, C.-Y.; Huang, P.-H.; Chiang, C.-H.; Leu, H.-B.; Huang, C.-C.; Chen, J.-W.; Lin, S.-J. Increased Circulating Endothelial Apoptotic Microparticle to Endothelial Progenitor Cell Ratio Is Associated with Subsequent Decline in Glomerular Filtration Rate in Hypertensive Patients. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e68644, doi:10.1371/journal.pone.0068644.
 118. Burton, J.O.; Hamali, H.A.; Singh, R.; Abbasian, N.; Parsons, R.; Patel, A.K.; Goodall, A.H.; Brunskill, N.J. Elevated Levels of Procoagulant Plasma Microvesicles in Dialysis Patients. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e72663, doi:10.1371/journal.pone.0072663.
 119. Almquist, T.; Mobarrez, F.; Jacobson, S.H.; Wallén, H.; Hjemdahl, P. Effects of Lipid-Lowering Treatment on Circulating Microparticles in Patients with Diabetes Mellitus and Chronic Kidney Disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2016**, *31*, 944–952, doi:10.1093/ndt/gfv337.
 120. Carmona, A.; Agüera, M.L.; Luna-Ruiz, C.; Buendía, P.; Calleros, L.; García-Jerez, A.; Rodríguez-Puyol, M.; Arias, M.; Arias-Guillen, M.; de Arriba, G.; et al. Markers of Endothelial Damage in Patients with Chronic Kidney Disease on Hemodialysis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2017**, *312*, F673–F681, doi:10.1152/ajprenal.00013.2016.
 121. Chen, Y.-L.; Chen, C.-H.; Wallace, C.G.; Wang, H.-T.; Yang, C.-C.; Yip, H.-K. Levels of Circulating Microparticles in Patients with Chronic Cardiorenal Disease. *J. Atheroscler. Thromb.* **2015**, *22*, 247–256, doi:10.5551/jat.26658.
 122. Amabile, N.; Guérin, A.P.; Leroyer, A.; Mallat, Z.; Nguyen, C.; Boddart, J.; London, G.M.; Tedgui, A.; Boulanger, C.M. Circulating Endothelial Microparticles Are Associated with Vascular Dysfunction in Patients with End-Stage Renal Failure. *JASN* **2005**, *16*, 3381–3388, doi:10.1681/ASN.2005050535.
 123. Faure, V.; Dou, L.; Sabatier, F.; Cerini, C.; Sampol, J.; Berland, Y.; Brunet, P.; Dignat-George, F. Elevation of Circulating Endothelial Microparticles in Patients with Chronic Renal Failure. *J Thromb Haemost* **2006**, *4*, 566–573, doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01780.x.
 124. Trappenburg, M.C.; van Schilfgaarde, M.; Frerichs, F.C.P.; Spronk, H.M.H.; ten Cate, H.; de Fijter, C.W.H.; Terpstra, W.E.; Leyte, A. Chronic Renal Failure Is Accompanied by Endothelial Activation and a Large Increase in Microparticle Numbers with Reduced Procoagulant Capacity. *Nephrol Dial Transplant* **2012**, *27*, 1446–1453, doi:10.1093/ndt/gfr474.
 125. Fonseca, F.; Ballerini, A.P.; Izar, M.C.; Kato, J.; Ferreira, C.E.; Fonzar, W.; do Amaral, J.; Rezende, P.; Machado-Santelli, G.; França, C. Advanced Chronic Kidney Disease Is Associated with Higher Serum Concentration of Monocyte Microparticles. *Life Sci* **2020**, *260*, 118295, doi:10.1016/j.lfs.2020.118295.
 126. Qamri, Z.; Pelletier, R.; Foster, J.; Kumar, S.; Momani, H.; Ware, K.; Von Visger, J.; Satoskar, A.; Nadasdy, T.; Brodsky, S.V. Early Posttransplant Changes in Circulating Endothelial Microparticles in Patients with Kidney Transplantation. *Transpl. Immunol.* **2014**, *31*, 60–64, doi:10.1016/j.trim.2014.06.006.

127. Al-Massarani, G.; Vacher-Coponat, H.; Paul, P.; Widemann, A.; Arnaud, L.; Loundou, A.; Robert, S.; Berland, Y.; Dignat-George, F.; Camoin-Jau, L. Impact of Immunosuppressive Treatment on Endothelial Biomarkers after Kidney Transplantation. *Am. J. Transplant.* **2008**, *8*, 2360–2367, doi:10.1111/j.1600-6143.2008.02399.x.
128. Boulanger, C.M.; Amabile, N.; Guérin, A.P.; Pannier, B.; Leroyer, A.S.; Mallat, C.N.Z.; Tedgui, A.; London, G.M. In Vivo Shear Stress Determines Circulating Levels of Endothelial Microparticles in End-Stage Renal Disease. *Hypertension* **2007**, *49*, 902–908, doi:10.1161/01.HYP.0000259667.22309.df.
129. Jalal Diana; Renner Brandon; Laskowski Jennifer; Stites Erik; Cooper James; Valente Karissa; You Zhiying; Perrenoud Loni; Le Quintrec Moglie; Muhamed Ismaeel; et al. Endothelial Microparticles and Systemic Complement Activation in Patients With Chronic Kidney Disease. *Journal of the American Heart Association* **2018**, *7*, e007818, doi:10.1161/JAHA.117.007818.
130. Ando, M.; Iwata, A.; Ozeki, Y.; Tsuchiya, K.; Akiba, T.; Nihei, H. Circulating Platelet-Derived Microparticles with Procoagulant Activity May Be a Potential Cause of Thrombosis in Uremic Patients. *Kidney Int.* **2002**, *62*, 1757–1763, doi:10.1046/j.1523-1755.2002.00627.x.
131. Yang, K.; Du, C.; Wang, X.; Li, F.; Xu, Y.; Wang, S.; Chen, S.; Chen, F.; Shen, M.; Chen, M.; et al. Indoxyl Sulfate Induces Platelet Hyperactivity and Contributes to Chronic Kidney Disease-Associated Thrombosis in Mice. *Blood* **2017**, *129*, 2667–2679, doi:10.1182/blood-2016-10-744060.
132. Daniel, L.; Fakhouri, F.; Joly, D.; Mouthon, L.; Nusbaum, P.; Grunfeld, J.-P.; Schifferli, J.; Guillevin, L.; Lesavre, P.; Halbwachs-Mecarelli, L. Increase of Circulating Neutrophil and Platelet Microparticles during Acute Vasculitis and Hemodialysis. *Kidney Int.* **2006**, *69*, 1416–1423, doi:10.1038/sj.ki.5000306.
133. Caimi, G.; Canino, B.; Vaccaro, F.; Montana, M.; Carollo, C.; Oddo, G.; Lo Presti, R. Polymorphonuclear Cytosolic Ca(2+) Concentration before and after Activation in Chronic Renal Failure. *Nephron* **2000**, *85*, 371–372, doi:10.1159/000045696.
134. Favretto, G.; Cunha, R.S. da; Dalboni, M.A.; Oliveira, R.B. de; Barreto, F. de C.; Massy, Z.A.; Stinghen, A.E.M. Endothelial Microparticles in Uremia: Biomarkers and Potential Therapeutic Targets. *Toxins (Basel)* **2019**, *11*, doi:10.3390/toxins11050267.
135. Nomura, S.; Shouzu, A.; Nishikawa, M.; Kokawa, T.; Yasunaga, K. Significance of Platelet-Derived Microparticles in Uremia. *NEF* **1993**, *63*, 485–485, doi:10.1159/000187269.
136. Gao, C.; Xie, R.; Yu, C.; Ma, R.; Dong, W.; Meng, H.; Zhang, Y.; Si, Y.; Zhang, Z.; Novakovic, V.; et al. Thrombotic Role of Blood and Endothelial Cells in Uremia through Phosphatidylserine Exposure and Microparticle Release. *PLoS One* **2015**, *10*, e0142835, doi:10.1371/journal.pone.0142835.
137. Meijers, B.K.I.; Van Kerckhoven, S.; Verbeke, K.; Dehaen, W.; Vanrenterghem, Y.; Hoylaerts, M.F.; Evenepoel, P. The Uremic Retention Solute P-Cresyl Sulfate and Markers of Endothelial Damage. *Am. J. Kidney Dis.* **2009**, *54*, 891–901, doi:10.1053/j.ajkd.2009.04.022.
138. Zhan, R.; Leng, X.; Liu, X.; Wang, X.; Gong, J.; Yan, L.; Wang, L.; Wang, Y.; Wang, X.; Qian, L.-J. Heat Shock Protein 70 Is Secreted from Endothelial Cells by a Non-Classical Pathway Involving Exosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *387*, 229–233, doi:10.1016/j.bbrc.2009.06.095.
139. Ryu, J.-H.; Kim, S.-J. Clopidogrel Effectively Suppresses Endothelial Microparticle Generation Induced by Indoxyl Sulfate via Inhibition of the P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. *Blood Purif.* **2011**, *32*, 186–194, doi:10.1159/000326297.

140. Zhu, J.; Xie, R.; Piao, X.; Hou, Y.; Zhao, C.; Qiao, G.; Yang, B.; Shi, J.; Lu, Y. Homocysteine Enhances Clot-Promoting Activity of Endothelial Cells via Phosphatidylserine Externalization and Microparticles Formation. *Amino Acids* **2012**, *43*, 1243–1250, doi:10.1007/s00726-011-1196-4.
141. Xie, R.; Jia, D.; Gao, C.; Zhou, J.; Sui, H.; Wei, X.; Zhang, T.; Han, Y.; Shi, J.; Bai, Y. Homocysteine Induces Procoagulant Activity of Red Blood Cells via Phosphatidylserine Exposure and Microparticles Generation. *Amino Acids* **2014**, *46*, 1997–2004, doi:10.1007/s00726-014-1755-6.
142. Gao, C.; Ji, S.; Dong, W.; Qi, Y.; Song, W.; Cui, D.; Shi, J. Indolic Uremic Solutes Enhance Procoagulant Activity of Red Blood Cells through Phosphatidylserine Exposure and Microparticle Release. *Toxins (Basel)* **2015**, *7*, 4390–4403, doi:10.3390/toxins7114390.
143. Carmona, A.; Guerrero, F.; Buendia, P.; Obrero, T.; Aljama, P.; Carracedo, J. Microvesicles Derived from Indoxyl Sulfate Treated Endothelial Cells Induce Endothelial Progenitor Cells Dysfunction. *Front Physiol* **2017**, *8*, 666, doi:10.3389/fphys.2017.00666.
144. Sekuła, M.; Janawa, G.; Stankiewicz, E.; Stępień, E. Endothelial Microparticle Formation in Moderate Concentrations of Homocysteine and Methionine in Vitro. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **2011**, *16*, 69–78, doi:10.2478/s11658-010-0040-2.
145. Alique, M.; Bodega, G.; Corchete, E.; García-Menéndez, E.; de Sequera, P.; Luque, R.; Rodríguez-Padrón, D.; Marqués, M.; Portolés, J.; Carracedo, J.; et al. Microvesicles from Indoxyl Sulfate-Treated Endothelial Cells Induce Vascular Calcification in Vitro. *Comput Struct Biotechnol J* **2020**, *18*, 953–966, doi:10.1016/j.csbj.2020.04.006.
146. Di Marco, G.S.; König, M.; Stock, C.; Wiesinger, A.; Hillebrand, U.; Reiermann, S.; Reuter, S.; Amler, S.; Köhler, G.; Buck, F.; et al. High Phosphate Directly Affects Endothelial Function by Downregulating Annexin II. *Kidney Int.* **2013**, *83*, 213–222, doi:10.1038/ki.2012.300.
147. Shang, F.; Wang, S.-C.; Hsu, C.-Y.; Miao, Y.; Martin, M.; Yin, Y.; Wu, C.-C.; Wang, Y.-T.; Wu, G.; Chien, S.; et al. MicroRNA-92a Mediates Endothelial Dysfunction in CKD. *JASN* **2017**, *28*, 3251–3261, doi:10.1681/ASN.2016111215.
148. Addi, T.; Dou, L.; Burtey, S. Tryptophan-Derived Uremic Toxins and Thrombosis in Chronic Kidney Disease. *Toxins (Basel)* **2018**, *10*, doi:10.3390/toxins10100412.
149. Abbasian, N.; Burton, J.O.; Herbert, K.E.; Tregunna, B.-E.; Brown, J.R.; Ghaderi-Najafabadi, M.; Brunskill, N.J.; Goodall, A.H.; Bevington, A. Hyperphosphatemia, Phosphoprotein Phosphatases, and Microparticle Release in Vascular Endothelial Cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2015**, *26*, 2152–2162, doi:10.1681/ASN.2014070642.
150. Ryu, J.-H.; Park, H.; Kim, S.-J. The Effects of Indoxyl Sulfate-Induced Endothelial Microparticles on Neointimal Hyperplasia Formation in an Ex Vivo Model. *Ann Surg Treat Res* **2017**, *93*, 11–17, doi:10.4174/astr.2017.93.1.11.
151. Ryu, J.-H.; Jeon, E.-Y.; Kim, S.-J. Indoxyl Sulfate-Induced Extracellular Vesicles Released from Endothelial Cells Stimulate Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation by Inducing Transforming Growth Factor-Beta Production. *J. Vasc. Res.* **2019**, *56*, 129–138, doi:10.1159/000496796.
152. Soriano, S.; Carmona, A.; Triviño, F.; Rodriguez, M.; Alvarez-Benito, M.; Martín-Malo, A.; Alvarez-Lara, M.-A.; Ramírez, R.; Aljama, P.; Carracedo, J. Endothelial Damage and Vascular Calcification in Patients with Chronic Kidney Disease. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2014**, *307*, F1302–1311, doi:10.1152/ajprenal.00114.2014.
153. Goettsch, C.; Hutcheson, J.D.; Aikawa, M.; Iwata, H.; Pham, T.; Nykjaer, A.; Kjolby, M.; Rogers, M.; Michel, T.; Shibasaki, M.; et al. Sortilin Mediates Vascular Calcification

- via Its Recruitment into Extracellular Vesicles. *J Clin Invest* **2016**, *126*, 1323–1336, doi:10.1172/JCI80851.
154. Viegas, C.S.B.; Santos, L.; Macedo, A.L.; Matos, A.A.; Silva, A.P.; Neves, P.L.; Staes, A.; Gevaert, K.; Morais, R.; Vermeer, C.; et al. Chronic Kidney Disease Circulating Calciprotein Particles and Extracellular Vesicles Promote Vascular Calcification: A Role for GRP (Gla-Rich Protein). *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2018**, *38*, 575–587, doi:10.1161/ATVBAHA.117.310578.
 155. Rogers, M.A.; Buffolo, F.; Schlotter, F.; Atkins, S.K.; Lee, L.H.; Halu, A.; Blaser, M.C.; Tsolaki, E.; Higashi, H.; Luther, K.; et al. Annexin A1–Dependent Tethering Promotes Extracellular Vesicle Aggregation Revealed with Single–Extracellular Vesicle Analysis. *Science Advances* **2020**, *6*, eabb1244, doi:10.1126/sciadv.abb1244.
 156. Furmanik Malgorzata; Chatrou Martijn; van Gorp Rick; Akbulut Asim; Willems Brecht; Schmidt Harald; van Eys Guillaume; Bochaton-Piallat Marie-Luce; Proudfoot Diane; Biessen Erik; et al. Reactive Oxygen-Forming Nox5 Links Vascular Smooth Muscle Cell Phenotypic Switching and Extracellular Vesicle-Mediated Vascular Calcification. *Circulation Research* **2020**, *127*, 911–927, doi:10.1161/CIRCRESAHA.119.316159.
 157. Freise, C.; Querfeld, U.; Ludwig, A.; Hamm, B.; Schnorr, J.; Taupitz, M. Uraemic Extracellular Vesicles Augment Osteogenic Transdifferentiation of Vascular Smooth Muscle Cells via Enhanced AKT Signalling and PiT-1 Expression. *J Cell Mol Med* **2021**, *25*, 5602–5614, doi:10.1111/jcmm.16572.
 158. Alique, M.; Bodega, G.; Corchete, E.; García-Menéndez, E.; de Sequera, P.; Luque, R.; Rodríguez-Padrón, D.; Marqués, M.; Portolés, J.; Carracedo, J.; et al. Microvesicles from Indoxyl Sulfate-Treated Endothelial Cells Induce Vascular Calcification in Vitro. *Comput Struct Biotechnol J* **2020**, *18*, 953–966, doi:10.1016/j.csbj.2020.04.006.
 159. Buendía, P.; Montes de Oca, A.; Madueño, J.A.; Merino, A.; Martín-Malo, A.; Aljama, P.; Ramírez, R.; Rodríguez, M.; Carracedo, J. Endothelial Microparticles Mediate Inflammation-Induced Vascular Calcification. *FASEB J.* **2015**, *29*, 173–181, doi:10.1096/fj.14-249706.
 160. Alique, M.; Ruíz-Torres, M.P.; Bodega, G.; Noci, M.V.; Troyano, N.; Bohórquez, L.; Luna, C.; Luque, R.; Carmona, A.; Carracedo, J.; et al. Microvesicles from the Plasma of Elderly Subjects and from Senescent Endothelial Cells Promote Vascular Calcification. *Aging (Albany NY)* **2017**, *9*, 778–789, doi:10.18632/aging.101191.
 161. Bouchareb, R.; Boulanger, M.-C.; Fournier, D.; Pibarot, P.; Messaddeq, Y.; Mathieu, P. Mechanical Strain Induces the Production of Spheroid Mineralized Microparticles in the Aortic Valve through a RhoA/ROCK-Dependent Mechanism. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **2014**, *67*, 49–59, doi:10.1016/j.yjmcc.2013.12.009.
 162. Chen, N.X.; O'Neill, K.D.; Moe, S.M. Matrix Vesicles Induce Calcification of Recipient Vascular Smooth Muscle Cells through Multiple Signaling Pathways. *Kidney International* **2018**, *93*, 343–354, doi:10.1016/j.kint.2017.07.019.
 163. Kapustin Alexander N.; Davies John D.; Reynolds Joanne L.; McNair Rosamund; Jones Gregory T.; Sidibe Anissa; Schurgers Leon J.; Skepper Jeremy N.; Proudfoot Diane; Mayr Manuel; et al. Calcium Regulates Key Components of Vascular Smooth Muscle Cell–Derived Matrix Vesicles to Enhance Mineralization. *Circulation Research* **2011**, *109*, e1–e12, doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.238808.
 164. Hodroge, A.; Trécherel, E.; Cornu, M.; Darwiche, W.; Mansour, A.; Ait-Mohand, K.; Verissimo, T.; Gomila, C.; Schembri, C.; Da Nascimento, S.; et al. Oligogalacturonic Acid Inhibits Vascular Calcification by Two Mechanisms: Inhibition of Vascular Smooth Muscle Cell Osteogenic Conversion and Interaction With Collagen. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2017**, *37*, 1391–1401, doi:10.1161/ATVBAHA.117.309513.

165. Mansour, A.; Darwiche, W.; Yaker, L.; Da Nascimento, S.; Gomila, C.; Rossi, C.; Jung, V.; Sonnet, P.; Kamel, S.; Guerrero, I.C.; et al. GFOGER Peptide Modifies the Protein Content of Extracellular Vesicles and Inhibits Vascular Calcification. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, doi:10.3389/fcell.2020.589761.
166. Cui, L.; Rashdan, N.A.; Zhu, D.; Milne, E.M.; Ajuh, P.; Milne, G.; Helfrich, M.H.; Lim, K.; Prasad, S.; Lerman, D.A.; et al. End Stage Renal Disease-Induced Hypercalcemia May Promote Aortic Valve Calcification via Annexin VI Enrichment of Valve Interstitial Cell Derived-Matrix Vesicles. *J Cell Physiol* **2017**, *232*, 2985–2995, doi:10.1002/jcp.25935.
167. New, S.E.P.; Goettsch, C.; Aikawa, M.; Marchini, J.F.; Shibasaki, M.; Yabusaki, K.; Libby, P.; Shanahan, C.M.; Croce, K.; Aikawa, E. Macrophage-Derived Matrix Vesicles: An Alternative Novel Mechanism for Microcalcification in Atherosclerotic Plaques. *Circ Res* **2013**, *113*, 72–77, doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.301036.
168. Chen, Q.; Bei, J.-J.; Liu, C.; Feng, S.-B.; Zhao, W.-B.; Zhou, Z.; Yu, Z.-P.; Du, X.-J.; Hu, H.-Y. HMGB1 Induces Secretion of Matrix Vesicles by Macrophages to Enhance Ectopic Mineralization. *PLoS One* **2016**, *11*, doi:10.1371/journal.pone.0156686.
169. Bakhshian Nik, A.; Hutcheson, J.D.; Aikawa, E. Extracellular Vesicles As Mediators of Cardiovascular Calcification. *Front Cardiovasc Med* **2017**, *4*, 78, doi:10.3389/fcvm.2017.00078.
170. Schurgers, L.J.; Akbulut, A.C.; Kaczor, D.M.; Halder, M.; Koenen, R.R.; Kramann, R. Initiation and Propagation of Vascular Calcification Is Regulated by a Concert of Platelet- and Smooth Muscle Cell-Derived Extracellular Vesicles. *Front. Cardiovasc. Med.* **2018**, *5*, doi:10.3389/fcvm.2018.00036.
171. Yang, W.; Zou, B.; Hou, Y.; Yan, W.; Chen, T.; Qu, S. Extracellular Vesicles in Vascular Calcification. *Clin Chim Acta* **2019**, *499*, 118–122, doi:10.1016/j.cca.2019.09.002.
172. Krohn, J.B.; Hutcheson, J.D.; Martínez-Martínez, E.; Aikawa, E. Extracellular Vesicles in Cardiovascular Calcification: Expanding Current Paradigms. *J. Physiol. (Lond.)* **2016**, *594*, 2895–2903, doi:10.1113/JP271338.
173. Hutcheson, J.D.; Goettsch, C.; Bertazzo, S.; Maldonado, N.; Ruiz, J.L.; Goh, W.; Yabusaki, K.; Faits, T.; Bouten, C.; Franck, G.; et al. Genesis and Growth of Extracellular-Vesicle-Derived Microcalcification in Atherosclerotic Plaques. *Nature Materials* **2016**, *15*, 335–343, doi:10.1038/nmat4519.
174. Hou, Y.-C.; Lu, C.-L.; Zheng, C.-M.; Chen, R.-M.; Lin, Y.-F.; Liu, W.-C.; Yen, T.-H.; Chen, R.; Lu, K.-C. Emerging Role of Vitamins D and K in Modulating Uremic Vascular Calcification: The Aspect of Passive Calcification. *Nutrients* **2019**, *11*, 152, doi:10.3390/nu11010152.
175. Diagnostic de l'insuffisance rénale chronique chez l'adulte - Haute Autorité de Santé.
176. Levey, A.S.; Stevens, L.A.; Schmid, C.H.; Zhang, Y.L.; Castro, A.F.; Feldman, H.I.; Kusek, J.W.; Eggers, P.; Van Lente, F.; Greene, T.; et al. A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. *Ann Intern Med* **2009**, *150*, 604–612, doi:10.7326/0003-4819-150-9-200905050-00006.
177. Pisitkun, T.; Shen, R.-F.; Knepper, M.A. Identification and Proteomic Profiling of Exosomes in Human Urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 13368–13373, doi:10.1073/pnas.0403453101.
178. Fang, D.Y.; King, H.W.; Li, J.Y.; Gleadle, J.M. Exosomes and the Kidney: Blaming the Messenger. *Nephrology (Carlton)* **2013**, *18*, 1–10, doi:10.1111/nep.12005.
179. Dursun, I.; Yel, S.; Unsur, E. Dynamics of Circulating Microparticles in Chronic Kidney Disease and Transplantation: Is It Really Reliable Marker? *World J Transplant* **2015**, *5*, 267–275, doi:10.5500/wjt.v5.i4.267.

180. Gámez-Valero, A.; Lozano-Ramos, S.I.; Bancu, I.; Lauzurica-Valdemoros, R.; Borràs, F.E. Urinary Extracellular Vesicles as Source of Biomarkers in Kidney Diseases. *Front Immunol* **2015**, *6*, 6, doi:10.3389/fimmu.2015.00006.
181. Lin, J.; Li, J.; Huang, B.; Liu, J.; Chen, X.; Chen, X.-M.; Xu, Y.-M.; Huang, L.-F.; Wang, X.-Z. Exosomes: Novel Biomarkers for Clinical Diagnosis. *ScientificWorldJournal* **2015**, *2015*, 657086, doi:10.1155/2015/657086.
182. Zhang, W.; Zhou, X.; Zhang, H.; Yao, Q.; Liu, Y.; Dong, Z. Extracellular Vesicles in Diagnosis and Therapy of Kidney Diseases. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2016**, *311*, F844–F851, doi:10.1152/ajprenal.00429.2016.
183. Lyu, L.-L.; Feng, Y.; Liu, B.-C. Urinary Biomarkers for Chronic Kidney Disease with a Focus on Gene Transcript. *Chin. Med. J.* **2017**, *130*, 2251–2256, doi:10.4103/0366-6999.213965.
184. Barreiro, K.; Holthofer, H. Urinary Extracellular Vesicles. A Promising Shortcut to Novel Biomarker Discoveries. *Cell Tissue Res* **2017**, *369*, 217–227, doi:10.1007/s00441-017-2621-0.
185. Braun, F.; Rinschen, M.; Buchner, D.; Bohl, K.; Plagmann, I.; Bachurski, D.; Richard Späth, M.; Antczak, P.; Göbel, H.; Klein, C.; et al. The Proteomic Landscape of Small Urinary Extracellular Vesicles during Kidney Transplantation. *J Extracell Vesicles* **2020**, *10*, e12026, doi:10.1002/jev2.12026.
186. Palviainen, M.; Saraswat, M.; Varga, Z.; Kitka, D.; Neuvonen, M.; Puhka, M.; Joenväärä, S.; Renkonen, R.; Nieuwland, R.; Takatalo, M.; et al. Extracellular Vesicles from Human Plasma and Serum Are Carriers of Extravesicular Cargo—Implications for Biomarker Discovery. *PLOS ONE* **2020**, *15*, e0236439, doi:10.1371/journal.pone.0236439.
187. Lv, L.-L.; Cao, Y.; Liu, D.; Xu, M.; Liu, H.; Tang, R.-N.; Ma, K.-L.; Liu, B.-C. Isolation and Quantification of MicroRNAs from Urinary Exosomes/Microvesicles for Biomarker Discovery. *Int. J. Biol. Sci.* **2013**, *9*, 1021–1031, doi:10.7150/ijbs.6100.
188. Papadopoulos, T.; Belliere, J.; Bascands, J.-L.; Neau, E.; Klein, J.; Schanstra, J.P. MiRNAs in Urine: A Mirror Image of Kidney Disease? *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2015**, *15*, 361–374, doi:10.1586/14737159.2015.1009449.
189. Beltrami, C.; Clayton, A.; Phillips, A.O.; Fraser, D.J.; Bowen, T. Analysis of Urinary MicroRNAs in Chronic Kidney Disease. *Biochem. Soc. Trans.* **2012**, *40*, 875–879, doi:10.1042/BST20120090.
190. Abbasian, N.; Herbert, K.E.; Pawluczyk, I.; Burton, J.O.; Bevington, A. Vesicles Bearing Gifts: The Functional Importance of Micro-RNA Transfer in Extracellular Vesicles in Chronic Kidney Disease. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2018**, *315*, F1430–F1443, doi:10.1152/ajprenal.00318.2018.
191. Lv, L.-L.; Cao, Y.-H.; Ni, H.-F.; Xu, M.; Liu, D.; Liu, H.; Chen, P.-S.; Liu, B.-C. MicroRNA-29c in Urinary Exosome/Microvesicle as a Biomarker of Renal Fibrosis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2013**, *305*, F1220–1227, doi:10.1152/ajprenal.00148.2013.
192. Nelson, A.J.; Raggi, P.; Wolf, M.; Gold, A.M.; Chertow, G.M.; Roe, M.T. Targeting Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease. *J Am Coll Cardiol Basic Trans Science* **2020**, *5*, 398–412, doi:10.1016/j.jacbts.2020.02.002.
193. Takei, T.; Otsubo, S.; Uchida, K.; Matsugami, K.; Mimuro, T.; Kabaya, T.; Akiba, T.; Nitta, K. Effects of Sevelamer on the Progression of Vascular Calcification in Patients on Chronic Haemodialysis. *NEC* **2008**, *108*, c278–c283, doi:10.1159/000127361.
194. Caffarelli, C.; Montagnani, A.; Nuti, R.; Gonnelli, S. Bisphosphonates, Atherosclerosis and Vascular Calcification: Update and Systematic Review of Clinical Studies. *Clin Interv Aging* **2017**, *12*, 1819–1828, doi:10.2147/CIA.S138002.

195. Catalano, M.; O'Driscoll, L. Inhibiting Extracellular Vesicles Formation and Release: A Review of EV Inhibitors. *J Extracell Vesicles* **2019**, *9*, doi:10.1080/20013078.2019.1703244.
196. Cantaluppi, V.; Medica, D.; Mannari, C.; Stiacchini, G.; Figliolini, F.; Dellepiane, S.; Quercia, A.D.; Migliori, M.; Panichi, V.; Giovannini, L.; et al. Endothelial Progenitor Cell-Derived Extracellular Vesicles Protect from Complement-Mediated Mesangial Injury in Experimental Anti-Thy1.1 Glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* **2015**, *30*, 410–422, doi:10.1093/ndt/gfu364.
197. Deregibus, M.C.; Cantaluppi, V.; Calogero, R.; Lo Iacono, M.; Tetta, C.; Biancone, L.; Bruno, S.; Bussolati, B.; Camussi, G. Endothelial Progenitor Cell-Derived Microvesicles Activate an Angiogenic Program in Endothelial Cells by a Horizontal Transfer of mRNA. *Blood* **2007**, *110*, 2440–2448, doi:10.1182/blood-2007-03-078709.
198. Cantaluppi, V.; Gatti, S.; Medica, D.; Figliolini, F.; Bruno, S.; Deregibus, M.C.; Sordi, A.; Biancone, L.; Tetta, C.; Camussi, G. Microvesicles Derived from Endothelial Progenitor Cells Protect the Kidney from Ischemia-Reperfusion Injury by MicroRNA-Dependent Reprogramming of Resident Renal Cells. *Kidney International* **2012**, *82*, 412–427, doi:10.1038/ki.2012.105.
199. Corrêa, R.R.; Juncosa, E.M.; Masereeuw, R.; Lindoso, R.S. Extracellular Vesicles as a Therapeutic Tool for Kidney Disease: Current Advances and Perspectives. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, 5787, doi:10.3390/ijms22115787.
200. Yun, C.W.; Lee, S.H. Potential and Therapeutic Efficacy of Cell-Based Therapy Using Mesenchymal Stem Cells for Acute/Chronic Kidney Disease. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20071619.
201. Huang, Y.; Yang, L. Mesenchymal Stem Cells and Extracellular Vesicles in Therapy against Kidney Diseases. *Stem Cell Res Ther* **2021**, *12*, 219, doi:10.1186/s13287-021-02289-7.
202. Nassar, W.; El-Ansary, M.; Sabry, D.; Mostafa, M.A.; Fayad, T.; Kotb, E.; Temraz, M.; Saad, A.-N.; Essa, W.; Adel, H. Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Derived Extracellular Vesicles Can Safely Ameliorate the Progression of Chronic Kidney Diseases. *Biomater Res* **2016**, *20*, 21, doi:10.1186/s40824-016-0068-0.
203. Gatti, S.; Bruno, S.; Deregibus, M.C.; Sordi, A.; Cantaluppi, V.; Tetta, C.; Camussi, G. Microvesicles Derived from Human Adult Mesenchymal Stem Cells Protect against Ischaemia-Reperfusion-Induced Acute and Chronic Kidney Injury. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2011**, *26*, 1474–1483, doi:10.1093/ndt/gfr015.
204. He, J.; Wang, Y.; Sun, S.; Yu, M.; Wang, C.; Pei, X.; Zhu, B.; Wu, J.; Zhao, W. Bone Marrow Stem Cells-Derived Microvesicles Protect against Renal Injury in the Mouse Remnant Kidney Model. *Nephrology (Carlton)* **2012**, *17*, 493–500, doi:10.1111/j.1440-1797.2012.01589.x.
205. Choi, H.Y.; Lee, H.G.; Kim, B.S.; Ahn, S.H.; Jung, A.; Lee, M.; Lee, J.E.; Kim, H.J.; Ha, S.K.; Park, H.C. Mesenchymal Stem Cell-Derived Microparticles Ameliorate Peritubular Capillary Rarefaction via Inhibition of Endothelial-Mesenchymal Transition and Decrease Tubulointerstitial Fibrosis in Unilateral Ureteral Obstruction. *Stem Cell Res Ther* **2015**, *6*, 18, doi:10.1186/s13287-015-0012-6.
206. He, J.; Wang, Y.; Lu, X.; Zhu, B.; Pei, X.; Wu, J.; Zhao, W. Micro-Vesicles Derived from Bone Marrow Stem Cells Protect the Kidney Both in Vivo and in Vitro by MicroRNA-Dependent Repairing. *Nephrology (Carlton)* **2015**, *20*, 591–600, doi:10.1111/nep.12490.
207. Wang, B.; Yao, K.; Huuskens, B.M.; Shen, H.-H.; Zhuang, J.; Godson, C.; Brennan, E.P.; Wilkinson-Berka, J.L.; Wise, A.F.; Ricardo, S.D. Mesenchymal Stem Cells Deliver

- Exogenous MicroRNA-Let7c via Exosomes to Attenuate Renal Fibrosis. *Mol. Ther.* **2016**, *24*, 1290–1301, doi:10.1038/mt.2016.90.
208. Eirin, A.; Zhu, X.-Y.; Puranik, A.S.; Tang, H.; McGurran, K.A.; van Wijnen, A.J.; Lerman, A.; Lerman, L.O. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Attenuate Kidney Inflammation. *Kidney Int.* **2017**, *92*, 114–124, doi:10.1016/j.kint.2016.12.023.
209. Choi, H.Y.; Kim, T.Y.; Lee, M.; Kim, S.H.; Jhee, J.H.; Lee, Y.K.; Kim, H.J.; Park, H.C. Kidney Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Engineered to Express Erythropoietin Improve Renal Anemia in Mice with Chronic Kidney Disease. *Stem Cell Rev Rep* **2021**, doi:10.1007/s12015-021-10141-x.
210. Lener, T.; Gimona, M.; Aigner, L.; Börger, V.; Buzas, E.; Camussi, G.; Chaput, N.; Chatterjee, D.; Court, F.A.; Del Portillo, H.A.; et al. Applying Extracellular Vesicles Based Therapeutics in Clinical Trials - an ISEV Position Paper. *J Extracell Vesicles* **2015**, *4*, 30087, doi:10.3402/jev.v4.30087.
211. Alvarez-Erviti, L.; Seow, Y.; Yin, H.; Betts, C.; Lakhal, S.; Wood, M.J.A. Delivery of SiRNA to the Mouse Brain by Systemic Injection of Targeted Exosomes. *Nat Biotechnol* **2011**, *29*, 341–345, doi:10.1038/nbt.1807.
212. Wahlgren, J.; De L Karlson, T.; Brisslert, M.; Vaziri Sani, F.; Telemo, E.; Sunnerhagen, P.; Valadi, H. Plasma Exosomes Can Deliver Exogenous Short Interfering RNA to Monocytes and Lymphocytes. *Nucleic Acids Res* **2012**, *40*, e130, doi:10.1093/nar/gks463.
213. Ohno, S.; Takanashi, M.; Sudo, K.; Ueda, S.; Ishikawa, A.; Matsuyama, N.; Fujita, K.; Mizutani, T.; Ohgi, T.; Ochiya, T.; et al. Systemically Injected Exosomes Targeted to EGFR Deliver Antitumor MicroRNA to Breast Cancer Cells. *Mol Ther* **2013**, *21*, 185–191, doi:10.1038/mt.2012.180.
214. Yin, L.-M.; Wei, Y.; Wang, Y.; Xu, Y.-D.; Yang, Y.-Q. Long Term and Standard Incubations of WST-1 Reagent Reflect the Same Inhibitory Trend of Cell Viability in Rat Airway Smooth Muscle Cells. *Int J Med Sci* **2013**, *10*, 68–72, doi:10.7150/ijms.5256.
215. Sampson, D.L.; Chng, Y.L.; Upton, Z.; Hurst, C.P.; Parker, A.W.; Parker, T.J. The Highly Abundant Urinary Metabolite Urobilin Interferes with the Bicinchoninic Acid Assay. *Analytical Biochemistry* **2013**, *442*, 110–117, doi:10.1016/j.ab.2013.07.027.
216. Théry, C.; Amigorena, S.; Raposo, G.; Clayton, A. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Curr Protoc Cell Biol* **2006**, *Chapter 3*, Unit 3.22, doi:10.1002/0471143030.cb0322s30.
217. Chen, N.X.; O'Neill, K.D.; Chen, X.; Moe, S.M. Annexin-Mediated Matrix Vesicle Calcification in Vascular Smooth Muscle Cells. *J Bone Miner Res* **2008**, *23*, 1798–1805, doi:10.1359/jbmr.080604.
218. Chung, J.-H.; Kim, H.M. The Nobel Prize in Chemistry 2017: High-Resolution Cryo-Electron Microscopy. *Applied Microscopy* **2017**, *47*, 218–222, doi:10.9729/AM.2017.47.4.218.
219. Mastronarde, D.N. Automated Electron Microscope Tomography Using Robust Prediction of Specimen Movements. *J Struct Biol* **2005**, *152*, 36–51, doi:10.1016/j.jsb.2005.07.007.
220. Rupert, D.L.M.; Claudio, V.; Lässer, C.; Bally, M. Methods for the Physical Characterization and Quantification of Extracellular Vesicles in Biological Samples. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **2017**, *1861*, 3164–3179, doi:10.1016/j.bbagen.2016.07.028.
221. Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, V.; Feather-Stone, R.M. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochem Pharmacol* **1961**, *7*, 88–95, doi:10.1016/0006-2952(61)90145-9.

222. Ramsay, R.R.; Tipton, K.F. Assessment of Enzyme Inhibition: A Review with Examples from the Development of Monoamine Oxidase and Cholinesterase Inhibitory Drugs. *Molecules* **2017**, *22*, doi:10.3390/molecules22071192.
223. Dikalov, S.I.; Harrison, D.G. Methods for Detection of Mitochondrial and Cellular Reactive Oxygen Species. *Antioxid Redox Signal* **2014**, *20*, 372–382, doi:10.1089/ars.2012.4886.
224. Xie, Y.-J.; Shen, W.-B. In Vivo Imaging of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species Using Laser Scanning Confocal Microscopy. *Methods Mol Biol* **2012**, *913*, 191–200, doi:10.1007/978-1-61779-986-0_12.
225. Ray Sarkar, B.C.; Chauhan, U.P.S. A New Method for Determining Micro Quantities of Calcium in Biological Materials. *Analytical Biochemistry* **1967**, *20*, 155–166, doi:10.1016/0003-2697(67)90273-4.
226. Peterson, G.L. A Simplification of the Protein Assay Method of Lowry et al. Which Is More Generally Applicable. *Analytical Biochemistry* **1977**, *83*, 346–356, doi:10.1016/0003-2697(77)90043-4.
227. Cox, J.; Mann, M. MaxQuant Enables High Peptide Identification Rates, Individualized p.p.b.-Range Mass Accuracies and Proteome-Wide Protein Quantification. *Nat Biotechnol* **2008**, *26*, 1367–1372, doi:10.1038/nbt.1511.
228. Tyanova, S.; Temu, T.; Sinitcyn, P.; Carlson, A.; Hein, M.Y.; Geiger, T.; Mann, M.; Cox, J. The Perseus Computational Platform for Comprehensive Analysis of (Prote)Omics Data. *Nat Methods* **2016**, *13*, 731–740, doi:10.1038/nmeth.3901.
229. Pi, J.; Li, T.; Liu, J.; Su, X.; Wang, R.; Yang, F.; Bai, H.; Jin, H.; Cai, J. Detection of Lipopolysaccharide Induced Inflammatory Responses in RAW264.7 Macrophages Using Atomic Force Microscope. *Micron* **2014**, *65*, 1–9, doi:10.1016/j.micron.2014.03.012.
230. Yang, X.; Song, X.; Li, Z.; Liu, N.; Yan, Y.; Liu, B. Crosstalk between Extracellular Vesicles and Autophagy in Cardiovascular Pathophysiology. *Pharmacol Res* **2021**, 105628, doi:10.1016/j.phrs.2021.105628.
231. Lamark, T.; Kirkin, V.; Dikic, I.; Johansen, T. NBR1 and P62 as Cargo Receptors for Selective Autophagy of Ubiquitinated Targets. *Cell Cycle* **2009**, *8*, 1986–1990, doi:10.4161/cc.8.13.8892.
232. Fujii, T.; Mashimo, M.; Moriwaki, Y.; Misawa, H.; Ono, S.; Horiguchi, K.; Kawashima, K. Physiological Functions of the Cholinergic System in Immune Cells. *Journal of Pharmacological Sciences* **2017**, *134*, 1–21, doi:10.1016/j.jphs.2017.05.002.
233. Lee, S.J.; Lee, I.-K.; Jeon, J.-H. Vascular Calcification—New Insights into Its Mechanism. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, 2685, doi:10.3390/ijms21082685.
234. Cozzolino, M.; Mazzaferro, S.; Pugliese, F.; Brancaccio, D. Vascular Calcification and Uremia: What Do We Know? *AJN* **2008**, *28*, 339–346, doi:10.1159/000111827.
235. New, S.E.P.; Goettsch, C.; Aikawa, M.; Marchini, J.F.; Shibasaki, M.; Yabusaki, K.; Libby, P.; Shanahan, C.M.; Croce, K.; Aikawa, E. Macrophage-Derived Matrix Vesicles: An Alternative Novel Mechanism for Microcalcification in Atherosclerotic Plaques. *Circ Res* **2013**, *113*, 72–77, doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.301036.
236. Li, Y.; Sun, Z.; Zhang, L.; Yan, J.; Shao, C.; Jing, L.; Li, L.; Wang, Z. Role of Macrophages in the Progression and Regression of Vascular Calcification. *Front Pharmacol* **2020**, *11*, 661, doi:10.3389/fphar.2020.00661.
237. Castaneda, O.A.; Lee, S.-C.; Ho, C.-T.; Huang, T.-C. Macrophages in Oxidative Stress and Models to Evaluate the Antioxidant Function of Dietary Natural Compounds. *Journal of Food and Drug Analysis* **2017**, *25*, 111–118, doi:10.1016/j.jfda.2016.11.006.
238. Agharazii, M.; St-Louis, R.; Gautier-Bastien, A.; Ung, R.-V.; Mokas, S.; Larivière, R.; Richard, D.E. Inflammatory Cytokines and Reactive Oxygen Species as Mediators of

- Chronic Kidney Disease-Related Vascular Calcification. *American Journal of Hypertension* **2015**, *28*, 746–755, doi:10.1093/ajh/hpu225.
239. Aikawa, E.; Nahrendorf, M.; Figueiredo, J.-L.; Swirski, F.K.; Shtatland, T.; Kohler, R.H.; Jaffer, F.A.; Aikawa, M.; Weissleder, R. Osteogenesis Associates with Inflammation in Early-Stage Atherosclerosis Evaluated by Molecular Imaging in Vivo. *Circulation* **2007**, *116*, 2841–2850, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.732867.
240. Kawakami, R.; Katsuki, S.; Travers, R.; Romero, D.C.; Becker-Greene, D.; Passos, L.S.A.; Higashi, H.; Blaser, M.C.; Sukhova, G.K.; Buttigieg, J.; et al. S100A9-RAGE Axis Accelerates Formation of Macrophage-Mediated Extracellular Vesicle Microcalcification in Diabetes Mellitus. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **2020**, *40*, 1838–1853, doi:10.1161/ATVBAHA.118.314087.
241. Raschke, W.C.; Baird, S.; Ralph, P.; Nakoinz, I. Functional Macrophage Cell Lines Transformed by Abelson Leukemia Virus. *Cell* **1978**, *15*, 261–267, doi:10.1016/0092-8674(78)90101-0.
242. Lu, Y.-C.; Yeh, W.-C.; Ohashi, P.S. LPS/TLR4 Signal Transduction Pathway. *Cytokine* **2008**, *42*, 145–151, doi:10.1016/j.cyto.2008.01.006.
243. He, Y.; Hara, H.; Núñez, G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends Biochem Sci* **2016**, *41*, 1012–1021, doi:10.1016/j.tibs.2016.09.002.
244. Li, G.; Qiao, W.; Zhang, W.; Li, F.; Shi, J.; Dong, N. The Shift of Macrophages toward M1 Phenotype Promotes Aortic Valvular Calcification. *J Thorac Cardiovasc Surg* **2017**, *153*, 1318–1327.e1, doi:10.1016/j.jtcvs.2017.01.052.
245. Hsu, H.-Y.; Wen, M.-H. Lipopolysaccharide-Mediated Reactive Oxygen Species and Signal Transduction in the Regulation of Interleukin-1 Gene Expression*. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 22131–22139, doi:10.1074/jbc.M111883200.
246. Perico, L.; Wyatt, C.M.; Benigni, A. A New BEACON of Hope for the Treatment of Inflammation? The Endogenous Metabolite Itaconate as an Alternative Activator of the KEAP1-Nrf2 System. *Kidney Int* **2018**, *94*, 646–649, doi:10.1016/j.kint.2018.07.018.
247. Marques, F.M.; Figueira, M.M.; Schmitt, E.F.P.; Kondratyuk, T.P.; Endringer, D.C.; Scherer, R.; Fronza, M. In Vitro Anti-Inflammatory Activity of Terpenes via Suppression of Superoxide and Nitric Oxide Generation and the NF-KB Signalling Pathway. *Inflammopharmacology* **2019**, *27*, 281–289, doi:10.1007/s10787-018-0483-z.
248. Zhao, Q.; Qian, Y.; Li, R.; Tan, B.; Han, H.; Liu, M.; Qian, M.; Du, B. Norcantharidin Facilitates LPS-Mediated Immune Responses by up-Regulation of AKT/NF-KB Signaling in Macrophages. *PLoS One* **2012**, *7*, e44956, doi:10.1371/journal.pone.0044956.
249. PACHER, P.; BECKMAN, J.S.; LIAUDET, L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol Rev* **2007**, *87*, 315–424, doi:10.1152/physrev.00029.2006.
250. Aldridge, C.; Razzak, A.; Babcock, T.A.; Helton, W.S.; Espot, N.J. LPS-Stimulated RAW 264.7 Macrophage Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) and Nitric Oxide Production Is Decreased by an Omega-3 Fatty Acid Lipid Emulsion. *J Surg Res* **2008**, *149*, 296–302, doi:10.1016/j.jss.2007.12.758.
251. Liu, F.; Li, X.; Yue, H.; Ji, J.; You, M.; Ding, L.; Fan, H.; Hou, Y. TLR-Induced SMPD3 Defects Enhance Inflammatory Response of B Cell and Macrophage in the Pathogenesis of SLE. *Scand J Immunol* **2017**, *86*, 377–388, doi:10.1111/sji.12611.
252. Bell, C.R.; Jones, L.B.; Crenshaw, B.J.; Kumar, S.; Rowe, G.C.; Sims, B.; Javan, G.T.; Matthews, Q.L. The Role of Lipopolysaccharide-Induced Extracellular Vesicles in Cardiac Cell Death. *Biology (Basel)* **2019**, *8*, E69, doi:10.3390/biology8040069.
253. Liu, K.; Zhao, E.; Ilyas, G.; Lalazar, G.; Lin, Y.; Haseeb, M.; Tanaka, K.E.; Czaja, M.J. Impaired Macrophage Autophagy Increases the Immune Response in Obese Mice by

- Promoting Proinflammatory Macrophage Polarization. *Autophagy* **2015**, *11*, 271–284, doi:10.1080/15548627.2015.1009787.
254. Zhao, L.; Li, H.; Wang, Y.; Zheng, A.; Cao, L.; Liu, J. Autophagy Deficiency Leads to Impaired Antioxidant Defense via P62-FOXO1/3 Axis. *Oxid Med Cell Longev* **2019**, *2019*, 2526314, doi:10.1155/2019/2526314.
255. Nilsson, J. Cytokines and Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Cardiovasc Res* **1993**, *27*, 1184–1190, doi:10.1093/cvr/27.7.1184.
256. Barillari, G.; Albonici, L.; Incerpi, S.; Bogetto, L.; Pistrutto, G.; Volpi, A.; Ensoli, B.; Manzari, V. Inflammatory Cytokines Stimulate Vascular Smooth Muscle Cells Locomotion and Growth by Enhancing Alpha5beta1 Integrin Expression and Function. *Atherosclerosis* **2001**, *154*, 377–385, doi:10.1016/s0021-9150(00)00506-2.
257. Culotta, V.C.; Yang, M.; O'Halloran, T.V. Activation of Superoxide Dismutases: Putting the Metal to the Pedal. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2006**, *1763*, 747–758, doi:10.1016/j.bbamcr.2006.05.003.
258. Tallam, A.; Perumal, T.M.; Antony, P.M.; Jäger, C.; Fritz, J.V.; Vallar, L.; Balling, R.; Sol, A. del; Michelucci, A. Gene Regulatory Network Inference of Immunoresponsive Gene 1 (IRG1) Identifies Interferon Regulatory Factor 1 (IRF1) as Its Transcriptional Regulator in Mammalian Macrophages. *PLOS ONE* **2016**, *11*, e0149050, doi:10.1371/journal.pone.0149050.
259. Basler, T.; Jeckstadt, S.; Valentin-Weigand, P.; Goethe, R. Mycobacterium Paratuberculosis, Mycobacterium Smegmatis, and Lipopolysaccharide Induce Different Transcriptional and Post-Transcriptional Regulation of the IRG1 Gene in Murine Macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* **2006**, *79*, 628–638, doi:10.1189/jlb.0905520.
260. Németh, B.; Doczi, J.; Csete, D.; Kacso, G.; Ravasz, D.; Adams, D.; Kiss, G.; Nagy, A.M.; Horvath, G.; Tretter, L.; et al. Abolition of Mitochondrial Substrate-Level Phosphorylation by Itaconic Acid Produced by LPS-Induced Irg1 Expression in Cells of Murine Macrophage Lineage. *The FASEB Journal* **2016**, *30*, 286–300, doi:10.1096/fj.15-279398.
261. Song, H.; Xu, T.; Feng, X.; Lai, Y.; Yang, Y.; Zheng, H.; He, X.; Wei, G.; Liao, W.; Liao, Y.; et al. Itaconate Prevents Abdominal Aortic Aneurysm Formation through Inhibiting Inflammation via Activation of Nrf2. *EBioMedicine* **2020**, *57*, 102832, doi:10.1016/j.ebiom.2020.102832.
262. Lampropoulou, V.; Sergushichev, A.; Bambouskova, M.; Nair, S.; Vincent, E.E.; Loginicheva, E.; Cervantes-Barragan, L.; Ma, X.; Huang, S.C.-C.; Griss, T.; et al. Itaconate Links Inhibition of Succinate Dehydrogenase with Macrophage Metabolic Remodeling and Regulation of Inflammation. *Cell Metabolism* **2016**, *24*, 158–166, doi:10.1016/j.cmet.2016.06.004.
263. Mills, E.L.; Ryan, D.G.; Prag, H.A.; Dikovskaya, D.; Menon, D.; Zaslona, Z.; Jedrychowski, M.P.; Costa, A.S.H.; Higgins, M.; Hams, E.; et al. Itaconate Is an Anti-Inflammatory Metabolite That Activates Nrf2 via Alkylation of KEAP1. *Nature* **2018**, *556*, 113–117, doi:10.1038/nature25986.
264. Li, R.; Zhang, P.; Wang, Y.; Tao, K. Itaconate: A Metabolite Regulates Inflammation Response and Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2020**, *2020*, e5404780, doi:10.1155/2020/5404780.
265. Muri, J.; Wolleb, H.; Broz, P.; Carreira, E.M.; Kopf, M. Electrophilic Nrf2 Activators and Itaconate Inhibit Inflammation at Low Dose and Promote IL-1 β Production and Inflammatory Apoptosis at High Dose. *Redox Biology* **2020**, *36*, 101647, doi:10.1016/j.redox.2020.101647.

266. Tan, H.-Y.; Wang, N.; Li, S.; Hong, M.; Wang, X.; Feng, Y. The Reactive Oxygen Species in Macrophage Polarization: Reflecting Its Dual Role in Progression and Treatment of Human Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2016**, 2016, e2795090, doi:10.1155/2016/2795090.
267. Ren, W.; Wang, Z.; Hua, F.; Zhu, L. Plasminogen Activator Inhibitor-1 Regulates LPS-Induced TLR4/MD-2 Pathway Activation and Inflammation in Alveolar Macrophages. *Inflammation* **2015**, 38, 384–393, doi:10.1007/s10753-014-0042-8.
268. Wang, Z.-H.; Ren, W.-Y.; Zhu, L.; Hu, L.-J. Plasminogen Activator Inhibitor-1 Regulates LPS Induced Inflammation in Rat Macrophages through Autophagy Activation. *The Scientific World Journal* **2014**, 2014, e189168, doi:10.1155/2014/189168.
269. Gupta, K.K.; Xu, Z.; Castellino, F.J.; Ploplis, V.A. Plasminogen Activator Inhibitor-1 Stimulates Macrophage Activation through Toll-like Receptor-4. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2016**, 477, 503–508, doi:10.1016/j.bbrc.2016.06.065.
270. Vulin, A.I.; Stanley, F.M. Oxidative Stress Activates the Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 (PAI-1) Promoter through an AP-1 Response Element and Cooperates with Insulin for Additive Effects on PAI-1 Transcription*. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, 279, 25172–25178, doi:10.1074/jbc.M403184200.
271. Schneiderman, J.; Sawdey, M.S.; Keeton, M.R.; Bordin, G.M.; Bernstein, E.F.; Dilley, R.B.; Loskutoff, D.J. Increased Type 1 Plasminogen Activator Inhibitor Gene Expression in Atherosclerotic Human Arteries. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1992**, 89, 6998–7002, doi:10.1073/pnas.89.15.6998.
272. Lupu, F.; Bergonzelli, G.E.; Heim, D.A.; Cousin, E.; Genton, C.Y.; Bachmann, F.; Kruithof, E.K. Localization and Production of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Human Healthy and Atherosclerotic Arteries. *Arterioscler Thromb* **1993**, 13, 1090–1100, doi:10.1161/01.atv.13.7.1090.
273. Raghunath, P.N.; Tomaszewski, J.E.; Brady, S.T.; Caron, R.J.; Okada, S.S.; Barnathan, E.S. Plasminogen Activator System in Human Coronary Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **1995**, 15, 1432–1443, doi:10.1161/01.atv.15.9.1432.
274. Padró, T.; Steins, M.; Li, C.-X.; Mesters, R.M.; Hammel, D.; Scheld, H.H.; Kienast, J. Comparative Analysis of Plasminogen Activator Inhibitor-1 Expression in Different Types of Atherosclerotic Lesions in Coronary Arteries from Human Heart Explants. *Cardiovascular Research* **1997**, 36, 28–36, doi:10.1016/S0008-6363(97)00144-2.
275. Ouyang, L.; Zhang, K.; Chen, J.; Wang, J.; Huang, H. Roles of Platelet-Derived Growth Factor in Vascular Calcification. *J Cell Physiol* **2018**, 233, 2804–2814, doi:10.1002/jcp.25985.
276. Kochtebane, N.; Alzahrani, A.M.M.; Bartegi, A. Expression of UPA, TPA, and PAI-1 in Calcified Aortic Valves. *Biochemistry Research International* **2014**, 2014, e658643, doi:10.1155/2014/658643.
277. Meek, R.L.; Eriksen, N.; Benditt, E.P. Murine Serum Amyloid A3 Is a High Density Apolipoprotein and Is Secreted by Macrophages. *PNAS* **1992**, 89, 7949–7952, doi:10.1073/pnas.89.17.7949.
278. Reigstad, C.S.; Lundén, G.Ö.; Felin, J.; Bäckhed, F. Regulation of Serum Amyloid A3 (SAA3) in Mouse Colonic Epithelium and Adipose Tissue by the Intestinal Microbiota. *PLOS ONE* **2009**, 4, e5842, doi:10.1371/journal.pone.0005842.
279. Ye, R.D.; Sun, L. Emerging Functions of Serum Amyloid A in Inflammation. *Journal of Leukocyte Biology* **2015**, 98, 923–929, doi:10.1189/jlb.3VMR0315-080R.
280. Ebert, R.; Benisch, P.; Krug, M.; Zeck, S.; Meißner-Weigl, J.; Steinert, A.; Rauner, M.; Hofbauer, L.; Jakob, F. Acute Phase Serum Amyloid A Induces Proinflammatory

- Cytokines and Mineralization via Toll-like Receptor 4 in Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cell Research* **2015**, *15*, 231–239, doi:10.1016/j.scr.2015.06.008.
281. Zhang, X.; Chen, J.; Wang, S. Serum Amyloid A Induces a Vascular Smooth Muscle Cell Phenotype Switch through the P38 MAPK Signaling Pathway. *BioMed Research International* **2017**, *2017*, e4941379, doi:10.1155/2017/4941379.
 282. Tanaka, T.; Ikeda, K.; Yamamoto, Y.; Iida, H.; Kikuchi, H.; Morita, T.; Yamasoba, T.; Nagai, R.; Nakajima, T. Effects of Serum Amyloid a and Lysophosphatidylcholine on Intracellular Calcium Concentration in Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells. *Int Heart J* **2011**, *52*, 185–193, doi:10.1536/ihj.52.185.
 283. Karger, A.B.; Steffen, B.T.; Nomura, S.O.; Guan, W.; Garg, P.K.; Szklo, M.; Budoff, M.J.; Tsai, M.Y. Association Between Homocysteine and Vascular Calcification Incidence, Prevalence, and Progression in the MESA Cohort. *J Am Heart Assoc* **2020**, *9*, e013934, doi:10.1161/JAHA.119.013934.
 284. Chiang, J.-K.; Sung, M.-L.; Yu, H.-R.; Chang, H.-I.; Kuo, H.-C.; Tsai, T.-C.; Yen, C.-K.; Chen, C.-N. Homocysteine Induces Smooth Muscle Cell Proliferation through Differential Regulation of Cyclins A and D1 Expression. *J Cell Physiol* **2011**, *226*, 1017–1026, doi:10.1002/jcp.22415.
 285. Zhang, Y.; He, Y.; Zong, Y.; Guo, J.; Sun, L.; Ma, Y.; Dong, W.; Gui, L. 17 β -Estradiol Attenuates Homocysteine-Induced Oxidative Stress and Inflammatory Response as Well as MAPKs Cascade via Activating PI3-K/Akt Signal Transduction Pathway in Raw 264.7 Cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **2015**, *47*, 65–72, doi:10.1093/abbs/gmu124.
 286. Li, J.-J.; Li, Q.; Du, H.-P.; Wang, Y.-L.; You, S.-J.; Wang, F.; Xu, X.-S.; Cheng, J.; Cao, Y.-J.; Liu, C.-F.; et al. Homocysteine Triggers Inflammatory Responses in Macrophages through Inhibiting CSE-H2S Signaling via DNA Hypermethylation of CSE Promoter. *Int J Mol Sci* **2015**, *16*, 12560–12577, doi:10.3390/ijms160612560.
 287. Winchester, L.J.; Veeranki, S.; Givvimani, S.; Tyagi, S.C. Homocysteine Elicits an M1 Phenotype in Murine Macrophages through an EMMPRIN-Mediated Pathway. *Can J Physiol Pharmacol* **2015**, *93*, 577–584, doi:10.1139/cjpp-2014-0520.
 288. Au-Yeung, K.K.W.; Yip, J.C.W.; Siow, Y.L.; O, K. Folic Acid Inhibits Homocysteine-Induced Superoxide Anion Production and Nuclear Factor Kappa B Activation in Macrophages. *Can J Physiol Pharmacol* **2006**, *84*, 141–147, doi:10.1139/Y05-136.
 289. Khayati, K.; Antikainen, H.; Bonder, E.M.; Weber, G.F.; Kruger, W.D.; Jakubowski, H.; Dobrowolski, R. The Amino Acid Metabolite Homocysteine Activates MTORC1 to Inhibit Autophagy and Form Abnormal Proteins in Human Neurons and Mice. *FASEB J* **2017**, *31*, 598–609, doi:10.1096/fj.201600915R.
 290. Kurozumi, A.; Nakano, K.; Yamagata, K.; Okada, Y.; Nakayamada, S.; Tanaka, Y. IL-6 and SIL-6R Induces STAT3-Dependent Differentiation of Human VSMCs into Osteoblast-like Cells through JMJD2B-Mediated Histone Demethylation of RUNX2. *Bone* **2019**, *124*, 53–61, doi:10.1016/j.bone.2019.04.006.
 291. Gronthos, S.; Stewart, K.; Graves, S.E.; Hay, S.; Simmons, P.J. Integrin Expression and Function on Human Osteoblast-like Cells. *J Bone Miner Res* **1997**, *12*, 1189–1197, doi:10.1359/jbmr.1997.12.8.1189.
 292. Fromigué, O.; Brun, J.; Marty, C.; Da Nascimento, S.; Sonnet, P.; Marie, P.J. Peptide-Based Activation of Alpha5 Integrin for Promoting Osteogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry* **2012**, *113*, 3029–3038, doi:10.1002/jcb.24181.
 293. Acín-Pérez, R.; Iborra, S.; Martí-Mateos, Y.; Cook, E.C.L.; Conde-Garrosa, R.; Petcherski, A.; Muñoz, M.D.M.; Martínez de Mena, R.; Krishnan, K.C.; Jiménez, C.; et al. Fgr Kinase Is Required for Proinflammatory Macrophage Activation during Diet-Induced Obesity. *Nat Metab* **2020**, *2*, 974–988, doi:10.1038/s42255-020-00273-8.

294. Yoon, H.; Kim, H.-L.; Chun, Y.-S.; Shin, D.H.; Lee, K.-H.; Shin, C.S.; Lee, D.Y.; Kim, H.-H.; Lee, Z.H.; Ryoo, H.-M.; et al. NAA10 Controls Osteoblast Differentiation and Bone Formation as a Feedback Regulator of Runx2. *Nat Commun* **2014**, *5*, 5176, doi:10.1038/ncomms6176.

Résumé

La calcification vasculaire (CV) est un facteur de risque de morbi-mortalité notamment chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique (IRC). Lors de la CV, les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) changent de phénotype et sécrètent des vésicules extracellulaires (EVs) pro-calcifiantes. L'objectif de notre étude est de déterminer le rôle et le mécanisme d'action des EVs dans la propagation de l'inflammation et du stress oxydant au cours de la CV. Pour cela, une lignée murine de macrophages (RAW 264.7) a été traitée soit avec du lipopolysaccharide (LPS-EK) soit avec de l'homocystéine, toxine urémique accumulée chez les patients atteints d'IRC. Les EVs sécrétées par ces macrophages ont été isolées par ultracentrifugation et caractérisées en utilisant différentes techniques (TEM, cryo-EM, NTA, activité AChE, *Western Blot* CD9, CD81). Puis, une lignée murine de CMLV (MOVAS-1) a été incubée avec ces EVs afin d'étudier la CV en présence de phosphate inorganique (Pi 4 mM, 7 ou 14 jours). Nous avons montré que les EVs sécrétées par les macrophages traités avec du LPS-EK sont capables d'aggraver le processus de CV *via* l'induction d'un switch ostéogénique des CMLV et d'une réponse pro-inflammatoire et pro-oxydante. Par une étude protéomique, nous avons montré que ces EVs sont enrichies en cytokines pro-inflammatoires et en protéines impliquées dans l'inflammation (cis-aconitate décarboxylase, CAD), le stress oxydant (inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1, PAI-1) et la CV (protéine sérum amyloïde A-3, Saa3). Les EVs sécrétées après traitement par l'homocystéine augmentent également la calcification des CMLV mais leur composition protéique indique que le mécanisme d'action est indépendant du stress oxydant et vraisemblablement dépendante de l'IL-6. En conclusion, les EVs pourraient être une cible thérapeutique intéressante afin de limiter la CV chez les patients atteints d'IRC.

Mots clés : vésicules extracellulaires, calcification vasculaire, cellules musculaires lisses, inflammation, stress oxydant, toxines urémiques.

Abstract

Role of extracellular vesicles in the propagation of inflammation and oxidative stress during vascular calcification

Vascular calcification (VC) is a cardiovascular complication in patients with diseases such as chronic kidney disease (CKD). During VC, vascular smooth muscle cells (VSMCs) undergo an osteogenic switch and secrete a heterogeneous population of extracellular vesicles (EVs). The objective of our study is to determine the role and the mechanism of action of EVs in the propagation of inflammation and oxidative stress during the VC process. A macrophage murine cell line (RAW 264.7) was treated either with lipopolysaccharide-EK (LPS-EK) or homocysteine, a uremic toxin that accumulated in body fluids of CKD patients. EVs secreted by these macrophages were then collected by ultracentrifugation and characterized using several techniques (TEM, cryo-EM, NTA, AChE activity, *Western Blot* CD9, CD81). A murine VSMCs cell line (MOVAS-1) was incubated with these EVs to assess calcification in presence of inorganic phosphate (Pi 4mM, 7 or 14 days). We showed that EVs secreted by LPS-EK-treated macrophages were able to aggravate the VC process *via* the VSMC osteogenic switch and a pro-inflammatory and pro-oxidative response. Using MS-based proteomic, we demonstrated that these EVs were enriched in pro-inflammatory cytokines and in proteins involved in inflammation (cis-aconitate decarboxylase, CAD), oxidative stress (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1), and VC (serum amyloid A-3 protein, Saa3). EVs derived from homocysteine-treated macrophages were also able to aggravate VSMC calcification but their protein content demonstrated that the mechanism of action is independent of oxidative stress and probably dependant of IL-6. In conclusion, EVs could therefore be an interesting therapeutic target to limit VC in CKD patients.

Keywords: extracellular vesicles, vascular calcification, smooth muscle cells, inflammation, oxidative stress, uremic toxins.