



HAL
open science

Rôle d'un phospholipide spécifique des endosomes, le bis(monoacylglycéro)phosphate, dans le trafic vésiculaire endosomal -implication dans les dyslipidémies.

Maxence Rabia

► To cite this version:

Maxence Rabia. Rôle d'un phospholipide spécifique des endosomes, le bis(monoacylglycéro)phosphate, dans le trafic vésiculaire endosomal -implication dans les dyslipidémies.. Microbiologie et Parasitologie. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSEI098 . tel-04416346

HAL Id: tel-04416346

<https://theses.hal.science/tel-04416346>

Submitted on 25 Jan 2024

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

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



N°d'ordre

NNT : 2021LYSEI098

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

Opérée au sein de
L'INSA de Lyon

Ecole Doctorale N° ED 205

Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences Santé EDISS

Spécialité/ discipline de doctorat : BIOCHIMIE

Soutenue publiquement le 08/12/2021, par :

Maxence Rabia

Rôle d'un phospholipide spécifique des endosomes, le bis(monoacylglycéro)phosphate, dans le trafic vésiculaire endosomal - implication dans les dyslipidémies.

Devant le jury composé de :

Collet, Xavier
Alpy, Fabien
Van Niel, Guillaume

Directeur de Recherche INSERM
Chargé de Recherche INSERM
Directeur de Recherche CNRS

Président
Rapporteur
Rapporteur

Delton, Isabelle
Hullin-Matsuda, Françoise

Professeur des Universités INSA-Lyon
Chargé de Recherche INSERM

Directrice de thèse
Co-directrice de thèse

Département FEDORA – INSA Lyon - Ecoles Doctorales

SIGLE	ECOLE DOCTORALE	NOM ET COORDONNEES DU RESPONSABLE
CHIMIE	CHIMIE DE LYON https://www.edchimie-lyon.fr Sec. : Renée EL MELHEM Bât. Blaise PASCAL, 3e étage secretariat@edchimie-lyon.fr	M. Stéphane DANIELE C2P2-CPE LYON-UMR 5265 Bâtiment F308, BP 2077 43 Boulevard du 11 novembre 1918 69616 Villeurbanne directeur@edchimie-lyon.fr
E.E.A.	ÉLECTRONIQUE, ÉLECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE https://edeea.universite-lyon.fr Sec. : Stéphanie CAUVIN Bâtiment Direction INSA Lyon Tél : 04.72.43.71.70 secretariat.edeea@insa-lyon.fr	M. Philippe DELACHARTRE INSA LYON Laboratoire CREATIS Bâtiment Blaise Pascal, 7 avenue Jean Capelle 69621 Villeurbanne CEDEX Tél : 04.72.43.88.63 philippe.delachartre@insa-lyon.fr
E2M2	ÉVOLUTION, ÉCOSYSTÈME, MICROBIOLOGIE, MODELISATION http://e2m2.universite-lyon.fr Sec. : Sylvie ROBERJOT Bât. Atrium, UCB Lyon 1 Tél : 04.72.44.83.62 secretariat.e2m2@univ-lyon1.fr	M. Philippe NORMAND Université Claude Bernard Lyon 1 UMR 5557 Lab. d'Ecologie Microbienne Bâtiment Mendel 43, boulevard du 11 Novembre 1918 69 622 Villeurbanne CEDEX philippe.normand@univ-lyon1.fr
EDISS	INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTÉ http://ediss.universite-lyon.fr Sec. : Sylvie ROBERJOT Bât. Atrium, UCB Lyon 1 Tél : 04.72.44.83.62 secretariat.ediss@univ-lyon1.fr	Mme Sylvie RICARD-BLUM Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires (ICBMS) - UMR 5246 CNRS - Université Lyon 1 Bâtiment Raulin - 2ème étage Nord 43 Boulevard du 11 novembre 1918 69622 Villeurbanne Cedex Tél : +33(0)4 72 44 82 32 sylvie.ricard-blum@univ-lyon1.fr
INFOMATHS	INFORMATIQUE ET MATHÉMATIQUES http://edinfomaths.universite-lyon.fr Sec. : Renée EL MELHEM Bât. Blaise PASCAL, 3e étage Tél : 04.72.43.80.46 infomaths@univ-lyon1.fr	M. Hamamache KHEDDOUCI Université Claude Bernard Lyon 1 Bât. Nautibus 43, Boulevard du 11 novembre 1918 69 622 Villeurbanne Cedex France Tél : 04.72.44.83.69 hamamache.kheddouci@univ-lyon1.fr
Matériaux	MATÉRIAUX DE LYON http://ed34.universite-lyon.fr Sec. : Yann DE ORDENANA Tél : 04.72.18.62.44 yann.de-ordenana@ec-lyon.fr	M. Stéphane BENAYOUN Ecole Centrale de Lyon Laboratoire LTDS 36 avenue Guy de Collongue 69134 Ecully CEDEX Tél : 04.72.18.64.37 stephane.benayoun@ec-lyon.fr
MEGA	MÉCANIQUE, ÉNERGÉTIQUE, GENIE CIVIL, ACOUSTIQUE http://edmega.universite-lyon.fr Sec. : Stéphanie CAUVIN Tél : 04.72.43.71.70 Bâtiment Direction INSA Lyon mega@insa-lyon.fr	M. Jocelyn BONJOUR INSA Lyon Laboratoire CETHIL Bâtiment Sadi-Carnot 9, rue de la Physique 69621 Villeurbanne CEDEX jocelyn.bonjour@insa-lyon.fr
ScSo	ScSo* https://edsciencesociales.universite-lyon.fr Sec. : Mélina FAVETON INSA : J.Y. TOUSSAINT Tél : 04.78.69.77.79 melina.faveton@univ-lyon2.fr	M. Christian MONTES Université Lumière Lyon 2 86 Rue Pasteur 69365 Lyon CEDEX 07 christian.montes@univ-lyon2.fr

*ScSo : Histoire, Géographie, Aménagement, Urbanisme, Archéologie, Science politique, Sociologie, Anthropologie

Remerciements

Ma thèse a été financé par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche pendant 3 ans, et ma 4^{ème} année a été financé via un contrat d'ATER.

Je tiens tout d'abord à remercier les Docteurs Fabien ALPI et Guillaume VAN NIEL pour avoir accepté d'examiner et de juger mon manuscrit de thèse, et tout particulièrement le Docteur Xavier COLLET pour avoir accepté de présider mon jury de thèse.

J'ai effectué mes travaux de recherches au laboratoire CarMeN (Cardiovasculaire, Métabolisme, Diabètes et Nutrition), au sein de l'ancienne équipe 4 (intitulé), sur le site INSA. Je remercie le Dr Hubert VIDAL, directeur du laboratoire CarMeN, pour m'avoir permis de réaliser mon stage de deuxième année de master ainsi que ma thèse au sein de son laboratoire. J'y ai passé un peu moins de 5 ans, qui ont été riches en sciences et en émotions.

Un très grand merci à Françoise et Isabelle mes deux directrices, sans qui cette thèse aurait été bien différente. Je vous remercie toutes les deux pour m'avoir donné l'opportunité d'enseigner pendant ma thèse. Je vous remercie également pour m'avoir soutenu jusqu'au bout, pour toute l'aide et les corrections que vous m'avez apporté, surtout en cette fin de thèse, plus difficile que je ne l'avais imaginé.

Isabelle, je tiens à te remercier pour tout ce que tu m'as appris sur le BMP, le cholestérol, mais aussi pour l'aide apportée lors de mes préparations de présentations et mes rapports. J'ai énormément apprécié ton franc parler et ta précieuse aide pour recentrer le projet et le garder sur la bonne voie. Même si j'ai passé plus de temps avec Françoise, j'ai toujours su que tu étais là et que je pouvais compter sur toi.

Françoise, il n'y a pas de mots pour te remercier pour tout ce que tu as fait pour moi. Tu m'as accordé une très grande confiance dès mon stage de M2, que tu as conservé tout au long de ma thèse. Tu as été d'une patience à toute épreuve et ta passion pour la science m'a été d'une inspiration que je ne pourrais décrire. Pendant ces 5 dernières années, tu es resté bienveillante, adorable et tu as fait preuve d'une immense coolitude (même quand on perdait nos culots de vésicules extracellulaires...). Nos discussions scientifiques (ou non d'ailleurs) vont énormément me manquer.

Je remercie tous les membres de l'ancienne équipe 4 à l'INSA, j'ai passé de très bons moments et j'ai beaucoup appris à leur côté.

Annie je te remercie pour m'avoir appris la culture cellulaire. Mais aussi pour tous ce que tu as fait pendant ma thèse pour m'aider dans mes expériences.

Je remercie Céline pour tes connaissances sur le BMP et le cholestérol et lors de la préparation des présentations orale. Je remercie aussi Catherine, marie caroline et fabienne pour nos discussions à l'INSA comme à Lyon sud.

Et un merci tout particulier à Patrick, Sokunthea et Adina pour leur gentillesse, leur soutien et les moments passés ensemble. Un grand merci également à toi, Baptiste, pour toutes nos discussions autour de la LC-MS/MS et pour ton aide apporté à mon projet de thèse.

Un petit mot pour Chloé et Mélanie, mes voisines de bureau qui sont partit avant moi de l'INSA, mais que j'ai retrouvé à Lyon Sud. Je vous remercie pour tous ces fous rires et ces discussions dans le bureau. Grâce à vous, j'ai passé 4 belles années de thèse à CarMeN. Je vous souhaite plein de courage et de belles choses pour la suite dans vos vies professionnelles comme personnelles.

Je remercie l'équipe pédagogique de la plateforme de chimie de l'INSA, et celle de biochimie de l'UCBL. Vous m'avez accueilli et permis d'enseigné a des étudiant pendant cette thèse.

Je tiens aussi à remercier tous les membres du laboratoire CarMeN. Je n'ai malheureusement pas pu être beaucoup présent à Lyon SUD mais je remercie toute les personnes du laboratoire qui mon accueilli.

Je remercie Sophie qui m'a aidé en partageant son savoir sur les vésicules extracellulaires.

Je remercie Pascal pour m'avoir appris les techniques de purification des EV, toute nos discussions dans ton bureau à Lyon Sud quand j'étais encore à l'INSA.

Je remercie aussi Stéphanie et Aurélie qui m'ont accueilli (avec Pascal) à chaque fois que je venais de l'INSA dans leur bureau.

Je remercie Audrey qui m'a formé au Western blot.

Je remercie Vanessa et Monique qui m'ont permis de faire partie de la démarche qualité en devenant auditeur interne. Je n'ai pas pu faire beaucoup d'audit mais à chaque fois il était enrichissant.

Je remercie ma famille qui m'a soutenu tout au long de mon doctorat et qui m'a permis de réaliser les études que je souhaitais.

Je remercie également ma belle-famille qui m'a accueilli et soutenu pendant ces 4 années.

Enfin je te remercie Laura, pour m'avoir soutenu et poussé durant toute cette thèse, pour avoir supporté mon humeur et mon stress du début, à la fin. Mais aussi pour avoir participé à la relecture de ma thèse.

Résumé

Les cellules eucaryotes contiennent un système endolysosomal très organisé de compartiments membranaires communiquant entre eux et avec l'extérieur. L'identité de ces organelles est définie par des protéines ou des lipides caractéristiques présents à leur surface ou leur lumen. La voie d'endocytose joue un rôle central dans l'homéostasie cellulaire non seulement en permettant à la cellule d'internaliser des composés de l'extérieur, mais aussi en régulant l'utilisation, la dégradation et le recyclage des lipides et protéines. Le cholestérol va ainsi être distribué dans la cellule via les endolysosomes. Ce trafic intracellulaire est finement régulé, néanmoins il existe des dysfonctionnements endosomaux génétiques, alimentaires ou médicamenteux. Ces maladies de surcharge lysosomale entraînent une accumulation de lipides et de protéines dans les endolysosomes, conduisant à des perturbations métaboliques, des retards neuro-moteurs ou des décès précoces.

Le Bis(monoacylglycéro)phosphate (BMP) est un phospholipide atypique uniquement présent dans les endolysosomes, en particulier au niveau des vésicules internes endosomales. Ce lipide joue des rôles essentiels dans la voie endosomale, en participant à la sortie du cholestérol des endosomes et en régulant des enzymes du métabolisme lipidique. Cette thèse étudie son rôle dans le trafic vésiculaire endosomal. En effet, le BMP en permettant la fusion membranaire participe à la dynamique membranaire intraendosomale, favorisant ainsi la sortie du cholestérol des endosomes, et la formation des vésicules intraendosomales à l'origine des vésicules extracellulaires/exosomes.

Cette thèse a permis de caractériser le BMP, comme biomarqueur urinaire de dysfonctionnement endolysosomal induit par l'anti-arythmique amiodarone chez l'homme. De plus, le BMP a été détecté dans des exosomes provenant de différents modèles biologiques ce qui permet d'envisager son utilisation comme marqueur de l'origine endosomale des vésicules extracellulaires. Enfin, le rôle du BMP dans la formation des exosomes permettant le désengorgement des endosomes lors de surcharges endolysosomales a été étudié. Nos travaux suggèrent donc l'importance du BMP dans le contrôle de l'homéostasie lipidique en participant à la formation des vésicules extracellulaires/exosomes et son potentiel intérêt thérapeutique au cours des dyslipidémies.

Abstract

Role of an endosome-specific phospholipid, the bis(monoacylglycero)phosphate, in the endosomal vesicular trafficking - involvement in dyslipidemia

Eukaryotic cells contain a highly organized endolysosomal system of membrane compartments that communicate between them and with the cell outside. The identity of these organelles is defined by specific proteins or lipids present on their surface or their lumen. The endocytic pathway plays a central role in cellular homeostasis not only allowing internalization of material from the outside, but also controlling use, degradation and recycling of lipids and proteins. The cholesterol will thus be distributed in the cell via the endolysosomes. This intracellular traffic is finely regulated. However, there are genetic, dietary or drug-induced endosomal dysfunctions. These lysosomal storage diseases lead to an accumulation of lipids and proteins in the endolysosomes, resulting in metabolic disorders, neuromotor delays or early death.

Bis(monoacylglycero)phosphate (BMP) is an atypical phospholipid only present in endolysosomes, in particular in internal endosomal vesicles. This lipid plays essential roles in the endosomal pathway, by participating in cholesterol exit from endosomes and by regulating enzymes of lipid metabolism. This thesis studies its role in endosomal vesicular traffic. Indeed, BMP by allowing membrane fusion participates in intraendosomal membrane dynamics, thus promoting the release of cholesterol from endosomes, and the formation of intraendosomal vesicles at the origin of extracellular vesicles / exosomes.

This thesis work characterized BMP as a urinary biomarker of endolysosomal dysfunction induced by the anti-arrhythmic drug, amiodarone in humans. In addition, BMP has been detected in exosomes from different biological models, thus allowing to consider its use as a marker for the endosomal origin of extracellular vesicles. Finally, the role of BMP in the formation of exosomes allowing the clearing of endosomes during endolysosomal overload was studied. Our work therefore suggests the importance of BMP in the control of lipid homeostasis by participating in the formation of extracellular vesicles / exosomes and its potential therapeutic benefit in dyslipidemia.

Mots clés

Maladies cardiovasculaires, endocytose, maladies de surcharge lysosomale, endosome, Bis(monoacyglycéro)phosphate, trafic vésiculaire endosomal, cholestérol, biomarqueur urinaire, dysfonctionnement endolysosomal, exosomes, désengorgement des endosomes, dyslipidémies

Keywords

Cardiovascular diseases, endocytosis, lysosomal storage diseases, endosome, Bis(monoacylglycero)phosphate, endosomal vesicular traffic, urinary biomarker, endolysosomal dysfunction, exosomes, endosome unloading, dyslipidemia

Sommaire

Remerciements	3
Résumé	7
Abstract.....	8
Mots clés.....	9
Keywords.....	9
Sommaire.....	10
Liste des abréviations	19
Liste des tableaux	24
Liste des figures.....	29
PARTIE I -BIBLIOGRAPHIE.....	39
Introduction	40
Chapitre 1 : Généralités sur les lipides et les lipoprotéines	41
Introduction générale.....	41
1.1 Acides gras et acylglycérols	41
1.2 Glycérophospholipides/Phospholipides.....	46
1.2.1 Structure / nomenclature	46
1.2.2 Le polymorphisme des formes moléculaires des phospholipides.....	49
1.2.3 Rôle des phospholipides	50
1.2.4 Distribution tissulaire et cellulaire des phospholipides	52
1.3 Les sphingolipides (SL).....	56
1.4 Stérols	57
1.5 Lipoprotéines	58
Chapitre 2 : Voie endosomale.....	59
Introduction	59
2.1 Les processus d'endocytose.....	60

2.2	La voie endosomale	63
2.2.1	Caractéristiques des organites.....	63
2.2.2	De l’internalisation à la destruction : la dynamique du trafic endosomal	66
2.3	Dysfonction endolysosomal	71
2.3.1	Introduction générale	71
2.3.2	Maladies de surcharge lysosomale génétiques	72
2.3.3	Maladies de surcharge lysosomale médicamenteuses	75
2.3.4	Maladies de surcharge lysosomale alimentaires.....	77
Chapitre 3 : Cholestérol		79
Introduction		79
3.1	Informations génériques sur le cholestérol.....	79
3.1.1	Synthèse et structure	79
3.1.2	Localisation.....	81
3.2	Homéostasie du cholestérol	81
3.2.1	Apport du cholestérol.....	81
3.2.2	Régulation cellulaire du cholestérol	83
3.2.3	Devenir du cholestérol	86
3.3	Pathologies du métabolisme du cholestérol.....	87
Chapitre 4 : Les vésicules extracellulaires.....		88
Introduction		88
4.1	Historique, morphologie et purification des exosomes/vésicules extracellulaires	89
4.2	Composition des vésicules extracellulaires	92
4.3	Biogenèse des exosomes : les machineries moléculaires impliquées.....	93
4.4	Rôle des exosomes.....	97
4.4.1	Rôle physiologique	97
4.4.2	Rôle en pathologie	98
		11

4.4.3	Outils thérapeutiques et diagnostiques	100
Chapitre 5 : Le Bis(monoacylglycéro)phosphate (BMP)		102
Introduction		102
5.1	BMP : structure et nomenclature	102
5.1.1	Divergence de nomenclature	104
5.1.2	Composition en acide gras	105
5.1.3	Propriétés physico-chimiques	108
5.2	Métabolisme du BMP : synthèse et catabolisme	108
5.2.1	Synthèse	108
5.2.2	Catabolisme	111
5.3	Localisation du BMP	111
5.3.1	Intracellulaire	111
5.3.2	Extracellulaire	113
5.4	Rôle physiologique	113
5.4.1	Rôle dans l'endocytose et la dynamique membranaire des endolysosomes 113	
5.4.2	Rôle dans l'homéostasie et le trafic intracellulaire du cholestérol	115
5.4.3	Rôle du BMP dans les voies de dégradation intra- lysosomales	117
5.5	Applications médicales	119
5.5.1	Biomarqueur à but diagnostique et pronostic	119
5.5.2	Implication du BMP dans le désengorgement cellulaire	119
5.5.3	Implications thérapeutiques du BMP lors des infections virales	120
PARTIE II-MATERIELS ET METHODES		122
Chapitre 6 : Matériels et produits utilisés		123
6.1	Matériels spécifiques utilisés	123
6.2	Produits (chimiques et autres)	124
6.2.1	Standards lipidiques	124
		12

6.2.2	Divers réactifs chimiques.....	124
6.2.3	Produits pour culture cellulaire.....	125
6.2.4	Anticorps.....	125
6.3	Matériels biologiques	126
6.3.1	Cellules en culture :	126
6.3.1.1	Lignées cellulaires commerciales	126
6.3.1.1.1	Cellules RAW 264.7	127
6.3.1.1.2	Cellules HEK 293	127
6.3.1.1.3	Cellules THP-1	127
6.3.1.2	Cellules non transformées (primaires et assimilées).....	128
6.3.1.2.1	Fibroblastes de peau issus de sujets contrôles ou patients NPC128	
6.3.1.2.2	Cellules primaires monocytaires humaines	129
6.3.2	Produits biologiques :	129
6.3.2.1	Urines.....	129
6.3.2.2	Lipoprotéines	129
6.3.2.2.1	Préparation des LDL.....	129
6.3.2.2.2	Acétylation des LDL.....	130
6.3.3	Préparation des liposomes de phosphatidylglycérol.....	130
Chapitre 7 : Protocoles expérimentaux.....		131
7.1	Modification de la voie endosomale par des amines cationiques (amiodarone, chloroquine) : étude clinique et <i>in vitro</i>	131
7.1.1	Etude clinique	131
7.1.2	Etude <i>in vitro</i> (culture cellulaire).....	133
7.2	Modification de la voie endosomale par surcharge en cholestérol induite par les lipoprotéines et incubation en présence de liposomes de PG : étude <i>in vitro</i> (culture cellulaire)	

7.3	Modification de la voie endosomale par maladie génétique NPC : étude <i>in vitro</i>	134
Chapitre 8 :	Isolement des vésicules extracellulaires	135
8.1.1	Matériel utilisé	135
8.1.2	Préparation de milieu de culture avec sérum sans vésicule extracellulaire contaminante: « milieu EV Free ».....	135
8.1.3	Purification des vésicules extracellulaires par centrifugation différentielle et ultracentrifugation : gold standard /méthode de base.....	136
8.1.4	Purification de vésicules extracellulaires par ultracentrifugation avec d'un gradient de sucrose	139
8.1.5	Purification de vésicules extracellulaires par ultracentrifugation après une ultrafiltration (UF-UC).....	141
8.1.6	Purification de vésicules extracellulaires secrétées par des cellules par ultrafiltration suivie d'une chromatographie d'exclusion (UF-SEC).....	142
Chapitre 9 :	Analyses lipidiques	145
9.1	Extraction des lipides totaux.....	145
9.1.1	BMP-PG.....	145
9.1.2	Cholestérol-Phospholipides	146
9.2	Analyse par HPTLC	147
9.3	Analyse par LC-MS/MS	148
9.3.1	BMP-PG.....	148
9.3.2	Phospholipides	149
9.3.3	Analyse des lipides neutres.....	150
Chapitre 10 :	Analyse des protéines	150
10.1	Dosage des protéines.....	150
10.2	Analyse par western blot.....	151
10.2.1	Principe	151
10.2.2	Réactifs	152
		14

10.2.3	Méthode	153
10.3	Dosage de la créatinine	154
Chapitre 11 : Analyse par microscopie.....		154
11.1	Microscopie à fluorescence.....	154
11.2	<i>Procédures utilisées en Immunofluorescence</i>	154
11.2.1	<i>Fixation des cellules sur lamelles en verre</i>	154
11.2.2	Marquages cellulaire effectués	155
11.2.2.1	Marquage des compartiments acides des cellules par le LysoTracker Red DND-99_Molecular Probes	155
11.2.2.2	Marquage des endolysosomes avec des anticorps spécifiques	155
11.3	Microscopie électronique.....	156
Chapitre 12 : Analyse des vésicules extracellulaires par <i>nanoparticle tracking analysis</i>		158
Chapitre 13 : Analyses statistiques		158
PARTIE III-RESULTATS		159
Introduction générale.....		160
Chapitre 14 : BMP : Biomarqueur extracellulaire lors de dysfonctionnement endosomal induit par l'amiodarone.....		160
Introduction		160
14.1	Analyses préliminaires.....	161
14.2	Augmentation du BMP urinaire (étude humaine).....	164
Conclusion.....		170
Chapitre 15 : BMP : nouveau biomarqueur de vésicules extracellulaires issues des endosomes : les exosomes.....		172
Introduction		172
15.1	Avantages et limites des méthodes de purification des vésicules extracellulaires	173

15.2	BMP : nouveau biomarqueur d'exosomes urinaires ou secrétés par des cellules rénales	174
	Conclusion.....	180
15.3	BMP : nouveau biomarqueur d'exosomes secrétés par des macrophages RAW 264.7	181
15.3.1	Purification des EV par ultracentrifugation	181
15.3.2	Purification des EV par ultracentrifugation et gradient de sucrose (UC-G)	184
15.3.3	Purification des EV par ultrafiltration-chromatographie d'exclusion (UF-SEC)	187
15.3.4	Purification des EV par ultrafiltration-ultracentrifugation (UF-UC)....	189
	Conclusion.....	192
15.4	Isomérisation du BMP intracellulaire et extracellulaire	193
	Conclusion générale	197
Chapitre 16 : Implication du BMP dans la régulation du trafic endosomal des lipides		
199		
	Introduction	199
16.1	Etudes préliminaires des conditions de sécrétion des EV par les macrophages	200
16.1.1	Taux de BMP et cinétique de sécrétion des EV contenant du BMP.....	201
16.1.2	Taux de BMP et sécrétion du cholestérol associé aux EV	203
16.2	Effet du dysfonctionnement endo-lysosomal induit par des médicaments lysomotropiques (CAD) sur la sécrétion des EV par les macrophages RAW 264.7	206
16.2.1	Caractérisation des exosomes secrétés par les macrophages RAW 264.7 traités par des CAD	207
16.2.2	Variation de la composition lipidique des macrophages RAW 264.7 et des EV secrétées après traitement par les CAD	209
16.2.2.1	Effet sur le contenu et la composition du BMP	209

16.2.2.2	Effet sur le contenu intracellulaire et la sécrétion en cholestérol ..	212
16.2.2.3	Effet des CAD sur la composition en sphingolipides (SM et Cer) et glycérophospholipides (PC, PI, PE, PS) des cellules RAW et des exosomes sécrétés	213
16.2.2.3.1	Effet sur les sphingolipides :.....	213
16.2.2.3.2	Effet sur les glycérophospholipides :.....	220
Conclusion.....		233
16.3	Dysfonctionnement endo-lysosomal induit lors de surcharge en cholestérol génétique ou induite	235
Introduction		235
16.3.1	Dysfonctionnement endo-lysosomal induit par la maladie de Niemann-Pick de type C (fibroblastes humains).....	235
16.3.1.1	Caractérisation des exosomes sécrétés par des fibroblastes contrôles ou de NPC	236
16.3.1.2	Variation de la composition lipidique des fibroblastes contrôles et NPC	237
16.3.1.2.1	Effet sur le contenu et la composition du BMP des fibroblastes	237
16.3.1.3	Effet sur le contenu en cholestérol des fibroblastes.....	239
16.3.1.4	Effet sur le contenu en sphingolipides et glycérophospholipides des fibroblastes	240
16.3.1.4.1	Effet sur les sphingolipides.....	240
16.3.1.4.2	Effet sur les glycérophospholipides (PC, PE, PI, PS).....	242
16.3.1.5	Conclusion	245
16.3.2	Dysfonctionnement endo-lysosomal consécutif à une surcharge en cholestérol induite par différents traitements dans les macrophages RAW 264.7.....	246
Introduction		246

16.3.2.1	Caractérisation des exosomes sécrétés par les macrophages RAW	
264.7	lors de surcharge en cholestérol	248
16.3.2.2	Variation de la composition lipidique des cellules RAW et des	
	exosomes sécrétés lors de surcharge en cholestérol.....	251
16.3.2.2.1	Effet sur le contenu en cholestérol des macrophages et EV	
	sécrétées	251
16.3.2.2.2	Effet sur le contenu et la composition du BMP	254
	Conclusion.....	259
	PARTIE IV- CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	260
	ANNEXES	271
	Annexes 1: Article 1: <i>Bis(monoacylglycero)phosphate, a new lipid signature of</i>	
	<i>endosome-derived extracellular vesicles</i>	272
	Annexe 2: Article 2 : <i>Bis(monoacylglycero)phosphate, an important actor in the host</i>	
	<i>endocytic machinery hijacked by SARS-CoV-2 and related viruses</i>	290
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	307

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
%w/v	Pourcentage poids:volume
2D	Deux dimensions
ABHD6	<i>A/β Hydrolase domain-containing 6</i>
ACAT	<i>Acyl CoA: cholesterol acyltransferase</i>
acLDL	LDL acétylées
ADN	Acide désoxyribonucléique
AF 488	Alexa Fluor [™] 488
AFM	Microscopie à force atomique
ALG-2	<i>Apoptosis Linked gene 2</i>
ALIX	<i>Alg-2 interacting protein x</i>
ALT	Alanine aminotransférase
AP	Anticorps anti-phospholipides
APO	Apolipoprotéine
APS	Syndromes anti phospholipides
ARN	Acide ribonucléique
ASM	Sphingomyélinase acide
AST	Aspartate aminotransférase
ATCC	<i>American type culture collection</i>
ATP	Adénosine triphosphate
β2GPI	<i>β2 glycoprotein I</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
BHK	<i>Baby hamster Kidney</i>
BHT	Hydroxytoluène butylé
BMP	Bis(monoacylglycéro)phosphate
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CAD	<i>Cationic Amphiphilic drugs</i>
CarMeN	Cardiovasculaire, Métabolisme, Diabétologie et Nutrition
CBC Biotec	Centre de biotechnologie cellulaire et biothèque
CCM	Chromatographie sur couche mince
CCP	<i>Clathrin coat pit</i> fosse/puits recouvert (e) d'un manteau de clathrine
CCV	<i>Clathrin coat vesicle</i> vésicules entourées d'un manteau de clathrine
CD	Cluster de différenciation
CE	Energie de collision
Cer	Céramide
CIQLE	Centre d'imagerie quantitative Lyon-Est
CL	Cardiolipine
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CORVET	<i>Class C core Vacuole/Endosome Tethering factor</i>
COVID	Corona virus disease
CRB-HCL	Centre de Ressources Biologiques des Hôpitaux Civils de Lyon
cryoME	Cryo microscopie électronique

CXP	Potentiel de sortie de la cellule de collision
DAG	Diacylglycérol
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DHA	Acide docosahexaénoïque
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DP	Potentiel de dépolarisation
D-PDMP	D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol
DTT	Dithiothreitol
EC	Ester de cholestérol
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EE	<i>Early endosome</i> endosome précoce
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> , facteur de croissance épidermique
EMC	Endocytose médiée par la clathrine
EPCR	Récepteur endothélial à la protéine C
ER	Endosome de recyclage
ESCRT	Endosomal Sorting Complexes Required for Transport
ESI	Source électrospray
EV	Vésicules extracellulaires
EV free	Milieu sans vésicule extracellulaire
FC	Cholestérol libre
FFA	Acide gras libre
GC-FID	Chromatographie gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme
GM1	Ganglioside GM1
GTP	Guanosine triphosphate
HAM F10	"Mélange nutritif"
HCL	Hospices civils de Lyon
HCl	Acide chlorhydrique
HDL	<i>High density lipoprotein</i> lipoprotéine de forte densité
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HeLa	<i>Henrietta lacks cells</i>
HMG-CoA	Hydroxyméthylglutaryl-CoA
HOPS	<i>Late endosomal/lysosomal homotypic fusion and vacuole protein sorting</i>
HPLC	(<i>High performance liquid chromatography</i>) chromatographie liquide à haute performance
HPTLC	Chromatographie sur couche mince de haute performance
HRS	<i>Hepatocyte Growth Factor-regulated Tyrosine Kinase Substrate</i>
IDL	<i>Intermediate Density Lipoprotein</i> / lipoprotéine de densité intermédiaire
ILV	<i>Intraluminal vesicles</i> vésicules intraluminales
IMC	Indice de masse corporelle
INSA	Institut national des sciences appliquées
IPMC	<i>Intracellular plasma membrane-connected compartments</i> compartiments intracellulaires connectés à la membrane plasmique
IRF7	<i>Interferon regulatory factor 7</i>
IUBMB	<i>The International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>

IUPAC	<i>The International Union of Pure and Applied Chemists</i>
KBr	Bromure de potassium
LAL	Lipase acide lysosomale
LAMP	<i>Lysosomal associated membrane proteins</i>
LBPA	Acide lysobisphosphatidique
LC	Acide gras à longue chaîne
LC-MS/MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
LDL	<i>Low density lipoprotein</i> lipoprotéine de faible densité
LDL-R	LDL récepteur
LE	<i>Late endosome</i> endosome tardif
LIMP	<i>Lysosomal integral membrane proteins</i>
LPDS	<i>Lipoprotein deficient serum</i> :sérum déficient en lipoprotéine
LSD	<i>Lysosomal Storage Disorder</i> maladies de surcharge lysosomale
LXR	<i>Liver X receptor</i>
LyoPC	Lysophosphatidylcholine
MAFP	Méthoxy arachidonyl fluorophosphate
MAG	Monoacylglycérol
MCF-7	Cellule de cancer mammaire
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating-factor</i>
MEM	<i>Minimum essential media</i>
MET	Microscopie électronique à transmission
miR	Micro ARN
MLV	Liposomes multilamellaires
MP	Membrane plasmique
MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i>
MVB	<i>Multivesicular bodies</i> / corps multivésiculaires
NaCl	Chlorure de sodium
NASH	Stéatose hépatique non alcoolique
nCEH	Cholestéryl ester hydrolase neutre
NEAA	Acide aminé non essentiel
NFκB	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
NPC	Niemann-Pick de type C
nSMase2	Sphingomyelinase neutre
NTA	<i>Nanoparticle tracking analysis</i>
ORP	<i>OSBP Related protein</i>
OSBP	<i>Oxysterol-binding protein</i>
P/S	Pénicilline/ streptomycine
PBS	Phosphate buffered saline
PC	Phosphatidylcholine
PC-3	Cellule de cancer de la prostate
PCSK9	<i>Proprotein convertase subtilisin/kesin type 9</i>
PD-L1	<i>Program cell death ligand 1</i>
PE	Phosphatidyléthanolamine
PG	Phosphatidylglycérol

PGP synthase	<i>Phosphatidylglycerophosphate synthase</i>
PI	Phosphatidylinositol
PI3P	Phosphatidylinositol-3-Phosphate
PL	Phospholipides
PLA 1 ou 2	Phospholipase A 1 ou 2
PLRP2	<i>Pancreatic lipase-related protein 2</i>
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate
PS	Phosphatidylsérine
PVDF	Polyfluorure de vinylidène/ <i>polyvinylidene Fluoride</i>
RAB	<i>Ras-related in brain</i>
RE	Réticulum endoplasmique
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RPE	"Réactif de grade analytique"
RP-HPLC-MS/MS	Chromatographie liquide de haute performance en phase inverse couplée à la spectrométrie de masse
RVG	<i>Rabies virus glycoprotein</i>
SARS CoV-1	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
sem	Erreur standard de la moyenne
sh RNA-MC	<i>Short hairpin RNA</i>
SL	Sphingolipide
SM	Sphingomyéline
sn	Numérotation stéréochimique
SNAREs	<i>Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein receptor</i>
SNX9	<i>Sorting nexin</i>
SREBP2	<i>Sterol regulatory element binding protein 2</i>
SRM	<i>Single reaction monitoring</i>
StAR	<i>Steroidogenic acute regulatory protein</i>
STARD	<i>Star related lipid transfer domain containing protein</i>
SVF	Sérum de veau fœtal
TAG	triacylglycérol
TAR	<i>Transactivation response element RNA</i>
TBST	Tris buffer saline + tween 20
TEMED	N,n,n',n'-tetramethylethylenediamine
TGN	Réseau trans-Golgi
THM	<i>Tamm-Horsfall protein</i>
Transporteur	Transporteur ATP-binding cassette
ABC	
TRPS	<i>Tunable resistive pulse sensing</i>
TSG101	<i>Tumor susceptibility gene 101</i>
ULC	Acide gras à ultralongue chaîne
VAMP	<i>Vesicular associated membrane protein</i>
VAPS	<i>Vamp-associated proteins</i>
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

VLC	Acide gras à très longue chaîne
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i> lipoprotéine de très faible densité
VPS	Protéines vacuolaires
VSV	Virus de la stomatite vésiculaire
WHO	Organisation mondiale de la santé/ <i>World Health Organization</i>

Liste des tableaux

Tableau 1: Nomenclature des acides gras et acylglycérols (Fahy et al., 2005, 2009)	41
Tableau 2: liste des acides gras saturés	42
Tableau 3: liste des acide gras monoinsaturés (non exhaustive)	42
Tableau 4: liste des acides gras polyinsaturés (non exhaustive)	43
Tableau 5: classification des phospholipides (Fahy et al., 2005, 2009)	46
Tableau 6 - Composition et Position en acide gras du PC dans différents organes (% de chaque acide gras estérifié en position sn-1 ou sn-2) ; (lipid MAPS) ;1 : (Wood & Harlow, 1969b) ; 2 : (Kuksis et al., 1969) ; 3 : (Kuksis et al., 1968) ; 4 : (Marai & Kuksis, 1969) ; 5 : (Yabuuchi & O'Brien, 1968) ; 6 : (Kuksis & Marai, 1967)	54
Tableau 7 – Composition et Position des acides gras du PE dans différents organes (% chaque acide en position sn-1 ou sn-2) ; (lipid MAPS) ; 1 : (Wood & Harlow, 1969b) ; 2 : (Holub & Kuksis, 1969)	54
Tableau 8 - Proportion en acide gras du PI dans différente espèce animales masse % (% en masse de l'acide gras par rapport à la masse totale de PI) ; (lipid MAPS) 1 : (Holub et al., 1970) ; 2 : (W. Thompson & MacDonald, 1975) 3 : (Wood & Harlow, 1969a)	55
Tableau 9 - Position en acide gras du PS dans différentes espèces animales % de chaque acide gras estérifié en position sn-1 ou sn-2) ; (lipid MAPS) 1 : (Wood & Harlow, 1969a) ; 2 : (Yabuuchi & O'Brien, 1968)	55
Tableau 10 - Composition en acide gras du PG dans des poumons de différentes espèces animales (% en masse de l'acide gras par rapport à la masse total de PG) ; (lipid MAPS) ; (Okano & Akino, 1979)	55
Tableau 11 - Répartition en acide gras des SM dans différentes espèces animales (% en masse de l'acide gras par rapport à la masse total de SM) (Ramstedt et al., 1999)(lipid MAPS)	57
Tableau 12: tableau récapitulatif des différentes données physico-chimiques des lipoprotéines modifié de (Lipidmaps ; Arnal 2015 ; Bouvier 2008 ; (Masson, 2009))	59
Tableau 13 - Caractéristiques morphologiques et moléculaires des différents mécanismes d'endocytose (modifié de(Doherty & McMahon, 2009))	60
Tableau 14- Protéines humaines constituant les différents complexes ESCRT	67

Tableau 15: liste non exhaustive de LSD modifié de (Platt et al., 2018).....	74
Tableau 16: répartition cellulaire du cholestérol (van Meer et al., 2008)	81
Tableau 17 : liste des principales pathologies du cholestérol (Luo et al., 2020) ...	87
Tableau 18:Avantages et inconvénients des différentes techniques d'analyse des vésicules extracellulaires.....	91
Tableau 19: liste non exhaustive des protéines présentes dans les exosomes et leur fonctions (van Niel et al., 2018)	96
Tableau 20 : enrichissement en DHA du BMP exogène (% de DHA (% molaire par rapport au acide gras totaux du PL) modifié de (Besson et al., 2006; Bouvier et al., 2009)	105
Tableau 21 : Augmentation sélective du DHA contenu dans le BMP lors d'apport exogène (% de DHA (% molaire par rapport au acide gras totaux du PL) modifié de (Besson et al., 2006; Bouvier et al., 2009)	105
Tableau 22 : composition en acide gras du BMP dans différents tissus et cellules % massique(% en masse de l'acide gras par rapport à la masse totale de BMP) ; Lipid maps : 1 :(Wherrett & Huterer, 1973) ; 2 :(Huterer & Wherrett', 1979) ; 3 :(Luquain et al., 2000) ; 4 :(Brotherus & Renkonen, 1974)	107
Tableau 23: liste du matériel utilisé.....	123
Tableau 24: liste des différents standards lipidiques	124
Tableau 25: liste des anticorps utilisés.....	126
Tableau 26 : Caractéristiques des cellules de fibroblastes de patients NPC et sujets contrôles utilisés.....	128
Tableau 27: paramètres biologiques des sujets de l'étude clinique	132
Tableau 28: concentration et milieu des différentes conditions pour les expériences de perturbation de la voie endosomale par des amines cationiques.....	133
Tableau 29 : concentration et milieu des différentes conditions pour les expériences de surcharge en cholestérol	134
Tableau 30 : liste du matériel utilisé pour l'isolement des vésicules extracellulaires	135
Tableau 31: liste des pourcentages des différentes couches du gradient de sucre	140
Tableau 32: liste des réactifs pour le Western Blot.....	152

Tableau 33: Nombres d'expériences independantes et nombres de réplicats réalisés en fonction des études.	158
Tableau 34: liste des espèces moléculaires du BMP urinaire analysées pmol/μmol de créatinine, moyenne +/- sem ; groupe contrôle n= 12 ; groupe NASH n= 6 ; groupe Amiodarone (Amio) n= 24, * p<0.05 par rapport au groupe contrôle (Rabia et al., 2020) (HPLC-MS/MS).....	166
Tableau 35: avantages et inconvénients des techniques de purification de vésicules extracellulaires urinaires	173
Tableau 36: avantages et inconvénients des techniques de purification de vésicules extracellulaires secrétées par des cellules.....	174
Tableau 37 : tableau comparatif de la quantité de di-oléate BMP récolté en fonction du volume de surnageant de culture, moyenne +/- sem ; UF-UC : n=6, UF-SEC : n=3, UC-G : n=3.....	193
Tableau 38 : Caractéristiques des EV secrétées par les macrophages RAW 264.7 traités par l'amiodarone (Amio) et la chloroquine (CQ) (5μM , 48h de sécrétion) – les protéines des EV ont été dosées par la méthode de Bradford . Le nombre, diamètre et distribution de taille des vésicules ont été analysés par NTA et représentent les moyennes ± sem de 3 expériences ou ± écart moyen de 2 expériences (#), * p<0,05. D10, D50 et D90 indiquent que 10%, 50% et 90% des EV ont un diamètre (nm) inférieur à la moyenne indiquée.	208
Tableau 39 : quantification des espèces moléculaires du BMP en nmol/mg de protéines, moyenne +/- sem (un tableau se trouve en annexe pour la correspondance des acide gras), cellule RAW 264.7, analyse par HPLC-MS/MS	210
Tableau 40 : quantification des espèces moléculaires de céramides cellulaires en AU/mg de protéines, moyenne +/- sem, n=3.....	214
Tableau 41 : quantification des espèces moléculaires de céramides exosomales en AU/mg de prot, moyenne +/- sem, n=3, EV obtenu par UF-UC	216
Tableau 42 : espèces moléculaires des SM cellulaires en AU/mg de protéines, moyenne +/- sem, n=3 (RAW 264.7 ; HPLC-MS/MS).....	217
Tableau 43 : quantification des espèces moléculaires des SM exosomales en AU/mg de prot, moyenne +/- sem, n=3, EV obtenu par UF-UC (RAW 264.7 ; HPLC-MS/MS).....	219
Tableau 44 : quantification des espèces moléculaires des PC cellulaires en AU/mg de prot, moyenne +/- sem, n=3 (RAW 264.7 ; HPLC-MS/MS)	221
	26

Tableau 45 : quantification des espèces moléculaires des PC exosomales en AU/mg de prot, moyenne +/- sem, n=3, EV obtenu par UF-UC (RAW 264.7 ; HPLC-MS/MS)	223
Tableau 46 : quantification des espèces moléculaires des PE cellulaires en AU/mg de prot, moyenne +/- sem, n=3 (RAW 264.7 ; HPLC-MS/MS)	225
Tableau 47 : quantification des espèces moléculaires des PE exosomales en AU/mg de prot, moyenne +/- sem, n=3, EV obtenu par UF-UC (RAW 264.7 ; HPLC-MS/MS)	227
Tableau 48 : quantification des espèces moléculaires des PI cellulaires en AU/mg de prot, moyenne +/- sem, n=3 (RAW 264.7 ; HPLC-MS/MS)	228
Tableau 49 : quantification des espèces moléculaires des PI exosomales en AU/mg de prot, moyenne +/- sem, n=3, EV obtenu par UF-UC (RAW 264.7 ; HPLC-MS/MS)	230
Tableau 50 : quantification des espèces moléculaires des PS cellulaires en AU/mg de prot, moyenne +/- sem, n=3 (RAW 264.7 ; HPLC-MS/MS)	231
Tableau 51 : quantification des espèces moléculaires du BMP cellulaires en nmol/mg de prot, moyenne +/- sem, n=3 (un tableau se trouve en annexe pour la correspondance des acide gras), * pvalue <0.05. espèces considérées comme polyinsaturées	238
Tableau 52 : quantification des espèces moléculaires de céramides cellulaires en AU/mg de prot, moyenne +/- sem, n=3 (fibroblaste, HPLC-MS/MS)	240
Tableau 53 : quantification des espèces moléculaires des SM cellulaires en AU/mg de prot, moyenne +/- sem, n=3 (fibroblaste, HPLC-MS/MS)	241
Tableau 54 : quantification des espèces moléculaires des PC cellulaires en AU/mg de prot, moyenne +/- sem n=3 (fibroblaste, HPLC-MS/MS)	242
Tableau 55 : quantification des espèces moléculaires des PE cellulaires en AU/mg de prot, moyenne +/- sem, n=3 (fibroblaste, HPLC-MS/MS)	243
Tableau 56 : quantification des espèces moléculaires des PI cellulaires en AU/mg de prot, moyenne +/- sem, n=3 (fibroblaste, HPLC-MS/MS), * pvalue <0.05.	244
Tableau 57 : quantification des espèces moléculaires des PS cellulaires en AU/mg de prot, moyenne +/- sem, n=3 (fibroblaste, HPLC-MS/MS)	244
Tableau 58 : Caractéristiques des EV sécrétées par les macrophages RAW 264.7 traités avec des acLDL (50µg/mL 24h de pré incubation), du PG (30µM, 24H de pré incubation) et de l'U18666A (24h de préincubation +48h de sécrétion) associé ou non. – les protéines des EV ont été dosées par la méthode de Bradford. Le nombre, diamètre et distribution de taille des vésicules ont été analysés par NTA et représentent les moyennes	

± sem de 3 expériences, * p<0,05 pour les acLDL PG par rapport au acLDL, PG, et acLDL +U18666A..... 249

Tableau 59 : Quantification des espèces moléculaires du BMP cellulaire en nmol/mg de prot, moyenne +/- sem, contrôle n=6, PG n=3, aLDL U18 n =3, acLDL n =6, acLDL PG n=3 (un tableau se trouve en annexe pour la correspondance des acide gras) (RAW 264.7, HPLC-MS/MS)..... 256

Tableau 60 : liste des abréviation des acides gras présente dans les espèces moléculaires du BMP 300

Liste des figures

Figure 1 : Nomenclature des acides gras :cas de l'acide oléique : A : selon classification chimique en numérotant les carbones à partir du groupement carboxyl – COOH terminal et la position du 1er carbone d'une double liaison représentée par symbole Δ ; B : selon la nomenclature physiologique (nutritionnelle) ω (ou n) à partir du méthyl -CH ₃ terminal	43
Figure 2: Exemples d'acide gras saturé, mono et poly insaturé : A : acide octadécanoïque ; B : acide Cis-9-octadécénoïque ; C acide : Cis-6-9-octadecadiénoïque	44
Figure 3: synthèse des acides gras oméga-3 à partir de l'acide linoléique et des acides gras oméga 6 à partir de l'acide linoléique (modifié de Bouvier, 2008)	45
Figure 4: structure des acylglycérols : A :monoacylglycérol ;B :diacylglycérol ;C :triacylglycérol	45
Figure 5: Structures des principaux glycérophospholipides	48
Figure 6: schéma du polymorphisme des lipides A : forme conique inverse, entraine la formation de micelles, B : forme cylindrique, formation de bicouche ; C : forme conique, entraine la formation de phase hexagonale inverse source : (de Kroon et al., 2013; van den Brink-van der Laan et al., 2004)	49
Figure 7: A : Di-stéarate PE (1,2-di-stéroyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine) ; B: Di-oléate PE (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine)	51
Figure 8 : Structure de la sphingosine, d'un céramide et d'un sphingophospholipide : sphingomyéline.....	56
Figure 9: structure du noyau stérane	57
Figure 10 : Structure d'une lipoprotéine (ppt servier)	58
Figure 11: Endocytose médiée par la clathrine : 1 : reconnaissance ligand/récepteur ; 2 : recrutement des différents effecteurs : clathrines, lipides, protéines (Epsin, Numb ...) ; 3 : formation de la CCP et recrutement de la dynamine, des protéines BAR (SNX9 par exemple) ; 4 : clivage de la CCP et libération de la CCV, utilisation d'un GTP ; 5 : recyclage des clathrines par HSC 70, auxilin, utilisation d'un ATP ; 6 :vers la voie endosomale	62
Figure 12: Schéma simplifié de la voie endosomale	63
Figure 13 Formation de vésicules intra-luminales dans la voie endosomale	68

Figure 14: mouvement des endosomes : 1 : mouvement des endosome vers la membrane plasmique via la Kinésine ; 2 : déplacement des endosomes vers l'espace péri nucléaire via la Dynéine	69
Figure 15: Différents acteurs de la voie endosomale	71
Figure 16: schéma simplifié de la perturbation du trafic intracellulaire du cholestérol en cas de mutation des protéines endosomales NPC 1 et/ou NPC 2 (phénotype NPC)	73
Figure 17 : cliché de microscopie électronique de maladie de surcharge lysosomale (Breiden & Sandhoff, 2019); A : Macrophage alvéolaire de rat traité par le chlorphentermine observation de nombreux corps multilamellaires (Hook, 1991) ; B : corps multilamellaire d'une cellule chromaffine de rat traité par le 1 chloro-amitriptyline (Lüllmann et al., 1978).	76
Figure 18: Liste non exhaustive de Cationic Amphiphilic drugs	76
Figure 19: formation de la plaque d'athérome	78
Figure 20: Entrée dérégulée des LDL oxydées et modification du trafic intracellulaire du cholestérol	78
Figure 21: synthèse du cholestérol	80
Figure 22 : distribution intracellulaire du cholestérol	83
Figure 23: régulation du cholestérol intracellulaire, A : quantité de cholestérol intracellulaire trop importante régulation via LXR ; B : quantité de cholestérol intracellulaire faible régulation via SREBP2 ; * PCSK9 : régulation du cholestérol extracellulaire, lors d'une hypercholestérolémie	85
Figure 24 : schéma représentant les oxystérols les plus courants et leur formation enzymatique ou non. Ch25h, cholesterol 25-hydroxylase, CYP27: cholesterol 27-hydroxylase, CYP46: cholesterol 24-hydroxylase, CYP7A: cholesterol 7-hydroxylase; ROS, reactive oxygen species. (A. J. Brown & Jessup, 2009)	86
Figure 25 : schéma rassemblant les 3 types possibles de sécrétion d'exosomes de taille compris entre 30-200 nm ; 1 : bourgeonnement direct de la membrane plasmique lié à la formation de domaines membranaires ; 2 : fusion des MVB avec la membrane plasmique ; 3 : IPMC (compartiments intracellulaires connectés à la membrane plasmique) modifié de (Pegtel & Gould, 2019)	95
Figure 26 : A : structure du Bis(monoacylglycéro)phosphate ; B : structure du Phosphatidylglycérol	103

Figure 27: A : structure du BMP; B : structure théorique de l'acide lysobisphosphatidique.....	104
Figure 28 : sn-(3- hydroxy-2- docosaheptaenoyl)-glycerol-1-phospho-sn-1'-(3'-hydroxy-2'- docosaheptaenoyl)-glycerol.....	106
Figure 29 : sn-(3- hydroxy-2-oleoyl)-glycerol-1-phospho-sn-1'-(3'- hydroxy-2'-oleoyl)-glycerol.....	107
Figure 30 : schéma possible synthèse BMP (Amidon et al., 1996), TA : activité transacétylase, ROE : enzyme de réorientation	110
Figure 31 : localisation intracellulaire du BMP, d'après (Kobayashi et al., 1998), marquage immunologique couplé à un immunogold dirigé contre le BMP présent dans les endosomes tardifs	112
Figure 32: distribution dans les endosomes tardifs du BMP, dans des cellule HeLa. Immunogold dirigé contre le BMP via l'anticorps 6C4 (anti-BMP), taille des billes d'or 10 nm source (Gruenberg, 2020).....	112
Figure 33 - Empilement de lipides (ganglioside GM1 et BMP) dépendant du pH (d'après Hayakawa et al., 2007).....	114
Figure 34 : schéma de la préparation du milieu EV free	136
Figure 35: schéma de la purification des EV secrétées par des cellules par la méthode de base (ajout possible d'une pré-centrifugation à 200g, 15 min à RT pour éliminer les cellules flottantes)	137
Figure 36: schéma de la purification des EV dans des urines	138
Figure 37: purification par gradient de sucrose d'EV secrétées par des cellules	140
Figure 38: schéma de la purification d'EV secrétées par des cellules par ultrafiltration suivis d'ultracentrifugation.....	141
Figure 39: schéma de la purification de vésicules extracellulaires secrétées par des cellules par ultrafiltration suivie d'une chromatographie d'exclusion	143
Figure 40: schéma simplifié montrant les différentes techniques de purification des EV secrétées par des cellules	144
Figure 41: schéma d'extraction du BMP et du PG.....	146
Figure 42: fragmentation du BMP et du PG; A : fragmentation du BMP en deux MAG; B : fragmentation du PG en un DAG	149
Figure 43: schéma du principe du marquage par immunogold et cliché de microscopie électronique	157

Figure 44 : quantité de créatinine urinaire en mol.L-1, moyenne +/- sem ; groupe contrôle n= 12 ; groupe NASH n= 6 ; groupe Amiodarone (Amio) n= 24. (Rabia et al., 2020).....	162
Figure 45: différence en di-DHA BMP entre les surnageants * (200g) des urines et les urines totales en pmol/μmol de créatinine, moyenne +/- sem ; A : groupe contrôle n=12 ; B groupe NASH n=6 ; C groupe amiodarone n=24 (Rabia et al., 2020) (HPLC-MS/MS)	162
Figure 46 : différence en di-DHA BMP dans les urines en fonction du genre, en pmol/μmol de créatinine, moyenne +/- sem; A : groupe contrôle : femme n=6 homme n=6 ; B groupe NASH : femme n=3 homme n=3 ; C groupe amiodarone : femme n=14 homme n=10 (Rabia et al., 2020) (HPLC-MS/MS)	163
Figure 47: différence en BMP total dans les urines, en fonction du genre, en pmol/μmol de créatinine, moyenne +/- sem; A : groupe contrôle : femme n=6 homme n=6 ; B groupe NASH : femme n=3 homme n=3 ; C groupe amiodarone : femme n=14 homme n=10 (Rabia et al., 2020) (HPLC-MS/MS)	163
Figure 48: quantité en di-DHA BMP dans les urines , en pmol/μmol de créatinine, moyenne +/- sem ; groupe contrôle n= 12 ; groupe NASH n= 6 ; groupe Amiodarone (Amio) n= 24, * p<0.05 par rapport au groupe contrôle et au groupe NASH (Rabia et al., 2020) (HPLC-MS/MS)	164
Figure 49: quantité de BMP total dans les urines, en pmol/μmol de créatinine, moyenne +/- sem ; groupe contrôle n= 12 ; groupe NASH n= 6 ; groupe Amiodarone (Amio) n= 24, * p<0.05 par rapport au groupe contrôle et au groupe NASH (Rabia et al., 2020) (HPLC-MS/MS)	165
Figure 50 : répartition de l'insaturation des espèces moléculaires du BMP urinaire en fonction des groupes, valeur en %, *p<0.05 par rapport au groupe contrôle (Rabia et al., 2020)	168
Figure 51: clichés de fluorescence avec anti- BMP (vert) et marquage des compartiments acides par le lysotracker (rouge); A : monocytes primaires humains différenciés en macrophages; B : THP1 différenciés en macrophages; traités avec ou sans 10 μM d'amiodarone. (Rabia et al., 2020)	169
Figure 52: A : augmentation du di-DHA BMP des surnageants des urines du groupe amiodarone par rapport au groupe contrôle ; B : augmentation du di-DHA BMP des vésicules extracellulaires du groupe amiodarone par rapport au groupe contrôle ; C :	32

augmentation des protéines totales des vésicules extracellulaires du groupe amiodarone par rapport au groupe contrôle ; valeur « fold d'augmentation par rapport au contrôle +/- sem, *p<0.05, EV obtenu par UC-DTT (Rabia et al., 2020) (quantification du BMP par HPLC-MS/MS)..... 175

Figure 53: caractérisation par western blot des marqueurs exosomaux des EV urinaires obtenues par UC-DTT, 1 : marqueur de poids moléculaire ; 2,3,4 : EV de sujets contrôles ; 5,6,7 : EV de sujets sous amiodarone. Dépôts réalisés à volume égal : 15µL. marqueur utilisé : ALIX, CD63, TSG101, CD81(Rabia et al., 2020) 176

Figure 54: Marquage immunogold sur des vésicules extracellulaires urinaires obtenues par UC-DTT: A : immunogold avec anticorps anti- CD63, taille des billes d'or 10 nm, B : immunogold avec anticorps anti-BMP, taille des billes d'or 10 nm, C : comarquage immunogold avec anticorps anti-CD63, taille des billes d'or 5 nm, et anticorps anti- BMP, taille des billes d'or 15 nm (Rabia et al., 2020) 177

Figure 55: Marquage immunogold sur des vésicules extracellulaires urinaires obtenues par UC-DTT: A : immunogold avec anticorps anti-BMP, taille des billes d'or 10 nm, B : immunogold avec anticorps anti-CD81, taille des billes d'or 10 nm, C (images de droite): comarquage immunogold avec anticorps anti-CD81, taille des billes d'or 5 nm, et anticorps anti-BMP, taille des bille d'or 15 nm (Rabia et al., 2020)..... 178

Figure 56 : Marquage immunogold sur des vésicules extracellulaires sécrétées par des cellules HEK 293et purifiées par UC : A : immunogold avec anticorps anti-CD63, taille des billes d'or 10 nm, B : immunogold avec anticorps anti-BMP, taille des billes d'or 10 nm, C : comarquage immunogold avec anticorps anti-CD63, taille des billes d'or 5 nm, et anticorps anti-BMP, taille des billes d'or 15 nm, (Rabia et al., 2020) 179

Figure 57: viabilité cellulaire : A :compte cellulaire (10^6 cellules/ T150) moyenne +/- sem, n=3 ; B : mortalité cellulaire (% de cellules mortes) moyenne +/- sem, n=3 (RAW 264.7)..... 181

Figure 58 : A : quantité de di-oléate BMP intracellulaire en fonction du temps de sécrétion des cellules RAW 264.7; B: quantité de di-oléate BMP contenu dans les EV obtenues par UC en fonction du temps de sécrétion des cellules RAW 264.7 (analyse du BMP par HPLC-MS/MS, expérience représentative) 182

Figure 59 : caractérisation par western blot de la présence des marqueurs exosomaux ALIX et TSG101, dans des EV sécrétées par les cellules RAW 264.7 et

purifiées par UC ; dépôt réalisé à protéine égale pour les cellules (48h : 31µg, 72h : 24,4µg), et pour les EV (48h : 8,1µg, 72h : 7,2 µg)..... 183

Figure 60: A: quantité de di-oléate BMP dans les différentes fractions obtenues à la suite du gradient de sucrose des EV sécrétées pendant 48 h par les cellules RAW 264.7 (analyse par HPLC-MS/MS); B : caractérisation de la présence d'exosomes par western blot, dans les différentes fractions du gradient de sucrose à l'aide des marqueurs exosomaux ALIX (95kDa) et TSG101(45kDa) ; dépôts réalisés à protéines équivalentes :fraction : 1, 2, 3, 4, 5, 9, 10, 11 =0µg, fraction 3 =19,3µg, fraction 6=1,35µg, fraction 7=20,3µg, fraction 8=20,4µg..... 185

Figure 61: comparaison de la pureté et de l'enrichissement en EV avant et après gradient de sucrose des EV sécrétées pendant 48h par les cellules RAW 264.7; A : échantillon d'EV avant gradient de sucrose ; B : fraction d'un gradient de sucrose enrichie en marqueurs exosomaux et BMP. Voir ci-dessous la partie agrandie (cadre vert) 186

Figure 62: immunogold dirigé contre le BMP sur une fraction riche en BMP après gradient de sucrose des EV sécrétées pendant 48h par les cellules RAW 264.7, (cf figure 60 fraction n°3), taille des billes 10nm..... 186

Figure 63: caractérisation de la présence d'exosomes par western blot dans les fractions de la SEC obtenu à partir d'EV sécrétées pendant 48h par les cellules RAW 264.7, marqueurs exosomaux utilisés ALIX, CD63 et CD81. (Western blot ; représentatif de 3 expériences), EV urines = EV urinaires purifiées (contrôle positif), dépôts réalisés à volume équivalent : 15µL 187

Figure 64 : quantité de di-oléate BMP (nmol/mg de protéines)quantifié par HPLC-MS/MS des différentes fractions d'éluion de la SEC (n=3), moyenne +/- sem, EV obtenues par UF-SEC (RAW 264.7) 188

Figure 65 : comparaison de la quantité de di-oléate BMP exprimé en nmol/mg de protéines (A) dans les cellules RAW 264.7 et (B) dans les EV sécrétées apres 48h et purifiées par UF-UC. Moyenne +/- sem, n=3, valeur proteines : cellules : 66,430 +/- 22,543 µg; EV : 138,56 +/- 16,58µg. 189

Figure 66 : caractérisation par western blot de la présence des marqueurs exosomaux ALIX et TSG101 dans des EV sécrétées par les cellules RAW 264.7 et purifié par UF-UC, dépôts réalisés à volume équivalent : 15µL 190

Figure 67 : A : immunogold avec l'anticorps anti-BMP (bille de 10nm) ; B : immunogold avec l'anticorps anti-CD63 (bille de 10nm) ; C : comarquage immunogold avec l'anticorps anti-BMP (bille de 15nm) et avec l'anticorps anti-CD36 (bille de 5nm), EV sécrétées par les cellules RAW 264.7 et purifiées par UF-UC	191
Figure 68 : A : immunogold avec l'anticorps anti-BMP (bille de 10nm) ; B : immunogold avec l'anticorps anti-ALIX (bille de 10nm) ; C : comarquage immunogold avec l'anticorps anti-BMP (bille de 15nm) et avec l'anticorps anti-ALIX (bille de 5nm), EV sécrétées par les cellules RAW 264.7 et purifiées par UF-UC	191
Figure 69 : structure des différents isomères du BMP ; A: sn-2:sn-2' BMP, B: sn-3:sn-2' BMP, C: sn-2:sn-3' BMP; D: sn-3:sn-3' BMP	193
Figure 70: chromatogramme de l'espèce di-myristate BMP (étalon interne dans l'analyse du BMP)(HPLC-MS/MS)	194
Figure 71 : chromatogramme de l'espèce di-DHA BMP dans les cellules RAW 264.7(HPLC-MS/MS).....	194
Figure 72 : % isomérisation du BMP en fonction de l'échantillon ; urine : isomérisation du di-DHA BMP n=42 ; EV urine : isomérisation du di-DHA BMP n = 6. EV RAW 264.7 : isomérisation du di-oléate BMP n= 6 ; cellule RAW 264.7 : isomérisation du di-oléate BMP n=6 ; Fibroblaste : isomérisation du di-DHA BMP n=6., EV RAW 264.7 obtenu par UF-UC, EV urine obtenu par UC-DTT, analyse du BMP par HPLC-MS/MS	195
Figure 73 : localisation membranaire du BMP au niveau des vésicules intraluminales (intracellulaire) et des EV (extracellulaire).....	196
Figure 74 : viabilité cellulaire (RAW 264.7) : A :compte cellulaire (10^6 cellules/t150) moyenne +/- sem, n=3 ; B : mortalité cellulaire (% de cellules mortes) moyenne +/- sem, n=3.....	201
Figure 75 : A : quantité de di-oléate BMP intracellulaire (HPLC-MS/MS) ; B : quantité de di-oléate BMP dans les EV (HPLC-MS/MS) ; en nmol/mg de protéines moyenne, n=1, EV obtenu par UC,.....	202
Figure 76 : caractérisation de la présence d'exosome par western blot, marqueur utilisés ALIX et TSG101, dépôts réalisés à protéine égale, EV obtenu par UC sécrétées par des cellules RAW 264.7	202
Figure 77 : A : quantité de cholestérol intracellulaire : B :quantité de cholestérol dans les EV ; en μ g/mg de protéines valeur moyenne, n=1, EV obtenu par UC sécrétées par les cellules RAW 264.7, analyse par HPLC-MS/MS.....	203

Figure 78: A : quantité de di-oléate BMP (pmol) (HPLC-MS/MS) et cholestérol (µg) (GC-FID) lors de la purification d'EV par gradient de sucrose; B : caractérisation de la présence d'exosomes par western blot, marqueurs utilisés ALIX et TSG101 n=1, dépôts réalisés à protéines équivalentes : 15µg, EV obtenu par UC-G sécrétées par des cellules RAW 264.7	204
Figure 79: Analyse par HPTLC des lipides des EV sécrétées pendant 48h et 72h par les macrophages RAW contrôles (Cont) ou incubés pendant 24h avec 30µM de PG (PG) . A : détection des lipides par la primuline à 365nm ; B : détection des stérols par un mélange de FeCl₃ :H₂SO₄ :CH₃COOH, chauffé pendant 5min à 100°C	205
Figure 80 : caractérisation de la présence d'exosomes par western blot, marqueurs utilisés ALIX , TSG101 et CD81 . n=3, 1 western blot représentative, dépôts réalisés à volume égales v=15µL, EV obtenu par UF-UC sécrétées par des cellules RAW 264.7.	207
Figure 81 : Différence significative des espèces moléculaires du BMP analysées entre les différents traitements p<0.05, moyenne +/- sem, n=3, analyse par HPLC-MS/MS, cellule RAW 264.7	210
Figure 82 : A : quantité de BMP dans les exosomes en nmol/mg de protéines, moyenne +/- sem, n=3 ; B : quantité de BMP dans les exosomes en nmol/million de cellules, moyenne +/- sem, n=3, EV obtenu par UF-UC sécrétées par les cellule RAW 264.7, analyse par GC-FID	211
Figure 83 : quantité de cholestérol cellulaire en AU/mg de protéines, moyenne +/- sem, n=3, Cellule RAW 264.7, analyse par GC-FID	212
Figure 84 : A : quantité de cholestérol dans les exosomes en AU/mg de protéines, moyenne +/- sem, n=3 ; B : quantité de cholestérol dans les exosomes en AU/million de cellules, moyenne +/- sem, n=3, EV obtenu par UF-UC (RAW 264.7) (GC-FID)	213
Figure 85 : Différence significative des espèces moléculaire des céramides cellulaires analysées entre les différents traitements p<0.05, moyenne +/- sem, n=3.....	215
Figure 86 : Différence significative des espèces moléculaire des céramides exosomales analysées entre les différents traitements p<0.05, moyenne +/- sem, n=3, EV obtenu par UF-UC (RAW 264.7) (GC-FID)	216
Figure 87 : Différence significative des espèces moléculaire des SM cellulaires analysées entre les différents traitements p<0.05, moyenne +/- sem, n=3 (RAW 264.7 ; HPLC-MS/MS)	218

Figure 88 : Différence significative des espèces moléculaire des SM exosomales analysées entre les différents traitements $p < 0.05$, moyenne +/- sem, n=3, EV obtenu par UF-UC (RAW 264.7 ; HPLC-MS/MS)	220
Figure 89 : Différence significative des espèces moléculaires de PC cellulaires analysées entre les différents traitements $p < 0.05$, moyenne +/- sem, n=3 (RAW 264.7 ; HPLC-MS/MS)	222
Figure 90 : Différence significative des espèces moléculaires des PC exosomales analysées entre les différents traitements $p < 0.05$, moyenne +/- sem, n=3, EV obtenu par UF-UC (RAW 264.7 ; HPLC-MS/MS)	224
Figure 91 : Différence significative des espèces moléculaire des PE cellulaires analysées entre les différents traitements $p < 0.05$, moyenne +/- sem, n=3 (RAW 264.7 ; HPLC-MS/MS)	226
Figure 92 : Différence significative des espèces moléculaires des PI cellulaires analysées entre les différents traitements $p < 0.05$, moyenne +/- sem, n=3 (RAW 264.7 ; HPLC-MS/MS)	229
Figure 93 : Différence significative des espèces moléculaire des PI exosomales analysées entre les différents traitements $p < 0.05$, moyenne +/- sem, n=3, EV obtenu par UF-UC (RAW 264.7 ; HPLC-MS/MS)	230
Figure 94 : Différence significative des espèces moléculaire des PE cellulaires analysées entre les différents traitements $p < 0.05$, moyenne +/- sem, n=3 (RAW 264.7 ; HPLC-MS/MS)	232
Figure 95 : caractérisation de la présence d'exosomes par western blot, marqueurs utilisés CD63 et CD81, dépôts réalisés à volume égal $v = 15\mu\text{L}$, un western blot représentatif (n=3), EV obtenu par UF-UC (fibroblastes)	236
Figure 96 : quantité de cholestérol cellulaire en AU/mg de protéines, moyenne +/- sem, n=3 (fibroblaste, GC-FID)	239
Figure 97 : caractérisation de la présence d'exosomes par western blot, marqueurs utilisés ALIX et TSG101, dépôts réalisés à volume égales $v = 15\mu\text{L}$, western blot représentatif (n=3), EV obtenu par UF-UC (RAW 264.7).....	249
Figure 98 : quantité de cholestérol cellulaire en AU/mg de protéines, moyenne +/- sem, contrôle n=6, PG n=3, aLDL U18 n =3, acLDL n =6, acLDL PG n=3 (RAW 264.7, GC-FID)	252

Figure 99 : A : quantité de cholestérol exosomal en AU/mg de protéines, moyenne +/- sem, contrôle n=6, PG n=3, aLDL U18 n=3, acLDL n =6, acLDL PG n=3 ; B : quantité de cholestérol en AU/million de cellules, moyenne +/- sem, contrôle n=6, PG n=3, aLDL U18 n =3, acLDL n =6, acLDL PG n=3, EV obtenu par UF-UC (RAW 264.7, GC-FID)	253
Figure 100 : Différences significatives des espèces moléculaires du BMP cellulaires analysées entre les différent traitement p<0.05, moyenne +/- sem , contrôle n=6, PG n=3, aLDL U18 n =3, acLDL n =6, acLDL PG n=3 (RAW 264.7, HPLC-MS/MS)	257
Figure 101 : A : Quantité de di-oléate BMP exosomal en nmol/mg de protéines, moyenne +/- sem , contrôle n=6, PG n=3, aLDL U18 n =3, acLDL n =6, acLDL PG n=3; différences significatives entre les différents traitements p<0.05 ; B : quantité de BMP exosomale en nmol/million de cellules, moyenne +/- sem, contrôle n=6, PG n=3, aLDL U18 n =3, acLDL n =6, acLDL PG n=3, différences significatives entre les différents traitements p<0.05 , EV obtenu par UF-UC (RAW 264.7, HPLC-MS/MS)	258
Figure 102 : caractérisation de la présence d'exosomes par western blot, marqueur utilisé ALIX et TSG101, western blot entier des figure 60 et 77	300
Figure 103 : caractérisation de la présence d'exosomes par western blot, marqueur utilisé ALIX et TSG101, western blot entier des figure 67 et 98	301
Figure 104 : caractérisation de la présence d'exosomes par western blot, marqueur utilisé ALIX, TSG101 et CD81, western blot entier des figure 81, 98	302

PARTIE I -BIBLIOGRAPHIE

Introduction

Les maladies métaboliques sont les 1^{ère} causes de mortalité mondiale. Elles résultent notamment du mode de vie moderne associé à la sédentarité, une alimentation trop riche, un environnement polluant, auxquels s'ajoutent parfois des problèmes génétiques. L'alimentation trop riche en sucres, lipides et protéines, combinée à une activité physique insuffisante est un facteur de risque reconnu et de nombreuses études portent sur la régulation de l'alimentation, c'est-à-dire des apports équilibrés associant le bon taux et la qualité des nutriments consommés. Le laboratoire CarMeN (Cardiovasculaire, Métabolisme, Diabétologie et Nutrition) concentre ses recherches sur certaines maladies métaboliques et leurs liens avec les pathologies cardiovasculaires (laboratoire CarMeN), dans le but de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu et développer des outils thérapeutiques. Dans ce contexte général de physiopathologie des maladies métaboliques, notre équipe de recherche se concentre sur les déséquilibres lipidiques, les dyslipidémies, d'origine génétique, médicamenteuse ou bien liées à l'alimentation, qui engendrent une surcharge lipidique, et en particulier une dérégulation de l'homéostasie du cholestérol. Le cholestérol peut être synthétisé *de novo* par les cellules notamment au niveau hépatique mais est aussi apporté aux cellules par endocytose des lipoprotéines circulantes. Cette voie endosomale est donc essentielle mais peut être perturbée lors de maladies métaboliques (diabète, syndrome métabolique) ou bien génétiques (les maladies de surcharge lysosomale par exemple). Notre équipe étudie plus particulièrement les mécanismes de transport du cholestérol dans la voie endosomale, et plus particulièrement le rôle d'un phospholipide spécifique de cette voie, le bis(monoacylglycéro)phosphate. La finalité étant de mieux appréhender le trafic endosomal et développer des outils ou stratégies pour lutter contre les dyslipidémies de surcharge lipidique.

Chapitre 1 : Généralités sur les lipides et les lipoprotéines

Introduction générale

Ce chapitre est dédié aux lipides en général, et présente une revue succincte de différentes classes de lipides. Parmi eux, les lipides amphiphiles possédant une partie hydrophobe et une partie hydrophile ont la particularité de former spontanément des membranes biologiques. Les eucaryotes ont utilisé cette propriété pour former des compartiments liquidiens (plasma, liquide interstitiel et liquide extracellulaire) ainsi que des compartiments intracellulaires (organites cellulaires), qui présentent des conditions différentes en pH et en sel.

1.1 Acides gras et acylglycérols

Les acides gras sont les lipides les plus simples, ils sont composés d'une chaîne hydrocarbonée se terminant par une fonction acide carboxylique. Ils existent sous forme libre ou estérifiés à un squelette glycérol (tableau 1). Les acides gras sont classés en fonction de leur degré d'insaturation, c'est-à-dire le nombre de doubles liaisons qu'ils contiennent. Ils sont classés en trois catégories : les acides gras saturés sans double liaison, les acides gras monoinsaturés avec une double liaison, et enfin les polyinsaturés ayant au moins deux doubles liaisons (tableau 2 à 4).

Tableau 1: Nomenclature des acides gras et acylglycérols (Fahy et al., 2005, 2009)

Nom usuel	Code nomenclature	Nomenclature
Acides gras	FA01	<i>Fatty acids and conjugates</i>
Monoacylglycérol	GL0101	<i>Monoacylglycerols</i>
Diacylglycérol	GL0201	<i>Diacylglycerols</i>
Triacylglycérol	GL0301	<i>Triacylglycerols</i>
Acide gras saturé	FA0101	<i>Straight-chain fatty acids</i>
Acide gras insaturé	FA0103	<i>Unsaturated fatty acids</i>

Tableau 2: liste des acides gras saturés

Nom systématique	Nom usuel	Nombre de carbone et double liaison
Ethanoïque	Acétique	2 :0
Butanoïque	Butyrique	4 :0
Hexanoïque	Caproïque	6 :0
Octanoïque	Caprylique	8 :0
Décanoïque	Caprique	10 :0
Dodécanoïque	Laurique	12 :0
Tétradécanoïque	Myristique	14 :0
Hexadécanoïque	Palmitique	16 :0
Octadécanoïque	Stéarique	18 :0
Eicosanoïque	Arachidique	20 :0
Docosanoïque	Béhnique	22 :0
Tétracosanoïque	Lignocérique	24 :0
Hexacosanoïque	Cérotique	26 :0
Octacosanoïque	Montanique	28 :0
Triacotanoïque	Mélistique	30 :0
Dotriacotanoïque		32 :0

Tableau 3: liste des acide gras monoinsaturés (non exhaustive)

Non systématique	Nom usuel	Nombre de carbone et double liaison	ω
Cis-9-tétradécénoïque	myristoléique	14 :1 Δ^9	5
Cis-6-hexadécénoïque	Acide sapiénique	16 :1 Δ^6	10
Cis-7 hexadécénoïque		16 :1 Δ^7	9
Cis-9-hexadécénoïque	Palmitoléique	16 :1 Δ^9	7
Cis-6-octadécénoïque	Petroselinique	18 :1 Δ^6	12
Cis-9-octadécénoïque	Oléique	18 :1 Δ^9	9
Cis-11-octadécénoïque	Cis-vaccénique	18 :1 Δ^{11}	7
Cis-11-eicosénoïque	Gondoïque	20 :1 Δ^{11}	9
Cis-13-docosénoïque	Erucique	22 :1 Δ^{13}	9
Cis-15-tétracosénoïque	Nervonique	24 :1 Δ^{15}	9

Tableau 4: liste des acides gras polyinsaturés (non exhaustive)

Nom systématique	Nom usuel	Nombre de carbone et double liaison	ω
Cis-6-9-octadecadiénoïque	Linoléique	18 :2 $\Delta^{9,12}$	6
Cis-9-12-15-octadecatriénoïque	α -linoléique	18 :3 $\Delta^{9,12,15}$	3
Cis-6-9-12-octadecatriénoïque	γ -linoléique	18 :3 $\Delta^{6,9,12}$	6
Cis-5-8-11-14-icosatétraénoïque	Arachidonique	20 :4 $\Delta^{5,8,11,14}$	6
Cis-5-8-11-14-17-eicosapentaénoïque	Eicosapentaénoïque EPA	20 :5 $\Delta^{5,8,11,14,17}$	3
Cis-4-7-10-13-16-19-docosahexaénoïque	Docosahexaénoïque DHA	22 :6 $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$	3

Les acides gras insaturés sont classés en fonction de la position de la première double liaison par rapport au groupement méthyl (CH_3). On distingue ainsi 3 familles d'acides gras : ω -3, ω -6 et ω -9. Par exemple, l'acide oléique C18 :1 est un acide gras ω -9 ou n-9 car la première double liaison est sur le 9^{ème} carbone à partir de l'extrémité CH_3 (figure 1).

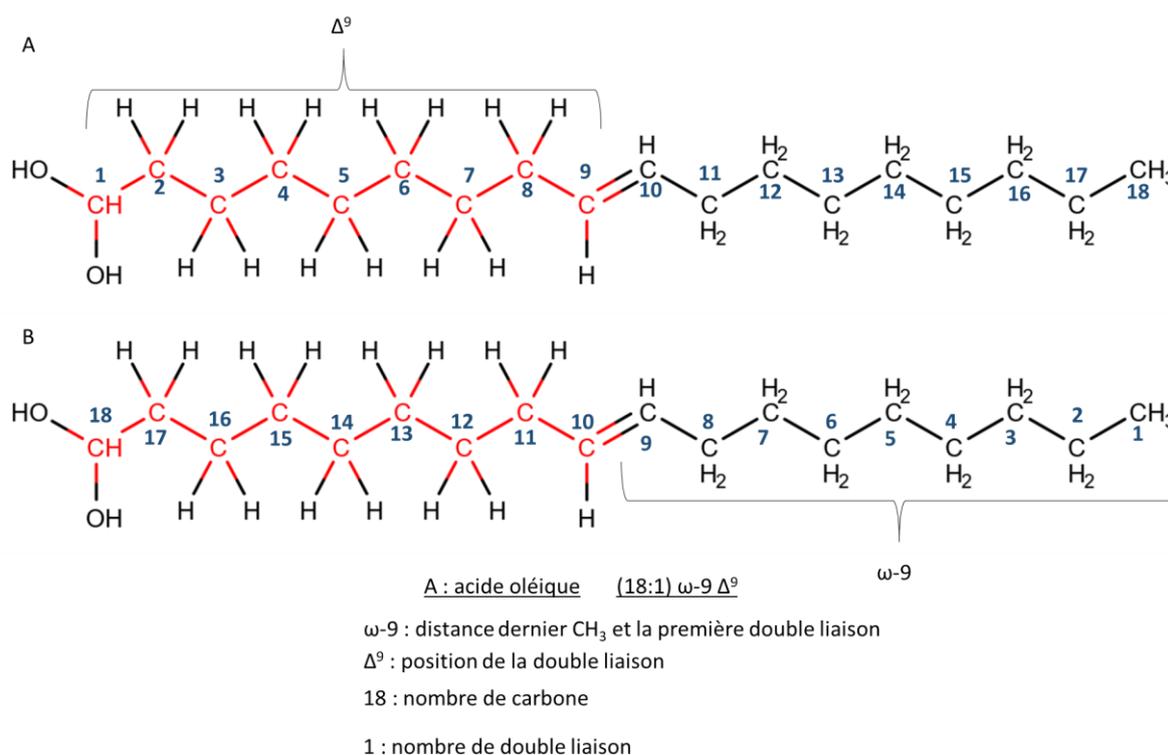
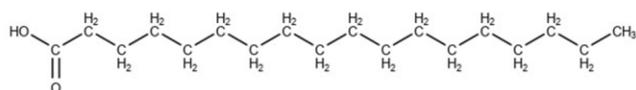
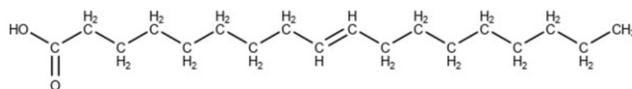


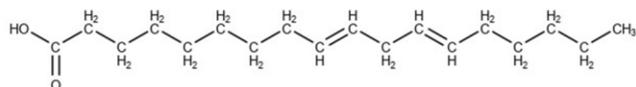
Figure 1 : Nomenclature des acides gras : cas de l'acide oléique : A : selon classification chimique en numérotant les carbones à partir du groupement carboxyl $-\text{COOH}$ terminal et la position du 1er carbone d'une double liaison représentée par symbole Δ ; B : selon la nomenclature physiologique (nutritionnelle) ω (ou n) à partir du méthyle $-\text{CH}_3$ terminal



A : acide stéarique



B : acide oléique



C : acide linoléique

Figure 2: Exemples d'acide gras saturé, mono et poly insaturé : A : acide octadécanoïque ; B : acide Cis-9-octadécénoïque ; C acide : Cis-6-9-octadécadiénoïque

Dans la nature, les doubles liaisons des acides gras sont majoritairement des doubles liaisons cis (van Meer et al., 2008). Ces doubles liaisons vont générer des courbures dans la chaîne aliphatique des acides gras. Ceci induit une augmentation de la fluidité membranaire due à un encombrement stérique plus important des acides gras insaturés (estérifiés dans des phospholipides membranaires), comme nous le verrons dans le chapitre 5.

Les acides gras insaturés sont reconnus pour jouer un rôle de protection au niveau cardiovasculaire (Barry & Dixon, 2021; Djuricic & Calder, 2021). Néanmoins, une surconsommation d'aliments riches en acides gras ω -6 conduit à une augmentation des risques cardiovasculaires (Mariamenatu & Abdu, 2021). Ces informations ont mis à jour que le plus important n'est pas d'avoir une alimentation riche en acides gras ω -3, ω -6, ω -9, mais que le ratio ω -3/ ω -6/ ω -9 soit conservé. Le ratio ω -6/ ω -3 est d'environ 3 (figure 3) (Mariamenatu & Abdu, 2021). De plus, les désaturases des mammifères ne peuvent introduire de doubles liaisons après le carbone C9. Les acides gras ayant des doubles liaisons après le carbone C9 sont donc appelés acide gras essentiels, car disponibles uniquement via l'apport alimentaire. On y retrouve par exemple, les acides linoléique et α -linoléique (figure3).

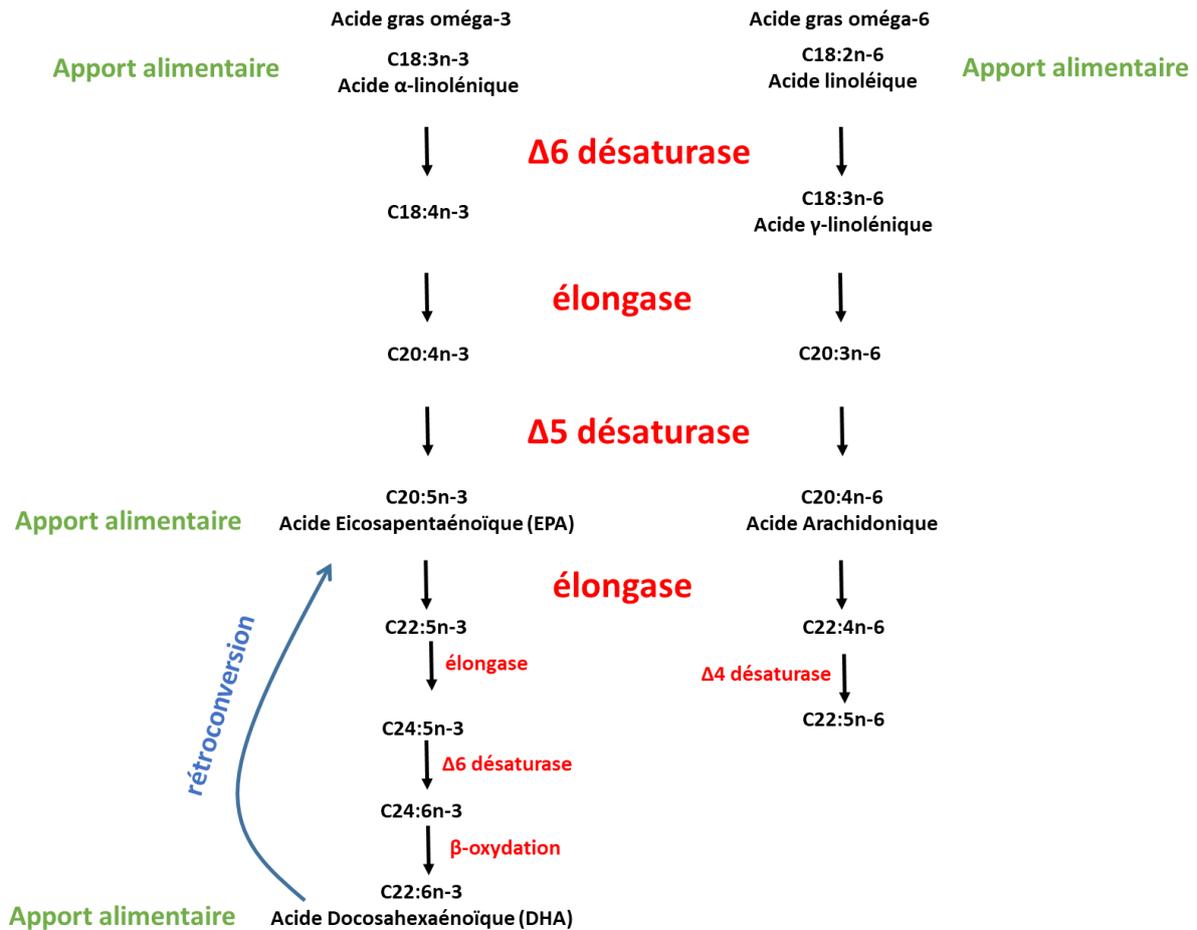


Figure 3: synthèse des acides gras oméga-3 à partir de l'acide linoléique et des acides gras oméga 6 à partir de l'acide linoléique (modifié de Bouvier, 2008)

Les acylglycérols sont composés d'une molécule de glycérol sur lequel sont estérifiés 1 à 3 acides gras. Il existe donc 3 acylglycérols : les monoacylglycérols (1 acide gras), les diacylglycérols (2 acides gras), les triacylglycérols (3 acides gras) (figure 4).

Les acylglycérols servent à transporter les acides gras via les lipoprotéines mais aussi à les stocker. En effet, les acylglycérols sont la forme de stockage des acides gras dans les gouttelettes lipidiques, dans les adipocytes (tissu adipeux). Les acides gras sont une source d'énergie très importante de l'organisme via la bêta-oxydation.

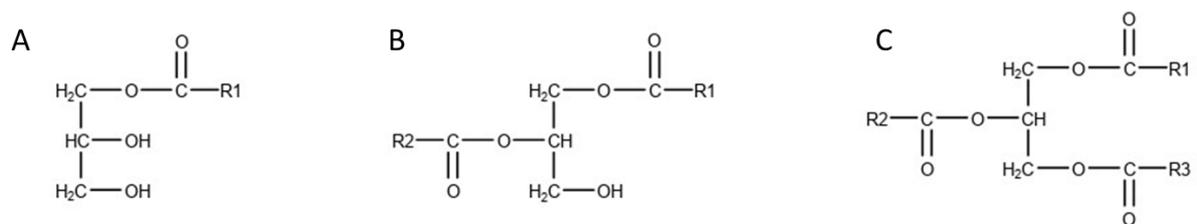


Figure 4: structure des acylglycérols : A :monoacylglycérol ;B :diacylglycérol ;C :triacylglycérol

1.2 Glycérophospholipides/Phospholipides

1.2.1 Structure / nomenclature

Les glycérophospholipides sont connus sous le terme générique phospholipides (PL). Dans cette thèse, nous utiliserons le terme phospholipides pour une meilleure compréhension. Les phospholipides sont constitués d'un squelette de glycérol sur lequel sont estérifiés 2 acides gras en position *sn*-1 et *sn*-2 (*sn* est la numérotation stéréochimique propre au glycérol et ses dérivés). Sur le carbone *sn*-3 du glycérol est estérifié par une liaison phosphodiester un groupement phosphate, qui est lui-même relié à différents groupements chimiques, permettant de classer les phospholipides en différentes classes (Fahy et al., 2005, 2009). (Tableau 5)

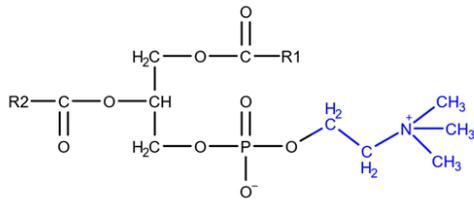
Tableau 5: classification des phospholipides (Fahy et al., 2005, 2009)

Nom usuel	Code nomenclature	Nomenclature
Acide phosphatidique	GP10	<i>Glycerophosphates</i>
Phosphatidylcholine	GP01	<i>Glycerophosphocholines</i>
Phosphatidyléthanolamine	GP02	<i>Glycerophosphoethanolamines</i>
Phosphatidylsérine	GP03	<i>Glycerophosphoserines</i>
Phosphatidylglycérol	GP04	<i>Glycerophosphoglycerols</i>
Phosphatidylinositol	GP06	<i>Glycerophosphoinositols</i>
Bis(monoacylglycéro) phosphate	GP0410	<i>Monoacylglycerophosphomonoradylglycerols</i>
Cardiolipine	GP12	<i>Glycerophosphoglycerophosphoglycerols</i>

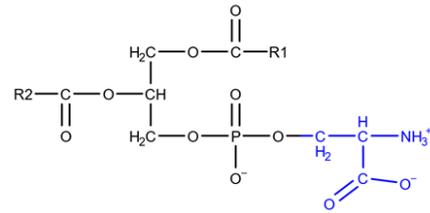
La figure 5 représente les structures de ces différentes classes, les groupes R représentant les acides gras estérifiés sur les différents phospholipides. Les phospholipides sont aussi présents sous la forme de lysophospholipides qui ne possèdent qu'un seul acide en position *sn*-1 ou *sn*-2. Ils proviennent de l'hydrolyse des phospholipides par les phospholipases A1 et A2, mais aussi de la synthèse *de novo* des phospholipides.

Dans cette thèse, nous évoquerons uniquement les phospholipides pour lesquels les acides gras sont liés par des liaisons esters : on parle de forme diacycle de phospholipides. Cependant, il existe des phospholipides qui ont des liaisons alkyles (-O-CH₂-CH₂-R) permettant de greffer un acide gras sur un glycérol ; cette liaison est spécifique des

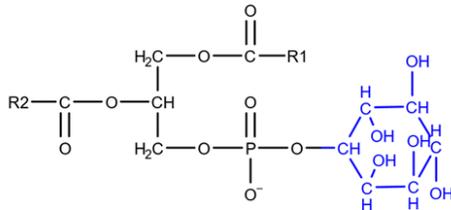
phospholipides des archées (Caforio & Driessen, 2017). Il existe les plasmalogènes qui sont des phospholipides dont l'acide gras est lié par une liaison alkenyl ($-O-CH=CH-R$). Les plasmalogènes ont de nombreuses fonctions cellulaires, par exemple ils jouent le rôle de réservoir d'acide gras polyinsaturés comme l'acide docosahexaénoïque (DHA) et l'acide arachidonique (Almsherqi, 2021; Braverman & Moser, 2012; Dorninger et al., 2015). De par leur teneur en acide gras insaturés ils jouent un rôle dans la fluidité membranaire et la formation de vésicules.



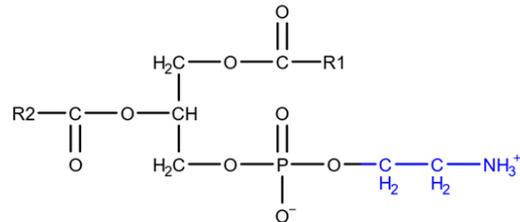
Phosphatidylcholine



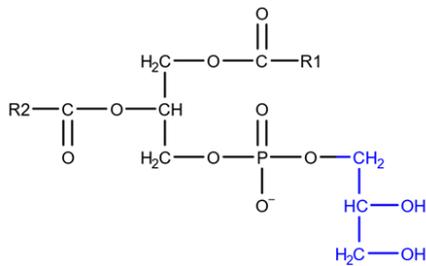
Phosphatidylsérine



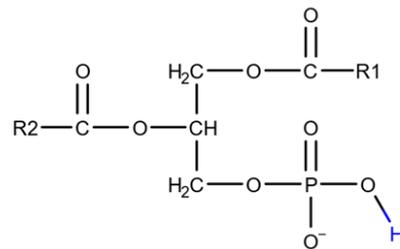
Phosphatidylinositol



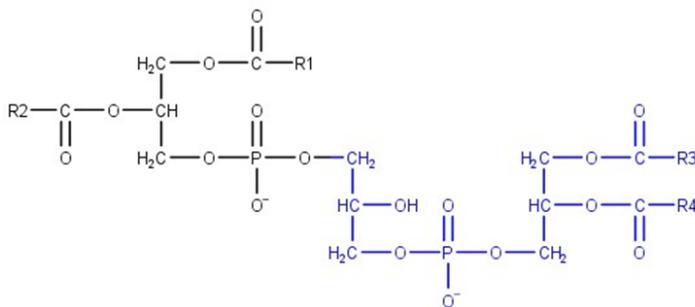
Phosphatidyléthanolamine



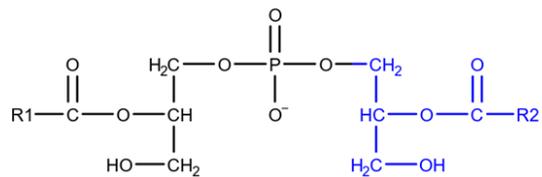
Phosphatidylglycérol



Acide phosphatidique



Cardiolipine



Bis(monoacylglycéro)phosphate

Figure 5: Structures des principaux glycérophospholipides

1.2.2 Le polymorphisme des formes moléculaires des phospholipides

Dans un milieu aqueux, les PL vont spontanément se regrouper et former des structures (membranes) selon leur structure chimique et le milieu environnant (pH, sels, cations, température...) (de Kroon et al., 2013; van den Brink-van der Laan et al., 2004). Les PL sont classés selon trois formes géométriques différentes : cylindrique, conique et conique inverse. Ces formes sont définies en fonction de la surface de la tête polaire (partie polaire) par rapport à la surface des chaînes d'acides gras (partie apolaire). Lorsque la surface de la partie polaire est proche ou égale à celle de la partie apolaire, on parle de phospholipide ayant une forme cylindrique (figure 6 B). Dans cette catégorie, on retrouve les phospholipides neutres (zwitterions) comme les phosphatidylcholines (PC) qui ont une grosse tête polaire. Les lysophospholipides qui ne possèdent qu'un acide gras, ont une surface polaire plus grande. Ils sont donc sous forme conique inverse comme les lysoPC (figure 6 A). Les autres PL qui ont une tête polaire beaucoup plus petite que leur partie apolaire, ont une forme conique comme la cardiolipine (CL) en présence de cations divalents (Ca^{2+}) ou les phosphatidyléthanolamines (PE) selon la longueur et l'insaturation de leurs chaînes acyles et la température (figure 6 C).

Les PL cylindriques forment des bicouches lipidiques lamellaires similaires aux membranes biologiques (figure 6 B). Les phospholipides coniques forment des structures non lamellaires avec leur tête polaire vers le centre, appelées aussi phases hexagonales (H_{II}) inversées (figure 6 C). Quant aux PL coniques inverses, ils forment des micelles avec leur tête polaire vers l'extérieur de la micelle (figure 6 A).

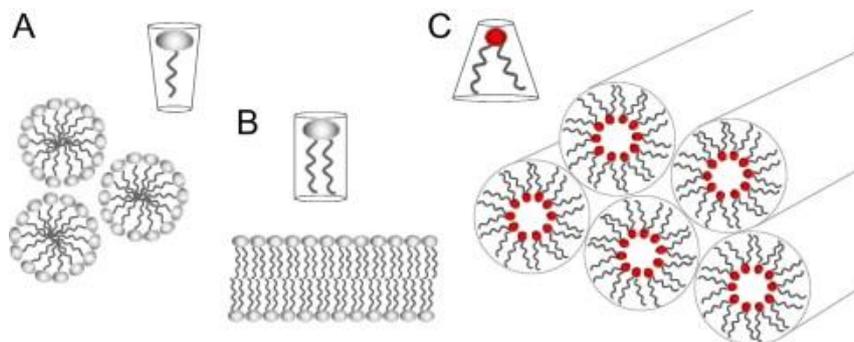


Figure 6: schéma du polymorphisme des lipides A : forme conique inverse, entraîne la formation de micelles, B : forme cylindrique, formation de bicouche ; C : forme conique, entraîne la formation de phase hexagonale inverse source : (de Kroon et al., 2013; van den Brink-van der Laan et al., 2004)

Les PL coniques font des courbures négatives de la membrane permettant l'entrée de composés dans la cellule comme par exemple lors de l'endocytose. Les PL coniques inverses quant à eux font des courbures positives de la membrane permettant la sortie de composés de la cellule, comme lors de l'exocytose (de Kroon et al., 2013; van den Brink-van der Laan et al., 2004). Il est donc normal de retrouver localement des régions riches en PL coniques ou coniques inverses dans les membranes biologiques, permettant les échanges entre les différents organites cellulaires, entre la cellule et son milieu extracellulaire et enfin entre les organites et le cytosol de la cellule. Ces régions sont appelées domaines. Dans les membranes, la balance entre les structures lamellaires et non-lamellaires est finement régulée pour conférer une certaine flexibilité, qui est importante pour les phénomènes membranaires de fusion, fission et formation de pores.

1.2.3 Rôle des phospholipides

Les PL sont des composants essentiels des membranes biologiques, qui servent de structurant des membranes sous forme de bicouche lipidique, et jouent un rôle déterminant dans leurs propriétés biophysiques, telles que leur charge de surface, leur épaisseur, leur fluidité et leur courbure (van Meer et al., 2008). De plus, les acides gras estérifiés sur les PL jouent un rôle dans la fluidité membranaire. En effet, plus les acides gras sont insaturés plus leur point de fusion est bas, diminuant ainsi leur rigidité. De plus comme on peut le constater avec la figure 7, une double liaison entraîne une courbure de la chaîne aliphatique de l'acide gras due aux doubles liaisons cis majoritaires, entraînant une augmentation de la fluidité membranaire.

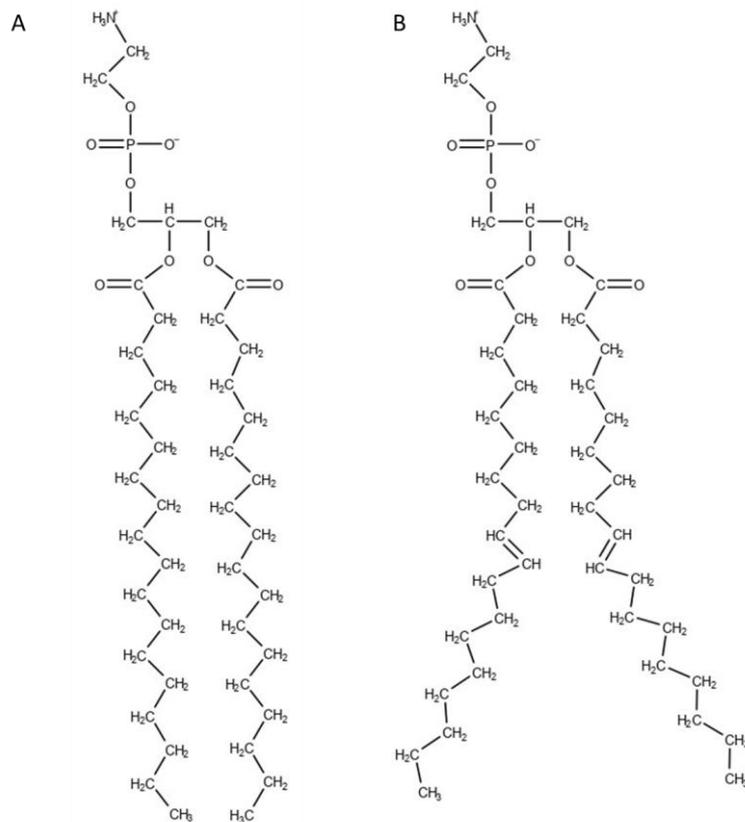


Figure 7: A : Di-stéarate PE (1,2-di-stéroyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine) ; B: Di-oléate PE (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine)

Les PL interviennent dans la dynamique membranaire. Ceux de forme conique ou conique inverse peuvent réaliser des déformations de la membrane. Cela permet lors de l'endocytose ou l'exocytose la formation de vésicules permettant l'échange de métabolites, par exemple. Les PE sont regroupés dans des « domaines lipidiques » dans des zones de contact réticulum endoplasmique (RE) / mitochondrie permettant l'échange de métabolites.(Ball et al., 2018)

Les PL servent de précurseurs pour d'autres PL et constituent une source d'acides gras. Par exemple, l'acide phosphatidique est un précurseur d'autres phospholipides comme le phosphatidylglycérol. Le PG est le précurseur de la cardiolipine et du BMP (Hullin-Matsuda et al., 2007). Les PL peuvent échanger leur tête polaire, permettant par exemple la conversion de PE en PC. Les PL sont des donneurs d'acide gras, par exemple l'acide arachidonique, qui après hydrolyse par des phospholipases, est le substrat des oxygénases. Les PI, PC (et les PE) sont une source importante pour la synthèse des eicosanoïdes (Calder, 2020) impliqués dans l'inflammation. Les PL sont aussi des donneurs d'acide gras dans les mécanismes de transacylation (remodelage des PL). En effet, les PL sont utilisés pour réacyler les

lysophospholipides, à l'aide de transacylase spécifique du donneur ou de l'accepteur des acides gras. Il existe 2 voie connues, une voie dépendante du coenzyme A (Sugiura et al., 1988), et une voie indépendante du coenzyme A qui est spécifique des acide gras polyinsaturés comme les DHA (MacDonald & Sprecher, 1991; Robinson et al., 1985).

Les phospholipides sont aussi impliqués dans la signalisation cellulaire. Par exemple lors de l'apoptose, les PS vont changer de feuillet de la membrane plasmique passant du feuillet interne au feuillet externe.

1.2.4 Distribution tissulaire et cellulaire des phospholipides

Les PL sont présents dans toutes les cellules, mais leur proportion relative est différente en fonction du type cellulaire et des tissus. Les PC sont les PL les plus abondants chez les eucaryotes représentant environ 50-60% des PL, puis les PE avec 30% (van Meer et al., 2008) puis les autres PL. Au sein de la membrane plasmique, les PL représentent environ 60% des lipides (van Meer et al., 2008). Les PC se trouvent majoritairement au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique, et représentent en fonction du type cellulaire de 35-50% des phospholipides. Les PE, PS et PI sont majoritairement localisés au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique, et représentent respectivement 25-30%, 10-15%, et 5-8% des PL totaux de la membrane plasmique. Les acides gras estérifiés sur les différents PL vont dépendre du type cellulaire (voir tableaux ci-dessous).

La cardiolipine est un PL localisé dans les membranes internes des mitochondries (van Meer et al., 2008). Il est fortement représenté dans les cellules cardiaques où il représente jusqu'à 15% des PL totaux. Le BMP qui représente seulement 1% des PL totaux dans la majorité des cellules atteint jusqu'à 13% dans les macrophages alvéolaires.

Au sein des familles de PL, il existe les espèces moléculaires. Ces espèces moléculaires sont caractérisées par les acides gras estérifiés sur le PL. Par exemple si le BMP a 2 acides oléiques, il s'agira de l'espèce moléculaire di-oléate BMP. Un autre exemple si un acide oléique est estérifié en position *sn-2* d'une PC et l'acide palmitique en position *sn-1*, il s'agit alors de l'espèce moléculaire : 1-palmitoyl-2oléyl-phosphatidylcholine.

Les PL ont des compositions en acide gras différentes en fonction des classes de PL, mais aussi au niveau tissulaire (Le BMP sera évoqué dans le chapitre 5). Les PL possèdent 2 acides gras estérifiés en position *sn-1* et *sn-2* (voir plus loin le cas particulier des polyglycérophospholipides comme le BMP). Il est reconnu que les acides gras insaturés sont préférentiellement estérifiés en position *sn-2* et les acides gras saturés en position *sn-1*. Les PC sont majoritairement constitués d'acide palmitique, stéarique, oléique, arachidonique, linoléique et une plus faible proportion de DHA (tableau 6). Les PE sont plus riches en DHA et en acide arachidonique que les PC et sont aussi constitués majoritairement d'acide stéarique et palmitique (tableau 7). Les PI sont très riches en acide arachidonique (plus que les PC et PE) et en acide stéarique (tableau 8). Les PS sont plus riches en DHA que les PC, et sont composés en majorité par de l'acide oléique, arachidonique et stéarique (tableau 9). La cardiolipine dans le cœur, quant à elle est très riche en acide linoléique (Schlame et al., 1993), contrairement à son précurseur le PG qui est riche en acide oléique, stéarique et palmitique (tableau 10). Il y a donc un remodelage des acides gras de la cardiolipine après sa synthèse à partir du PG.

Tableau 6 - Composition et Position en acide gras du PC dans différents organes (% de chaque acide gras estérifié en position sn-1 ou sn-2) ; (lipid MAPS) ; 1 : (Wood & Harlow, 1969b) ; 2 : (Kuksis et al., 1969) ; 3 : (Kuksis et al., 1968) ; 4 : (Marai & Kuksis, 1969) ; 5 : (Yabuuchi & O'Brien, 1968) ; 6 : (Kuksis & Marai, 1967)

Position	Acide gras						
	(16 :0)	(16 :1)	(18 :0)	(18 :1)	(18 :2)	(20 :4)	(22 :6)
Foie de rat ¹							
sn-1	23	1	65	7	1	trace	
sn-2	6	1	4	13	23	39	7
Cœur de rat ²							
sn-1	30	2	47	9	11		
sn-2	10	1	3	17	20	33	9
Poumon de rat ³							
sn-1	72	4	15	7	3		
sn-2	54	7	2	12	11	10	1
Plasma humain ⁴							
sn-1	59	2	24	7	4	Trace	
sn-2	3	1	1	26	32	18	5
Globule rouge humain ⁴							
sn-1	66	1	22	7	2		
sn-2	5	1	1	35	30	16	4
matière grise bovine ⁵							
sn-1	38	5	32	21	1		
sn-2	33	4	Trace	48	1	9	4
Œuf de poule ⁶							
sn-1	61	1	27	9	1		
sn-2	2	1	Trace	52	33	7	4

Tableau 7 – Composition et Position des acides gras du PE dans différents organes (% chaque acide en position sn-1 ou sn-2) ; (lipid MAPS) ; 1 : (Wood & Harlow, 1969b) ; 2 : (Holub & Kuksis, 1969)

Position	Acide gras						
	(14 :0)	(16 :0)	(18 :0)	(18 :1)	(18 :2)	(20 :4)	(22 :6)
Foie de rat ¹							
sn-1		25	65	8			
sn-2	2	11	8	8	10	46	13
Œuf de poule ²							
sn-1		32	59	7	1		
sn-2		1	1	25	22	29	12

Tableau 8 - Proportion en acide gras du PI dans différente espèce animales masse % (% en masse de l'acide gras par rapport à la masse totale de PI) ; (lipid MAPS) 1 : (Holub et al., 1970) ; 2 : (W. Thompson & MacDonald, 1975) 3 : (Wood & Harlow, 1969a)

Tissu	Acide gras									
	(16 :0)	(18 :0)	(18 :1)	(18 :2)	(18 :3)	(20 :3)	(20 :4)	(22 :3)	(22 :5)	(22 :6)
Cœur bovin ¹	8	40	14	1	1	1	31	1	1	2
Foie bovin ²	5	32	12	6	1	7	23	4	3	5
Foie de rat ³	5	49	2	2		4	35			1

Tableau 9 - Position en acide gras du PS dans différentes espèces animales % de chaque acide gras estérifié en position sn-1 ou sn-2) ; (lipid MAPS) 1 : (Wood & Harlow, 1969a) ; 2 : (Yabuuchi & O'Brien, 1968)

position	Acide gras					
	(16 :0)	(18 :0)	(18 :1)	(18 :2)	(20 :4)	(22 :6)
Foie de rat ¹						
sn-1	5	93	1			
sn-2	6	29	8	4	32	19
Cerveau bovin ²						
sn-1	3	81	13			
sn-2	2	1	25	Trace	1	60

Tableau 10 - Composition en acide gras du PG dans des poumons de différentes espèces animales (% en masse de l'acide gras par rapport à la masse total de PG) ; (lipid MAPS) ; (Okano & Akino, 1979)

Acide gras	Espèces animales			
	Porc	Vache	Lapin	Cochon d'inde
(16 :0)	27	34	29	37
(16 :1)	2	1	3	6
(18 :0)	21	15	19	18
(18 :1)	34	37	27	24
(18 :2)	7	3	8	5
(18 :3)	1	2	1	2
(20 :3)	1	1	1	Trace
(20 :4(n-6))	3	3	4	3
(22 :4(n-6))	1	1	3	2
(22 :5(n-3))	1	1	3	1
(22 :6(n-3))	1	1	1	1

1.3 Les sphingolipides (SL)

Les sphingolipides sont des composants des membranes. Ils sont composés d'une base sphingoïde liée par une liaison amide à un acide gras, (principalement saturé et à longue chaîne) pour former une céramide. La céramide est la structure de base permettant la synthèse des SL plus complexes, tels que les sphingomyélines avec une phosphorylcholine sur le C1 de la base sphingoïde (figure 8). La base sphingoïde majoritaire chez les mammifères est la sphingosine possédant une chaîne aliphatique en C18. Les SL les plus répandus sont les céramides et les sphingophospholipides. Dans les sphingophospholipides on retrouve la sphingomyéline, qui est retrouvé en abondance dans la gaine de myéline (Fahy et al., 2005, 2009; van Meer et al., 2008).

Ces lipides jouent un rôle dans la structuration des membranes. Ils sont regroupés dans les radeaux lipidiques où ils sont associés au cholestérol. Ils sont aussi impliqués dans la signalisation cellulaire, dans la fluidité membranaire. Leur catabolisme se trouve principalement dans les lysosomes.

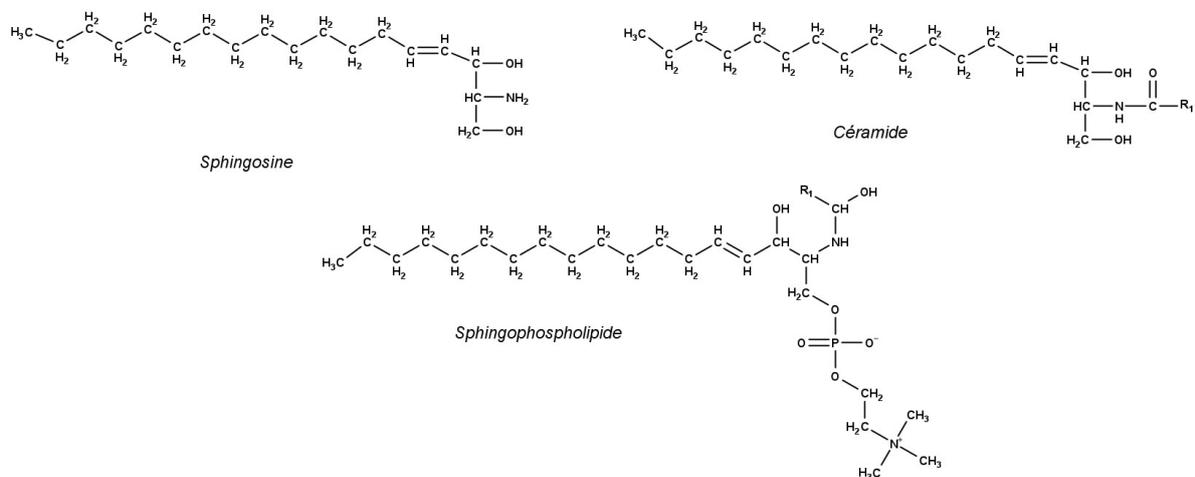


Figure 8 : Structure de la sphingosine, d'un céramide et d'un sphingophospholipide : sphingomyéline

Tableau 11 - Répartition en acide gras des SM dans différentes espèces animales (% en masse de l'acide gras par rapport à la masse total de SM) (Ramstedt et al., 1999)(lipid MAPS)

Espèce	Acide gras									
	(16 :0)	(18 :0)	(18 :1)	(20 :0)	(22 :0)	(22 :1)	(23 :0)	(23 :1)	(24 :0)	(24 :1)
Œuf	66	10	1	4	6	1	2		5	3
Cerveau bovin	3	42		6	7	3	3	3	6	27
Lait de vache	14	3	1	1	22		32			5

1.4 Stérols

Les stérols ont pour base commune un noyau stérane (figure 9). Chez les mammifères, le représentant principal des stérols est le cholestérol (voir chapitre 3, pour le détail sur la synthèse, métabolisme, transport). On retrouve dans cette famille des précurseurs du cholestérol comme le lanostérol, mais aussi des dérivés du cholestérol comme les oxystérols, les acides biliaires et les hormones stéroïdiennes.

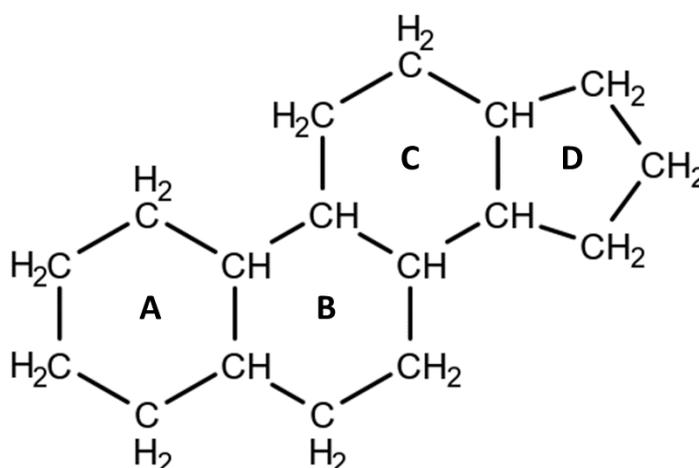


Figure 9: structure du noyau stérane

1.5 Lipoprotéines

Les Lipoprotéines sont des vésicules circulantes dans le sang qui permettent le transport des lipides peu solubles en milieu aqueux aux différentes cellules de l'organisme. Elles sont constituées d'un cœur hydrophobe et d'une membrane amphiphile (figure 10). Les lipoprotéines sont classées en 5 types (tableau 12):

-Les chylomicrons : elles sont sécrétées dans la lymphe par les entérocytes. Elles réalisent le transport des lipides issus de l'alimentation vers le foie.

-Les lipoprotéines de très faible densité (VLDL): elles sont sécrétées dans la circulation sanguine par le foie et transportent les lipides endogènes (Triglycérides par exemple) vers les tissus.

- Les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL): elles sont issues de l'hydrolyse des VLDL circulantes.

-Les lipoprotéines de faible densité (LDL): elles transportent le cholestérol (sous forme d'ester de cholestérol) du sang vers les tissus.

-Les lipoprotéines de forte densité (HDL): elles sont produites par les cellules, leur rôle est de transporter le cholestérol (sous forme d'ester de cholestérol) en excès vers le foie pour être éliminé par les voies biliaires.

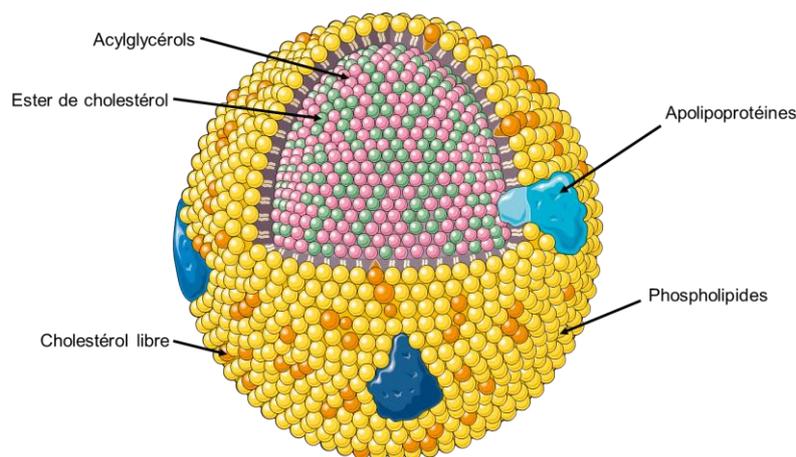


Figure 10 : Structure d'une lipoprotéine (ppt servier)

Tableau 12: tableau récapitulatif des différentes données physico-chimiques des lipoprotéines modifié de (Lipidmaps ; Arnal 2015 ; Bouvier 2008 ; (Masson, 2009))

	Chylomicron	VLDL	IDL	LDL	HDL
Densité	<0.94	0.94-1.006	1,006-1,019	1.006-1.063	1.063-1.210
Diamètre (nm)	75-1200	30-80	27-35	18-27	7-12
Composition lipidique (%massique)					
Triacylglycérol	80-95	45-65	27-35	18-27	7-12
Ester de cholestérol	2-4	16-22	20-30	45-50	12-20
Cholestérol	1-3	4-8	4-8	6-8	3-5
Phospholipides	3-6	15-20	20-24	18-24	26-32
Apolipoprotéines	APO C, E B48	APO B100,C, E	APO B100, E ; C	APO B100,	APO AI, AII, C

Chapitre 2 : Voie endosomale

Introduction

L'apport des nutriments aux cellules est vital. Il permet de renouveler les pools de glucides, lipides, protéines et sels présents dans la cellule pour maintenir une homéostasie générale permettant un fonctionnement cellulaire normal. Les cellules eucaryotes acquièrent la majorité des nutriments (sucres, acides aminés) et des ions grâce à des transporteurs membranaires spécifiques. Les composés très hydrophobes ou de grosses tailles, comme les protéines et les lipides associées aux lipoprotéines, sont internalisés dans les cellules par endocytose, et empruntent la voie endosomale qui va permettre de redistribuer les composés internalisés. Cette voie d'endocytose permet aussi l'internalisation de récepteurs membranaires au cours des cascades de signalisation cellulaire ou d'agents pathogènes et débris cellulaires (phagocytose).

2.1 Les processus d'endocytose

L'endocytose est un terme générique qui regroupe tous les phénomènes permettant l'internalisation d'éléments extracellulaires par la cellule. Cette entrée est réalisée par la formation de vésicules issues de la membrane plasmique (Doherty & McMahon, 2009). Il existe différents mécanismes d'endocytose, qui vont être médiés ou non par des protéines. Ici, nous évoquerons uniquement l'endocytose dépendante de la clathrine. D'autres types sont regroupés dans le tableau 13.

Tableau 13 - Caractéristiques morphologiques et moléculaires des différents mécanismes d'endocytose (modifié de(Doherty & McMahon, 2009))

Mécanisme d'endocytose	Morphologie	Cargos impliqués	Implication des protéines G	Implication de la dynamine	Autre protéines impliquées
Médié par la clathrine	Vésiculaire	RTKs, GPCRs, récepteur de la transferrine, Toxine de l'anthrax	Rab5, Arf6	Oui	Clathrine, AP2, Epsine, SNX9, synaptojanine, actine, amphiphysine, etc
Cavéole /dépendant de la cavéoline 1	Vésiculaire/ tubulovésiculaire	CTxB, SV40, protéines liées au GPI	Incertain (CDC 42 régulerait les cavéolines)	Possible	Cavéolines, PTRF, SRC, PKC, actine, etc
CLIC/GEEC	Tubulaire / semblable à des anneaux	<i>Fluid phase markers</i> , CTxB, protéines liées au GPI	Cdc42, Arf1	Non établie	ARHGAP10, actine, GRAF1, etc
Dépendant d'Arf6	Vésiculaire/tubulaire	Protéines MHC de classe I, CD59, protéine carboxypeptidase E	Arf6	Non établie	Incertain

L'endocytose médiée par la clathrine (EMC) est facilement observable par microscopie électronique, ce qui permet de la différencier des autres mécanismes ((Doherty & McMahon, 2009)). La clathrine est une protéine qui joue un rôle de fondation en formant le manteau de clathrine, permettant de stabiliser la formation de vésicules au niveau de la membrane plasmique (MP). C'est ce manteau qui peut être observé par microscopie électronique.

L'endocytose médiée par la clathrine est caractérisée par deux grandes phases morphologiques :

- La formation de la vésicule entourée de clathrines jusqu'à sa libération : appelé *clathrin coat pit* (CCP) en anglais, que l'on pourrait traduire en français par fosse/puits recouvert(e) d'un manteau de clathrine.
- La séparation des vésicules de la membrane plasmique par fission jusqu'au recyclage du manteau de clathrine : appelé *clathrin coat vesicle* (CCV) que l'on peut traduire en français par vésicules entourées d'un manteau de clathrine.

La première étape de l'endocytose médiée par la clathrine est le recrutement de la clathrine par différents effecteurs (figure 11). Par exemple, l'Epsine pour les cargos ubiquitinilés (Polo et al., 2002), Numb qui reconnaît Notch (Santolini et al., 2000) ou bien l'adaptateur protéique AP2 qui reconnaît des motifs dileucine et tyrosine (Marks et al., 1996; Sorkin, 2004), mais il existe aussi d'autres effecteurs / récepteurs qui vont permettre le recrutement de la clathrine (voir chapitre 3 pour l'internalisation des LDL par l'endocytose médiée par la clathrine). Une fois recrutées, les clathrines vont se polymériser conduisant à la déformation de la membrane plasmique et la formation de la CCP contenant les éléments à internaliser (Doherty & McMahon, 2009). Certains effecteurs comme AP2, en plus du recrutement des clathrines, contribuent à la stabilisation de la CCP (Doherty & McMahon, 2009). La durée de vie de la CCP est variable. En effet les GPCR (cargos des récepteurs couplés aux protéines G) interagissent avec l'actine du cytosquelette permettant de réguler la formation de la CCP (Puthenveedu & von Zastrow, 2006). La séparation de la CCP de la membrane plasmique est réalisée par la dynamine (Praefcke & McMahon, 2004) (Praefcke & McMahon, 2004), qui est recrutée par des protéines ayant un motif BAR (*Bin-Amphiphysin-Rvs*) comme par exemple SNX9 ou bien l'amphiphysine (Lundmark & Carlsson, 2004). La dynamine se polymérise entre la CCP et la membrane plasmique entraînant la formation d'un tube. La dynamine est une GTPase qui en hydrolysant une molécule de GTP libère la CCP dans le cytosol par constriction du tube, c'est la scission. Cette scission est irréversible (Praefcke & McMahon, 2004).

Une fois la CCP libérée dans le cytosol, elle est appelée CCV. Cette CCV est ensuite libérée de son manteau de clathrine par l'action de l'auxiline et de Hsc70 (*Heat Shock Cognate*)

(Doherty & McMahon, 2009). La vésicule libérée va ensuite fusionner avec un endosome précoce et les clathrines sont recyclées à la membrane plasmique.

Le recrutement des effecteurs et la formation de la CCP a lieu au niveau des cargos qui sont reconnus par leurs récepteurs. L'endocytose médiée par la clathrine se réalise à des niveaux différents de la membrane plasmique. De par l'hétérogénéité des ligands, récepteurs, éléments internalisés, il y a, au même moment dans la cellule, différentes CCP, CCV et donc différents endosomes précoces (Doherty & McMahon, 2009).

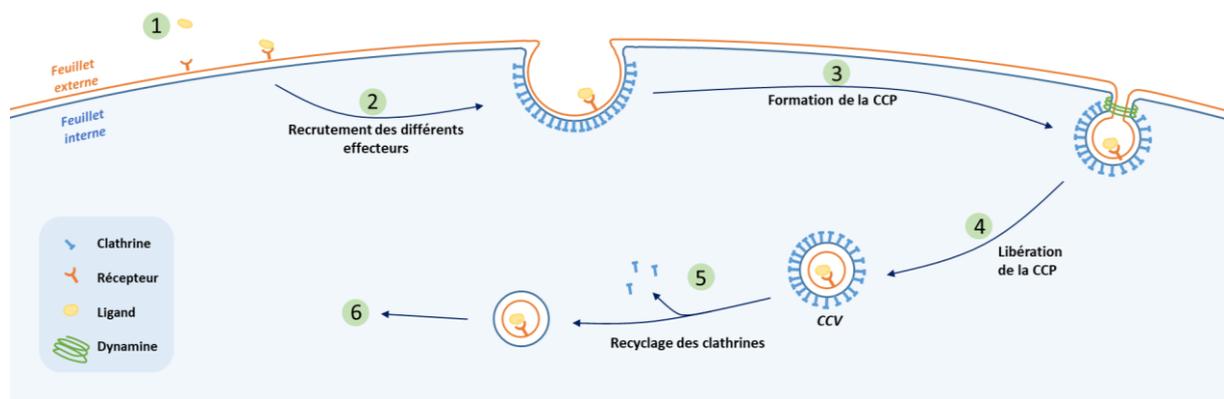


Figure 11: Endocytose médiée par la clathrine : 1 : reconnaissance ligand/récepteur ; 2 : recrutement des différents effecteurs : clathrines, lipides, protéines (Epsin, Numb ...); 3 : formation de la CCP et recrutement de la dynamine, des protéines BAR (SNX9 par exemple) ; 4 : clivage de la CCP et libération de la CCV, utilisation d'un GTP ; 5 : recyclage des clathrines par HSC 70, auxilines, utilisation d'un ATP ; 6 : vers la voie endosomale

2.2 La voie endosomale

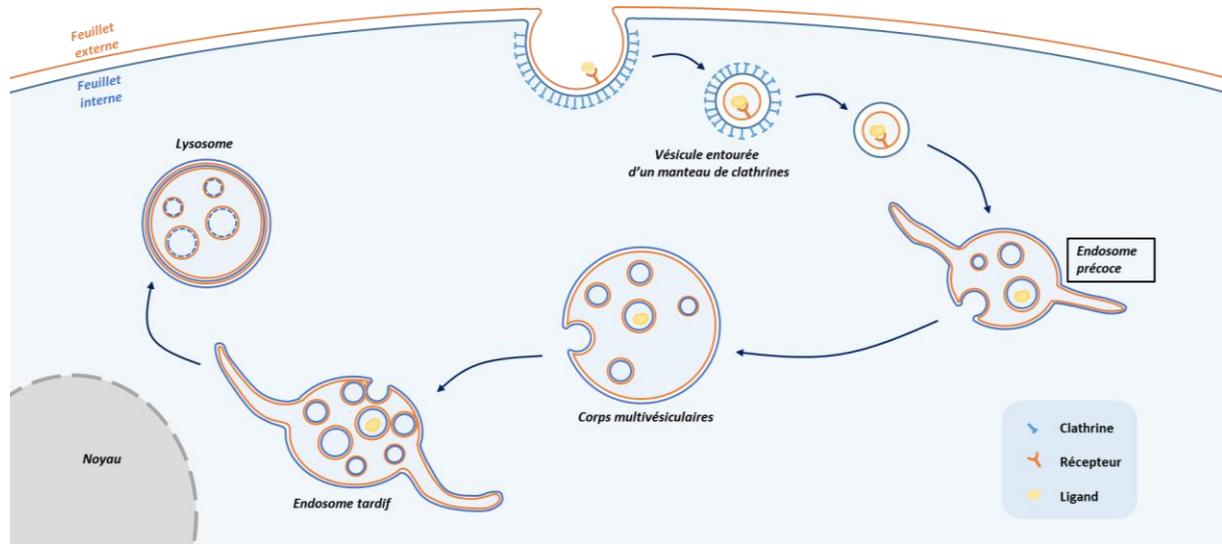


Figure 12: Schéma simplifié de la voie endosomale

2.2.1 Caractéristiques des organites

La voie endosomale est la voie cellulaire ayant le plus gros trafic de métabolites et varie en fonction des besoins nutritifs de la cellule. Pour cela, la cellule peut augmenter le nombre de compartiments mais aussi leur taille (Huotari & Helenius, 2011; Scott et al., 2014). Plusieurs organites sont retrouvés dans la voie endosomale (figure 12):

- Endosome précoce (*Early endosome*) EE
- Endosome de recyclage (*Endosome recycling*) ER
- Corps multi-vésiculaires (*Multi Vesicular Body*) MVB
- Endosome tardif (*late endosome*) LE
- Lysosome
- Endolysosome

L'endosome précoce est le premier organite de la voie endosomale. Les corps multivésiculaires sont les seconds et sont des organites de transition entre l'endosome précoce et l'endosome tardif. Les endolysosomes sont aussi des organites de transition entre les endosomes tardifs et les lysosomes. Il est difficile de les identifier avec des marqueurs protéiques car bien que ces organites soient fonctionnellement différents, un certain nombre de

protéines sont communes. Néanmoins, il est possible de les identifier via leur aspects morphologiques et physiques (Scott et al., 2014).

Le pH est un élément très important de la voie endosomale. Tout au long de la voie, le pH va diminuer et cette diminution est obtenue principalement grâce à un transporteur de proton la V_{ATP}ase (Scott et al., 2014). Les endosomes précoces ont le pH le plus élevé compris entre 6,9 et 6,2. Les corps multi-vésiculaires ont un pH d'environ 5,5, les endosomes tardifs ont un pH compris entre 5,5 et 5, et enfin, les lysosomes ont le pH le plus faible compris entre 5 et 4,6 (Scott & Gruenberg, 2011). Ce pH acide est nécessaire pour les activités des enzymes hydrolases (lipases, protéases ..) de la voie endosomale (Scott et al., 2014).

On peut remarquer une différence de protéines Rab pour les endosomes précoces, corps multi-vésiculaires et endosomes tardifs. Les protéines Rab pour *Ras-related in brain*, sont de petites protéines G. Chez les eucaryotes, environ 60 Protéines Rab sont connues et sont indispensables au trafic endosomal. En effet elles sont impliquées dans la fusion membranaire, la formation de vésicules et leurs mouvements intracellulaires (Stenmark & Olkkonen, 2001). La maturation de l'endosome se traduit par une modification des protéines Rab : Rab 5 dans les endosomes précoces (Raiborg et al., 2002), Rab 5 et Rab 7 dans les corps multi-vésiculaires (Rink et al., 2005; Scott et al., 2014) et Rab 7 dans les endosomes tardifs (Scott et al., 2014). Le complexe CORVET (*Class C core Vacuole/Endosome Tethering factor*) dans les endosomes précoces est remplacé par le complexe HOPS (*Late endosomal/lysosomal homotypic fusion and vacuole protein sorting*) au niveau des endosomes tardifs (Peplowska et al., 2007).

La localisation cellulaire des différents organites est aussi un moyen de les distinguer. Les endosomes précoces et les endosomes de recyclage sont localisés proches de la membrane plasmique. Les corps multi-vésiculaires vont se mouvoir de l'espace proche de la membrane plasmique vers l'espace périnucléaire pour fusionner avec les endosomes tardifs. Les endosomes tardifs, endolysosomes et lysosomes se trouvent au niveau périnucléaire (Scott et al., 2014). Les corps multi-vésiculaires vont aussi pouvoir se mouvoir vers la membrane plasmique pour permettre la fusion corps multi-vésiculaires et membrane plasmique pour sécréter des exosomes (voir partie exosomes).

Les endosomes tardifs et les endosomes précoces sont des organites sphériques avec des ramifications tubulaires permettant les échanges avec le réseau trans-Golgi (TGN) ou avec les endosomes de recyclage permettant le recyclage vers la surface cellulaire. Les lysosomes et les

corps multi-vésiculaires sont des organites sphériques. La présence de vésicules intra-luminales varie selon les organites en fonction de la capacité d'invagination membranaire vers l'intérieur (lumen) des organites (Scott et al., 2014). Les endosomes précoces ont peu de vésicules intra-luminales, moins de 10, et ce nombre et leur taille sont dépendants du type cellulaire. Les corps multi-vésiculaires ont plus de vésicules intra-luminales que les endosomes précoces qui sont plus homogènes au niveau de la taille (environ 50nm). Pour les endosomes tardifs, les vésicules intra-luminales sont très hétérogènes en taille, de 30-100nm, et en très grand nombre, plus de 30 vésicules intra-luminales par endosome tardif (Huotari & Helenius, 2011).

Les organites ont des fonctions différentes. L'endosome précoce accepte les différents éléments issus de l'endocytose. Il joue le rôle d'organisateur en triant les cargos issus de l'endocytose qui doivent être recyclés vers la membrane plasmique ou bien dégradés dans les lysosomes. Il joue aussi un rôle dans le trafic intracellulaire réalisant des échanges avec le réseau trans-Golgi (Huotari & Helenius, 2011; Scott et al., 2014). Les endosomes de recyclage (ER) sont des organites de recyclage permettant la réutilisation des molécules endocytées en les ramenant à la membrane plasmique ou dans le milieu extracellulaire (Huotari & Helenius, 2011; Scott et al., 2014). Les corps multi-vésiculaires sont des intermédiaires entre les endosomes précoces et les endosomes tardifs et permettent l'apport des cargos destinés pour la destruction, vers les lysosomes où des hydrolases sont stockées (Huotari & Helenius, 2011; Scott et al., 2014). De plus, ils ont un rôle dans la sortie cellulaire via les exosomes (voir partie exosomes). Les endosomes tardifs sont la deuxième voie de sortie de la voie endosomale. C'est à partir de ce compartiment, par exemple, que le cholestérol va être distribué dans la cellule (voir partie cholestérol). Les endosomes tardifs comme les endosomes précoces vont interagir avec le TGN. Les endosomes tardifs maintiennent l'activité des lysosomes en apportant des protéines constitutives, des hydrolases, un pH acide. Les lysosomes ont un rôle de dégradation permettant la reconstitution de pool de molécules de base comme les acides aminés, les bases nucléotidiques etc.

2.2.2 De l'internalisation à la destruction : la dynamique du trafic endosomal

Les cargos arrivant dans la voie endosomale sont rapidement triés pour partir, soit vers le recyclage, soit vers la dégradation ou plutôt vers la suite de la voie endosomale (Huotari & Helenius, 2011).

Deux protéines sont utilisées pour étudier le recyclage et la dégradation (Huotari & Helenius, 2011):

-pour la voie de recyclage, la transferrine et son récepteur

-pour la voie de dégradation l'EGF (*epidermal growth factor*, facteur de croissance épidermique) et son récepteur qui après ubiquitination, vont être dégradés dans les lysosomes.

Le pH faiblement acide des endosomes précoces compris entre 6,9-6,2, permet la dissociation ligand-récepteur, entraînant le recyclage des récepteurs et la dégradation des ligands. C'est le cas des LDL et de leurs récepteurs. L'internalisation des LDL, leur parcours dans la voie endosomale et la distribution du cholestérol sont détaillés dans la partie cholestérol (Goldstein et al., 1985; Scott et al., 2014).

Deux voies de recyclages sont possibles. Une voie directe médiée par Rab 4 permettant le recyclage direct de l'endosome précoce vers la membrane plasmique (Galvez et al., 2012). L'autre voie, une voie indirecte, passe par les endosomes de recyclage, où la protéine Rab 11 va réguler le recyclage (Galvez et al., 2012).

En plus du recyclage, les cargos ont une autre voie que la dégradation qui est le TGN. Ce trafic endosome précoce - TGN est appelé transport rétrograde (Scott et al., 2014). Ce trafic bidirectionnel est médié par des vésicules et est régulé par les rétromères. Ces derniers sont un complexe protéique composé de 3 protéines : VPS 35, VPS 26 et VPS 29 (VPS : *Vacuolar protein sorting*, « protéines de sortie vacuolaire ») (Seaman, 2012). Les rétromères vont interagir avec des protéines SNX (sorting nexin) (Seaman, 2012). Les protéines SNX contiennent un domaine BAR qui va permettre la déformation de la membrane de l'endosome précoce et donc la formation de vésicules en direction du TGN (Scott et al., 2014; Seaman, 2012). Les endosomes précoces ont une très grande activité de fusion, à la fois avec d'autres endosomes précoces, mais aussi avec d'autres vésicules : issues du TGN et de l'endocytose. Cette activité de fusion est régulée par Rab 5 et les complexes SNAREs (*Soluble N-*

éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor) (Scott et al., 2014). Les complexes SNAREs vont rendre possible la fusion de vésicules avec d'autres vésicules ou des organites. Des études ont montré que les SNAREs impliquées au niveau endosomal sont: Rabex-5/BAbaptin et VPS34 (Ohya et al., 2009). D'autres cofacteurs sont également impliqués, comme les facteurs *thetering* EEA1 et rabenosyne-5 (Ohya et al., 2009). Les facteurs *thetering* (d'accrochage) sont des protéines qui vont aider à la formation des vésicules ou à l'absorption des vésicules. Enfin, un dernier complexe intervient dans ces fusions, c'est le complexe CORVET qui n'est présent que dans les endosomes précoces et les corps multi-vésiculaires (Balderhaar et al., 2013; Peplowska et al., 2007).

Pour permettre la transmission des cargos vers le reste de la voie endosomale, les endosomes précoces ont une activité d'invagination. Ils peuvent former des vésicules intra-luminales qui permettent l'internalisation des cargos pour les diriger vers la destruction. Les vésicules intra-luminales vont être formées par le complexe *Endosomal Sorting Complexes Required for Transport* (ESCRT) (Henne et al., 2011; Huotari & Helenius, 2011; Scott et al., 2014). Les protéines humaines constituant les différents complexes ESCRT sont présentées dans le tableau 14 (adapté de (Henne et al., 2011)).

Tableau 14- Protéines humaines constituant les différents complexes ESCRT

Complexes	Protéines
ESCRT-0	HRS / STAM1/2
ESCRT-I	TSG101 / hVps28 / Vps37A,B,C / hMvb12A,B
ESCRT-II	EAP45 / EAP30 / EAP20
ESCRT-III	CHMP6 / CHMP4A,B,C / CHMP3 / CHMP2A,B
« VPS4 »	SKD1 / CHMP5 / LIP5

Brièvement (figure 13), le début de la formation des vésicules intra-luminales est le recrutement du complexe ESCRT-0 (1-2). Ce complexe est recruté par la reconnaissance de cargos ubiquitinilés et de domaine FYVE (*PtdIN(3)P-Binding site*) par sa sous unité HRS. ESCRT-0 recrute les complexes ESCRT-I et -II(3). L'association de ces trois complexes permet la formation de l'invagination et la séquestration des cargos. Ensuite ESCRT-III est recruté, entraînant la désubiquitination des cargos et le désengagement des ESCRT-0, -I, -II. Ensuite, ESCRT-III entraîne la formation d'un tubule, qui après scission, va libérer dans le

lumen de l'endosome précoce, une vésicule appelée vésicule intra-luminale (ILV) (4-5). Enfin, ESCRT-III va être éliminée par le complexe VPS4 (6). Cette formation des ILV est la même pour les corps multi-vésiculaires et les endosomes tardifs (Henne et al., 2011).

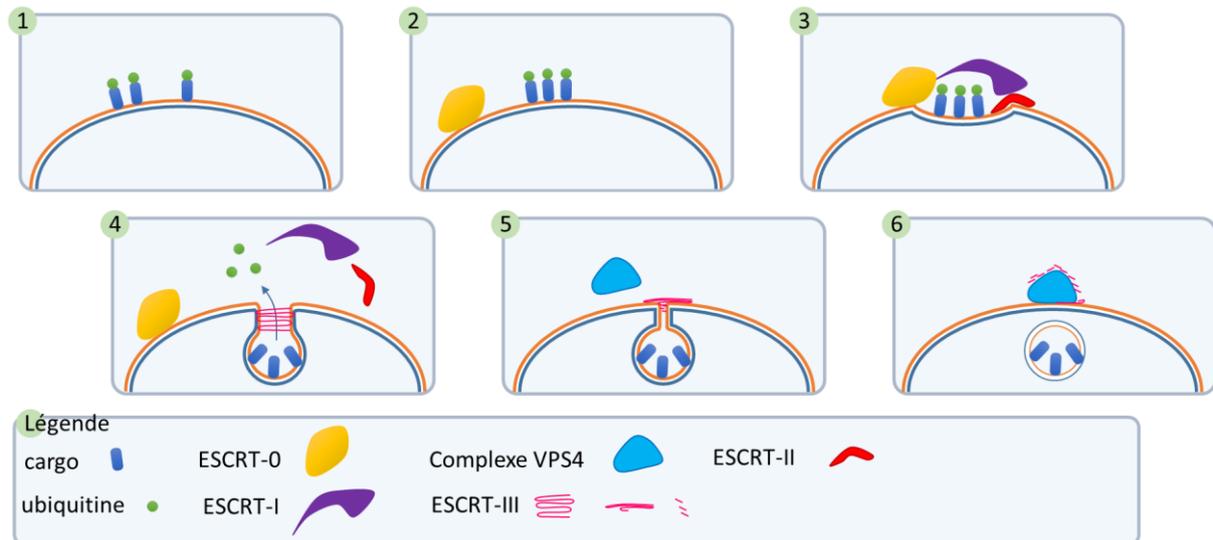


Figure 13 Formation de vésicules intra-luminales dans la voie endosomale

Les endosomes précoces vont ensuite migrer de l'espace proche de la membrane plasmique, vers l'espace périnucléaire entraînant leur maturation dans un premier temps en corps multi-vésiculaires (Huotari & Helenius, 2011; Scott et al., 2014). Cette maturation entraîne plusieurs changements : les corps multi-vésiculaires perdent leur excroissance pour retrouver une forme sphérique ; puis une diminution du pH grâce à la V-ATPase passant de 6,2 à 5,5 (Scott & Gruenberg, 2011). Les corps multi-vésiculaires perdent leur faculté de fusion avec les autres corps multi-vésiculaires (fusion homotypique) mais acquièrent la capacité de fusion avec les organites de la voie de dégradation (Gruenberg, 2001). Au cours de la migration vers l'espace périnucléaire, on observe le début des changements protéiques avec le remplacement de la protéine Rab 5 par Rab 7, puis du complexe CORVET par HOPS, régulé par un complexe protéique composé de SAND1/MON1-CCZ1 (Kinchen & Ravichandran, 2010; Poteryaev et al., 2010). Ce changement est progressif induisant une étape où les 2 protéines Rab et les 2 complexes sont présents.

Le mouvement des endosomes précoces, endosomes tardifs et corps multi-vésiculaires est effectué le long des microtubules via les kinésines, pour un mouvement vers la membrane

plasmique, et par la dynéine pour un mouvement vers la zone périnucléaire (Bananis et al., 2000; Murray et al., 2000; Soppina et al., 2009) (figure14). Le mouvement vers la zone périnucléaire est régulé par la concentration en cholestérol : si la concentration en cholestérol est trop faible, la dynéine est inhibée par la protéine ORP1L (*OSBP Related protein, OSBP oxysterol-binding protein*) (Rocha et al., 2009; Vihervaara et al., 2011).

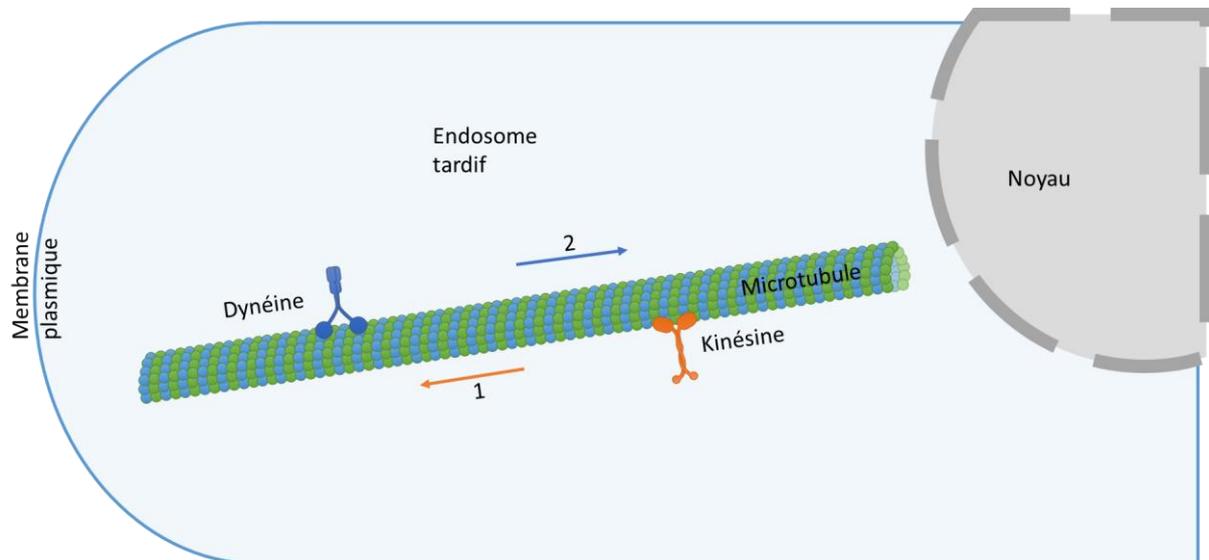


Figure 14: mouvement des endosomes : 1 : mouvement des endosome vers la membrane plasmique via la Kinésine ; 2 : déplacement des endosomes vers l'espace péri nucléaire via la Dynéine

Les corps multi-vésiculaires ont deux devenir possibles, soit la fusion avec les endosomes tardifs pour la dégradation, soit la fusion avec la membrane plasmique pour la sécrétion d'exosomes.

Selon le type de cargos internalisés, les endosomes tardifs vont pouvoir fusionner avec d'autres endosomes tardifs, des corps multi-vésiculaires et des lysosomes (Gruenberg, 2001). Les endosomes tardifs vont délivrer des molécules dans la cellule avant de fusionner avec les lysosomes. Les endosomes tardifs sont le carrefour du trafic intracellulaire du cholestérol. En effet, c'est depuis les endosomes tardifs que le cholestérol va être distribué dans la cellule. Les mécanismes de distribution seront présentés dans la partie cholestérol. Les endosomes tardifs ont un nombre important de vésicules intra-luminales et de taille très variable allant de 30-100nm (Scott et al., 2014).

Morphologiquement, les endosomes tardifs sont très hétérogènes et leur forme varie en fonction du type cellulaire. Ils sont sphériques avec des excroissances, comme les endosomes précoces, et vont contenir des structures multi-vésiculaires (Scott et al., 2014).

Les ILV des endosomes tardifs ont des compositions différentes en lipides et protéines (Scott et al., 2014). Cependant un phospholipide, le BMP est majoritairement présent dans ces ILV (Kobayashi et al., 1998). Ce dernier joue un rôle dans la formation des ILV issues de l'invagination de la membrane limitante vers le lumen des endosomes (Gruenberg, 2020; Hullin-Matsuda et al., 2009; Matsuo et al., 2004; Scott et al., 2014), ainsi que dans leur transport rétrograde vers l'extérieur des endosomes après fusion avec la membrane limitante. Ce transport rétrograde est régulé par le BMP et ALIX (*Alg-2 interacting protein x*), une protéine associée au complexe ESCRT (Dikic, 2004; Falguières et al., 2009; Matsuo et al., 2004). Il peut être détourné par les virus notamment pour échapper à la dégradation lysosomale et est appelé *back fusion* (Abrami et al., 2013; Gruenberg, 2020; Gruenberg & van der Goot, 2006; Le Blanc et al., 2005; Luyet et al., 2008).

A terme, les endosomes tardifs vont fusionner avec les lysosomes pour former un organite hybride : l'endolysosome (Huotari & Helenius, 2011; Scott et al., 2014). Les endosomes tardifs fournissent aux lysosomes des hydrolases, des ions, un pH acide, et des protéines structurales comme les LAMP (Scott et al., 2014). Pour protéger leurs membranes limitantes des hydrolases intraluminales, les endolysosomes sont entourés d'une couche protectrice le glycocalyx (Peters & von Figura, 1994; Schulze et al., 2009), constitué de glycoprotéines. Ces protéines fortement N-glycosylées sont regroupées en deux familles, les protéines LIMPs (*lysosomal integral membrane proteins*) et LAMPs (*lysosomal associated membrane proteins*) (Carlsson et al., 1988; Schulze et al., 2009). Etant présentes sur les endolysosomes, les endosomes et les lysosomes, elles ne permettent pas une identification claire de ces organelles.

Comme vu précédemment, il y a peu de différence protéique entre les endosomes tardifs et les lysosomes. Néanmoins, les lysosomes sont sphériques, plus denses aux électrons et plus denses de façon générale, ce qui permet de les différencier (de Duve, 2005; Scott et al., 2014).

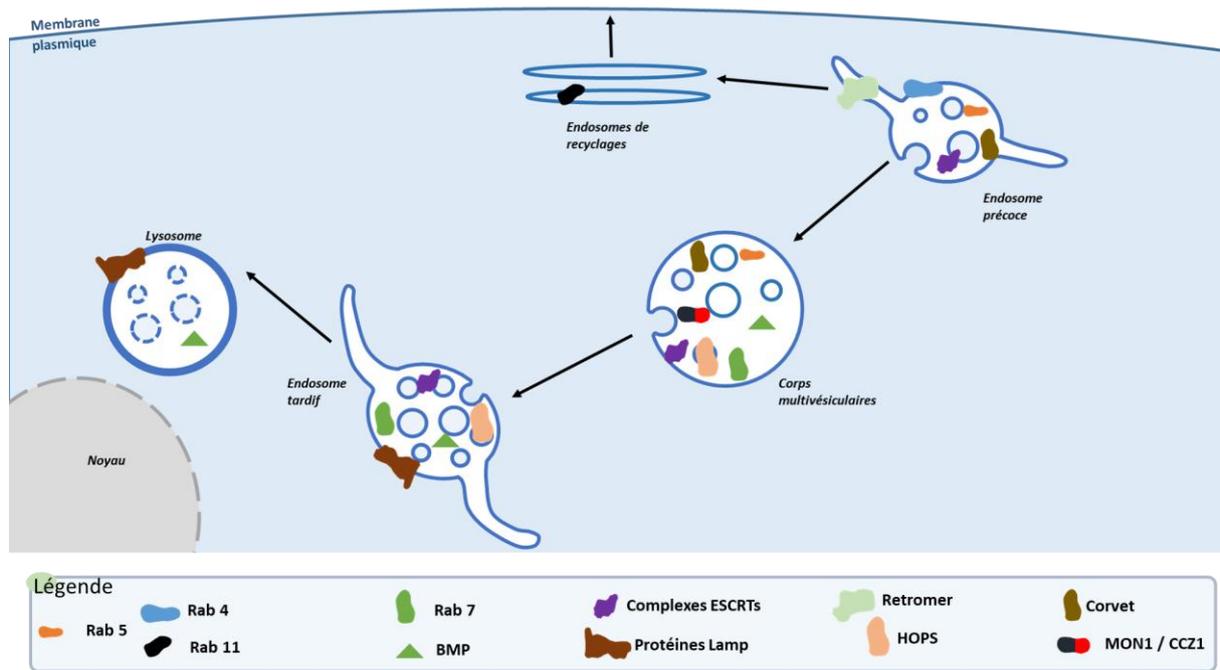


Figure 15: Différents acteurs de la voie endosomale

2.3 Dysfonction endolysosomal

2.3.1 Introduction générale

Il existe trois types de maladies de surcharge lysosomale, parfois appelées aussi phospholipidoses en raison de l'accumulation massive de PL intracellulaires:

- Les maladies de surcharge lysosomale génétiques, comme par exemple la maladie de Niemann-Pick de type C (NPC),
- Les maladies de surcharge lysosomale médicamenteuses induites par des agents pharmacologiques comme l'amiodarone ou la chloroquine,
- Les maladies de surcharge lysosomale « alimentaires » dues à une consommation élevée en lipides comme lors des syndromes métaboliques et l'athérosclérose.

2.3.2 Maladies de surcharge lysosomale génétiques

Les maladies de surcharge lysosomale génétiques sont aussi appelées LSD pour *Lysosomal Storage Disorder*. Elles sont dues à une modification ou à une inactivation de l'activité enzymatique dans une voie du métabolisme lipidique. Généralement, les enzymes inactivées sont présentes dans le compartiment endolysosomal. Ils existent de nombreuses LSD qui vont généralement toucher des enfants, en les rendant lourdement handicapés (tableau 17), incluant la maladie de Niemann-Pick de type C (NPC), de type A et B, la maladie de Gaucher, de Fabry (tableau 15).

Les maladies de Niemann-Pick ont été observées dans les années 1920 par Albert Niemann et Ludwig Pick (Vanier, 2010). Elles sont catégorisées en 4 types de A à D en fonction du type de lipide augmenté (Vanier, 2010). La maladie de Niemann-Pick de type C entraîne une accumulation massive de cholestérol dans les endolysosomes (Pentchev et al., 1994).

En fonction de l'âge de l'apparition des premiers symptômes, la NPC ne se développera pas à la même vitesse. Les symptômes de la maladie peuvent apparaître chez des jeunes enfants d'environ 10 ans, mais parfois, chez des plus jeunes, des adolescents ou encore chez des jeunes adultes. Plus la maladie se déclarera tôt, plus l'état du patient se dégradera rapidement. Les principaux symptômes de cette maladie sont des troubles moteurs liés à une accumulation de cholestérol dans les cellules neuronales. Pour la forme infantile (moins de 10 ans), le principal symptôme est une ascite, généralement accompagnée de troubles respiratoires. Elle peut aussi être présente sous la forme de retards de développement. Pour les enfants d'environ 10 ans, la maladie se caractérise par une démence précoce, des troubles locomoteurs, de l'épilepsie et des troubles de déglutition. Pour les adultes, elle se caractérise principalement par des troubles neurologiques et une démence. Le cerveau est l'organe contenant le plus de cholestérol en condition physiologique, et dans le cas de la maladie de NPC, des troubles du système nerveux sont constatés (tableau 15)(Vanier, 2010).

La maladie est actuellement très difficile à détecter. Au stade précoce de la maladie, il n'existe pas de marqueurs biologiques, ni dans les urines, ni dans le sang rendant ainsi le diagnostic difficile. La méthode de référence est une biopsie de peau, permettant d'observer l'accumulation de cholestérol libre dans les endolysosomes de fibroblastes par marquage à la filipine.

La NPC est une maladie génétique rare avec seulement un enfant touché sur 120 000 naissances. La transmission de la maladie est dite autosomique récessive. Les gènes impliqués sont ceux codants pour les protéines NPC1 (Carstea et al., 1997) et NPC2 (Carstea et al., 1993). Les mutations sur la protéine NPC1 représente 95% des cas de NPC (Vanier et al., 1996). Les protéines NPC1 et NPC2 sont indispensables pour le transport du cholestérol issu de l'endocytose des LDL des endosomes tardifs vers le reste de la cellule. Le trafic du cholestérol cellulaire avec sa sortie des endosomes est détaillé dans la partie cholestérol (chapitre 3). La mutation d'une ou l'autre des protéines NPC entraîne une surcharge endosomale en cholestérol entraînant un dysfonctionnement cellulaire (McCauliff et al., 2019; Vanier, 2010) (figure16).

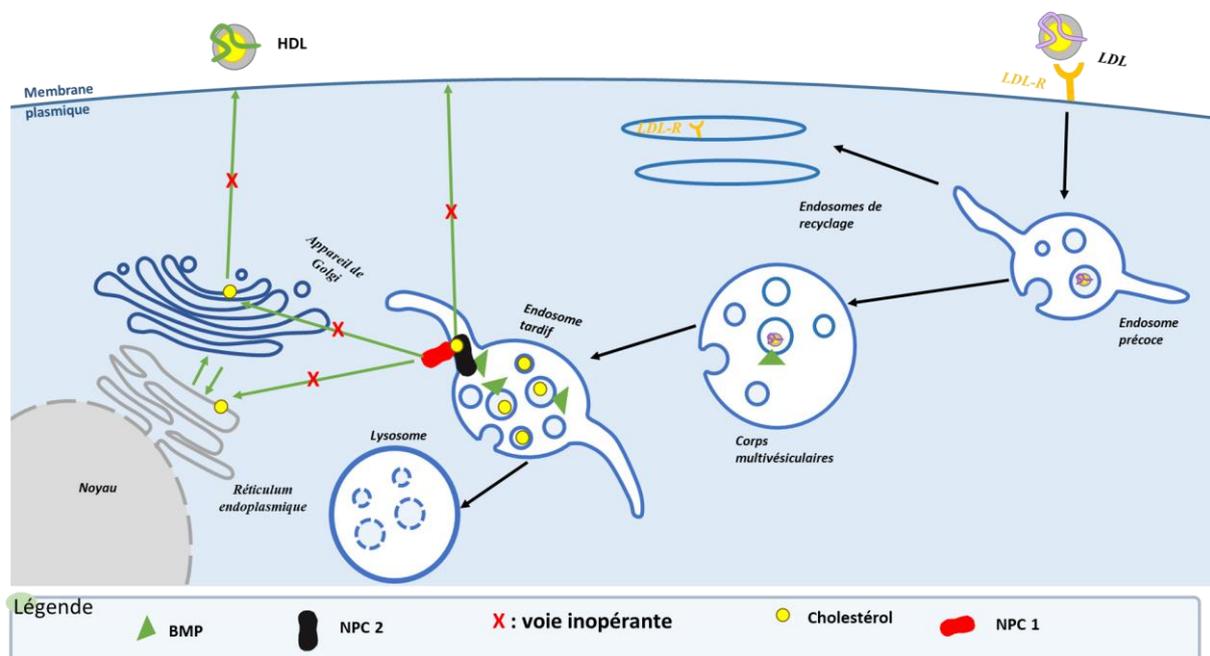


Figure 16: schéma simplifié de la perturbation du trafic intracellulaire du cholestérol en cas de mutation des protéines endosomales NPC 1 et/ou NPC 2 (phénotype NPC)

Tableau 15: liste non exhaustive de LSD modifié de (Platt et al., 2018)

Maladie (gène)	type	Conséquence	Augmentation du BMP cellulaire
Maladie de Fabry (GLA)	Défaut enzymatique de l' α -Galactosidase A, diminution du catabolisme	Accumulation de Globotriaosylceramide	Oui (Meikle et al., 2008)
Maladie de Gaucher	Défaut enzymatique de la β Glucocerebrosidase (β -glucosidase), diminution du catabolisme	Accumulation de glucocerebroside et glucosylsphingosine	Oui (Meikle et al., 2008)
Maladie de Niemann–Pick de type A et B	Défaut enzymatique de la Sphingomyéline phosphodiesterase, diminution du catabolisme (sphingomyélinase acide)	Accumulation de Sphingomyélines	Oui, (Walkley & Vanier, 2009)
Maladie de Niemann–Pick de type C	Mutation des protéines NPC 1 et/ou NPC 2 entraînant un défaut du transport intracellulaire du cholestérol	Accumulation de cholestérol et sphingolipides	Oui (Meikle et al., 2008), (Walkley & Vanier, 2009)
Maladie de Sandhoff b	Défaut enzymatique de β -Hexosaminidase, diminution du catabolisme	Accumulation de ganglioside GM2, de glycolipide GA2 et d'autres oligosaccharides	Oui (Akgoc et al., 2015)
Mucopolysaccharidose (MPS)			
MPS I	Défaut enzymatique de l' α -L-Iduronidase, diminution du catabolisme	Accumulation de Dermatan sulfate et d'héparane sulfate (polysaccharide)	Oui (Meikle et al., 2008)
MPS II,	Défaut enzymatique de l'Iduronate 2-sulfatase, diminution du catabolisme	Accumulation de Dermatan sulfate et d'héparane sulfate (polysaccharide)	Oui (di-DHA BMP) (Meikle et al., 2008)
MPS IIIA,	Défaut enzymatique de la N- Sulfoglucosamine, sulfohydrolase diminution du catabolisme	Accumulation d'héparane sulfate (polysaccharide))	

2.3.3 Maladies de surcharge lysosomale médicamenteuses

Les maladies de surcharge lysosomale médicamenteuses ou phospholipidoses médicamenteuses sont provoquées par une famille de molécules chimiques appelée CAD pour *Cationic Amphiphilic drugs*, ou médicaments cationiques lysosomotropiques (Breiden & Sandhoff, 2019) (Figure18). Ces molécules sont composées d'une partie hydrophobe, généralement constituée de cycle aromatique et d'une partie hydrophile et sont chargées positivement. Ces médicaments sont beaucoup prescrits bien qu'ils aient de très importants effets secondaires. C'est le cas de l'amiodarone un anti arythmique très utilisé, qui, par la présence d'iode dans sa structure a un tropisme pour la thyroïde entraînant une dysthyroïdie dans 20% des cas (Basaria & Cooper, 2005; Tsang & Houlden, 2009). On retrouve aussi une atteinte hépatique et respiratoire (Florek & Girzadas, 2021). La chloroquine (et l'hydroxychloroquine) utilisée contre le paludisme et plus récemment aussi contre la Covid-19, peut être mortelle en cas de surdosage puisque la limite entre dose mortelle et dose thérapeutique est très faible. Les CAD de par leur structure amphiphile traverse très facilement les membranes cellulaires, et leur charge positive les dirige naturellement vers les compartiments acides des cellules c'est-à-dire les endolysosomes (Breiden & Sandhoff, 2019). Ces molécules vont ainsi s'accumuler dans ces organites car leur dégradation est très longue, plusieurs mois pour l'amiodarone et l'hydroxychloroquine. Le mécanisme d'action des CAD entraînant une phospholipidose n'est pas clairement établi, et pourrait dépendre de la molécule en elle-même. Néanmoins trois mécanismes communs ont été proposés (Abe & Shayman, 2009)

- Une action directe de la molécule CAD sur une protéine indispensable à la fonction des endolysosomes, comme l'inhibition directe de l'activité phospholipase lysosomale en se fixant sur son site actif ;
- Une modification du pH des endolysosomes, empêchant ainsi les enzymes acides de dégradation de fonctionner par augmentation du pH en raison de l'accumulation de la forme ionisée de la CAD,
- Une neutralisation de la charge négative des phospholipides membranaires due à la fixation de la CAD empêchant l'interaction avec la phospholipase lysosomale (mécanisme alternatif d'inhibition indirecte de l'activité phospholipase lysosomale)

Le diagnostic d'une phospholipidose induite par les CAD nécessite une biopsie pour observer la présence de corps multilamellaires dans les cellules par microscopie électronique (figure17). Il est donc urgent de pouvoir identifier des marqueurs sanguins ou urinaires permettant de suivre l'apparition des signes de phospholipidoses, pour décider de l'arrêt du traitement médicamenteux.

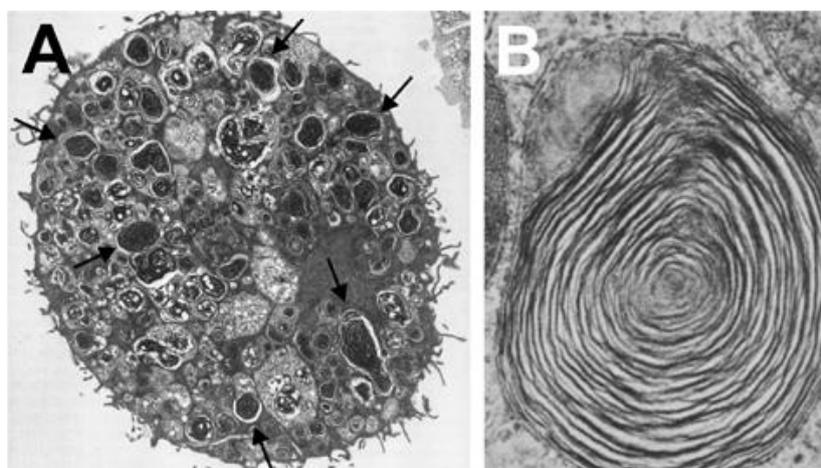


Figure 17 : cliché de microscopie électronique de maladie de surcharge lysosomale (Breiden & Sandhoff, 2019); A : Macrophage alvéolaire de rat traité par le chlorphentermine observation de nombreux corps multilamellaires (Hook, 1991) ; B : corps multilamellaire d'une cellule chromaffine de rat traité par le 1 chloro-amitriptyline (Lüllmann et al, 1978).

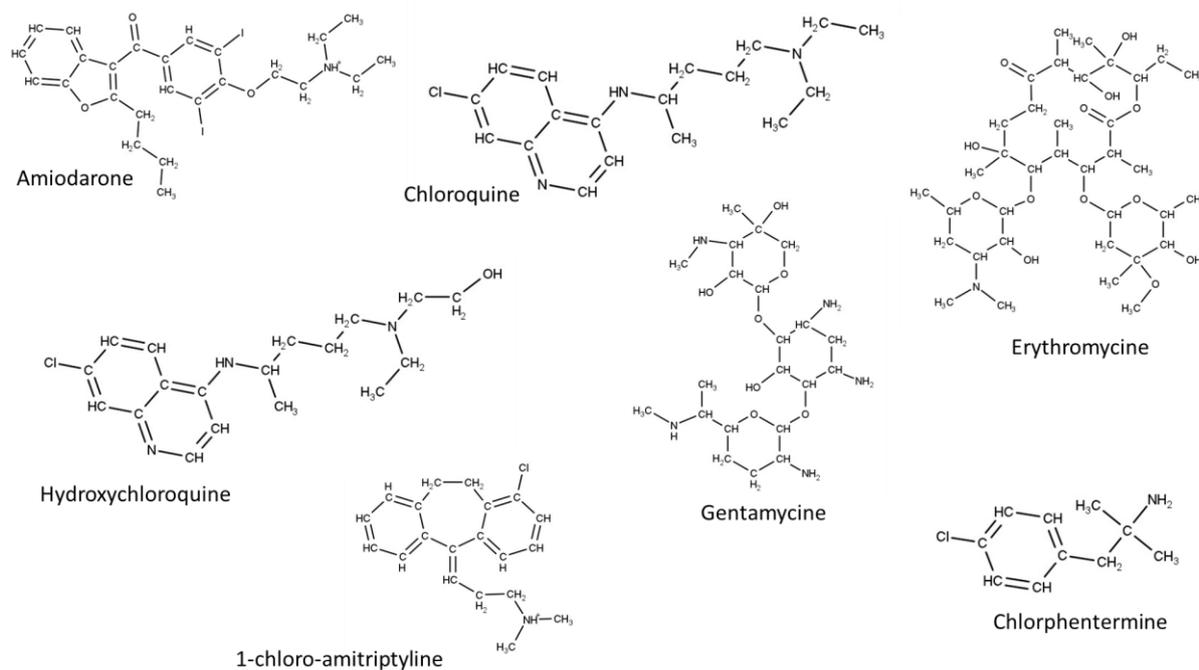


Figure 18: Liste non exhaustive de Cationic Amphiphilic drugs

2.3.4 Maladies de surcharge lysosomale alimentaires

Les maladies de surcharge lysosomale alimentaires, dues à une alimentation riche en lipides, incluent par exemple l'athérosclérose, l'obésité ou la stéatose hépatique non alcoolique (NASH).

L'athérosclérose est une « maladie » touchant tout le monde. En effet, les dépôts lipidiques caractéristiques de l'athérosclérose débutent dès l'enfance, mais les premiers symptômes n'apparaissent que vers 40-50ans (NSFA). Elle est à l'origine des maladies cardiovasculaires qui représente environ 30 % des morts dans le monde (WHO). En France, les maladies cardiovasculaires représentent environ 150 000 morts par an, dont 120 000 infarctus (FRM). L'athérosclérose est aussi responsable d'environ 150 000 accidents vasculaires cérébraux en France par an (FRM) . L'athérosclérose est une « maladie » liée à un désordre lipidique associé à un fort contexte inflammatoire (Frostegård, 2013; Kobiyama & Ley, 2018; Libby et al., 2019).

Elle se caractérise par des dépôts lipidiques (plaque d'athérome) au niveau des artères, qui résultent notamment d'anomalies de l'homéostasie du cholestérol issu des LDL au niveau des macrophages (Figure 19 et 20).

Les LDL circulantes sont les lipoprotéines qui permettent d'amener le cholestérol exogène aux cellules, via la circulation sanguine. L'athérosclérose s'accompagnant d'un stress oxydant, les LDL vont être oxydées par un mécanisme qui n'est pas encore totalement élucidé (Navab et al., 2004). Ces LDL oxydées vont se déposer en agrégats dans l'intima des vaisseaux sanguins (Williams & Tabas, 1995), déclenchant une réaction inflammatoire entraînant le recrutement des monocytes circulants (Libby et al., 2019, 2019). Ces monocytes vont traverser la paroi vasculaire par diapédèse pour aller dans l'intima des vaisseaux et se différencier en macrophage. Les macrophages vont ensuite capter et phagocyter les dépôts de LDL oxydées. Cette captation s'effectue via les récepteurs *scavenger* (Kunjathoor et al., 2002; Moore et al., 2013) de façon non régulée contrairement à la captation via les LDL-R (récepteur aux LDL), entraînant une entrée massive de LDL oxydées. A cela s'ajoute une diminution de l'efflux du cholestérol des macrophages via les HDL (Navab et al., 2004) (figure 20) , résultant en une surcharge en cholestérol dans les cellules, au niveau des endosomes mais aussi sous la forme de gouttelettes lipidiques. Les macrophages qui sont gorgés de cholestérol, sont appelés cellules

spumeuses et se déposent peu à peu dans l'intima des cellules, s'agréant jusqu'à diminuer la lumière des vaisseaux sanguins (Williams & Tabas, 1995). Ce dépôt est appelé plaque d'athérome (figure 19). A terme ces plaques peuvent se rompre entraînant des infarctus, des accidents vasculaires.... Pour le traitement, des régimes alimentaires pauvre en lipides sont proposés, des traitements chirurgicaux, ou des traitements hypocholestérolémiants comme les statines. En ce qui concerne le diagnostic, la première étape est d'analyser le rapport entre les HDL et les LDL circulantes qui n'est pas représentative de l'évolution de l'athérosclérose. Ensuite des examens plus complexes et invasifs peuvent être réalisés pour visualiser la formation des plaques d'athérome.

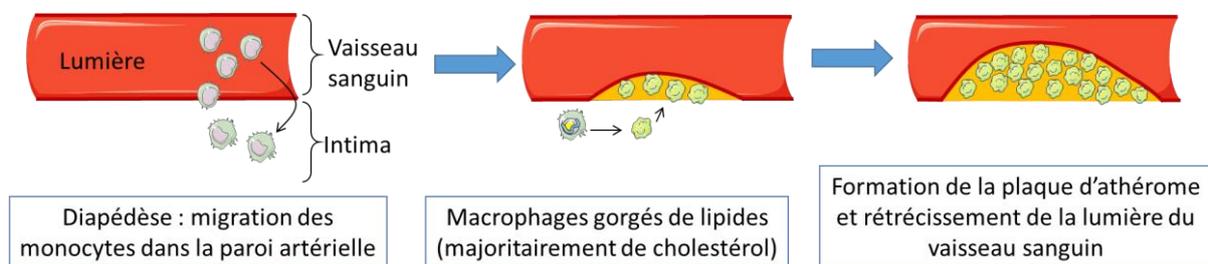


Figure 19: formation de la plaque d'athérome

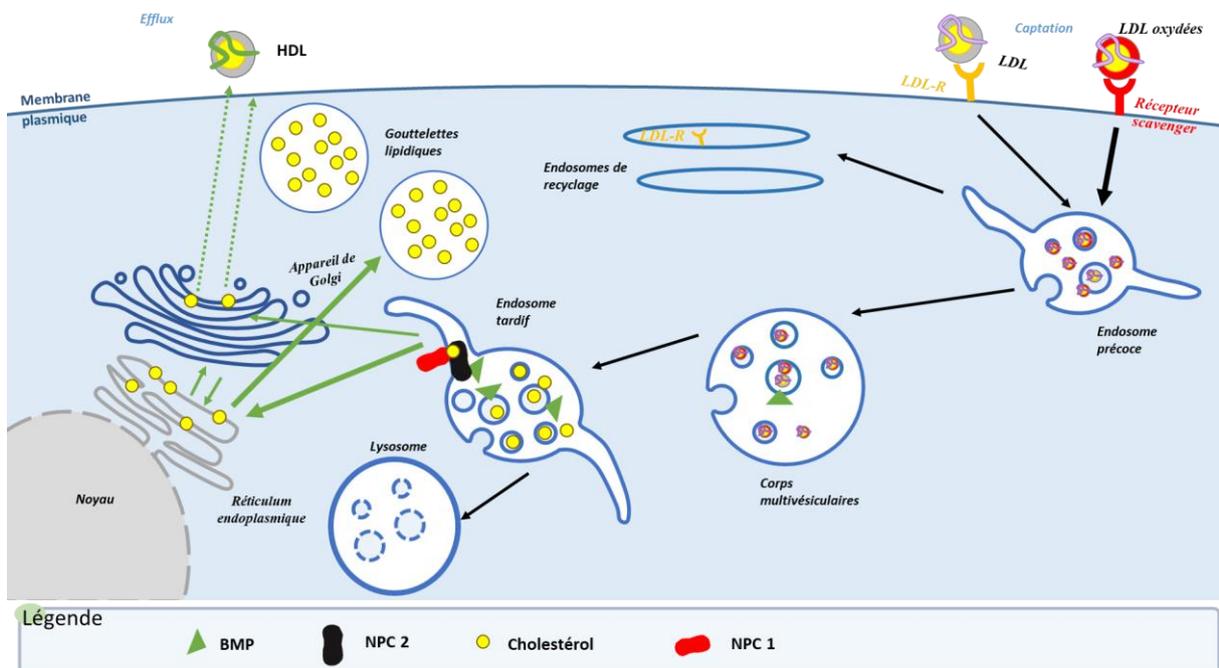


Figure 20: Entrée dérégulée des LDL oxydées et modification du trafic intracellulaire du cholestérol

Chapitre 3 : Cholestérol

Introduction

Le cholestérol est un lipide qui a été découvert par François Poulletier de la Salle en 1758 dans des calculs biliaires. Le cholestérol est souvent décrié pour son risque athérogène. En effet, un régime riche en cholestérol est associé à une augmentation des risques de « maladies » cardiovasculaires dont l'athérosclérose. Néanmoins le cholestérol est bénéfique, en effet il est présent dans les membranes des cellules, il est le précurseur des hormones stéroïdiennes et de certains acides biliaires.

3.1 Informations génériques sur le cholestérol

3.1.1 Synthèse et structure

Le cholestérol peut être synthétisé par toutes les cellules de mammifère, mais 50% de la biosynthèse de cholestérol est réalisée par les hépatocytes (Luo et al., 2020). Le cholestérol est synthétisé à l'issue de 20 réactions enzymatiques successives en prenant comme premier précurseur l'acétyl-CoA. Ces enzymes sont localisées dans le RE des cellules. La synthèse du cholestérol est présentée dans la figure 21.

L'HMG-CoA réductase est l'enzyme clef de la synthèse de cholestérol. En effet, elle catalyse la réaction limitante de cette synthèse. Cette étape est donc la clef de la régulation de la synthèse de cholestérol *in vivo* (Luo et al., 2020). Elle est la cible des statines (inhibiteurs) qui permettent de diminuer la quantité de cholestérol.

Le cerveau nécessite une quantité importante de cholestérol pour l'homéostasie membranaire des différentes cellules le constituant, cependant ce cholestérol ne provient pas de l'alimentation ni de la *de novo* synthèse issue du foie (Pfrieger & Ungerer, 2011). En effet les lipoprotéines qui transportent le cholestérol dans le sang sont trop volumineuses pour passer la barrière hémato-encéphalique. Le cerveau est autonome en ce qui concerne la production de cholestérol. Les astrocytes produisent le cholestérol et le fournissent aux neurones (Pfrieger & Ungerer, 2011).

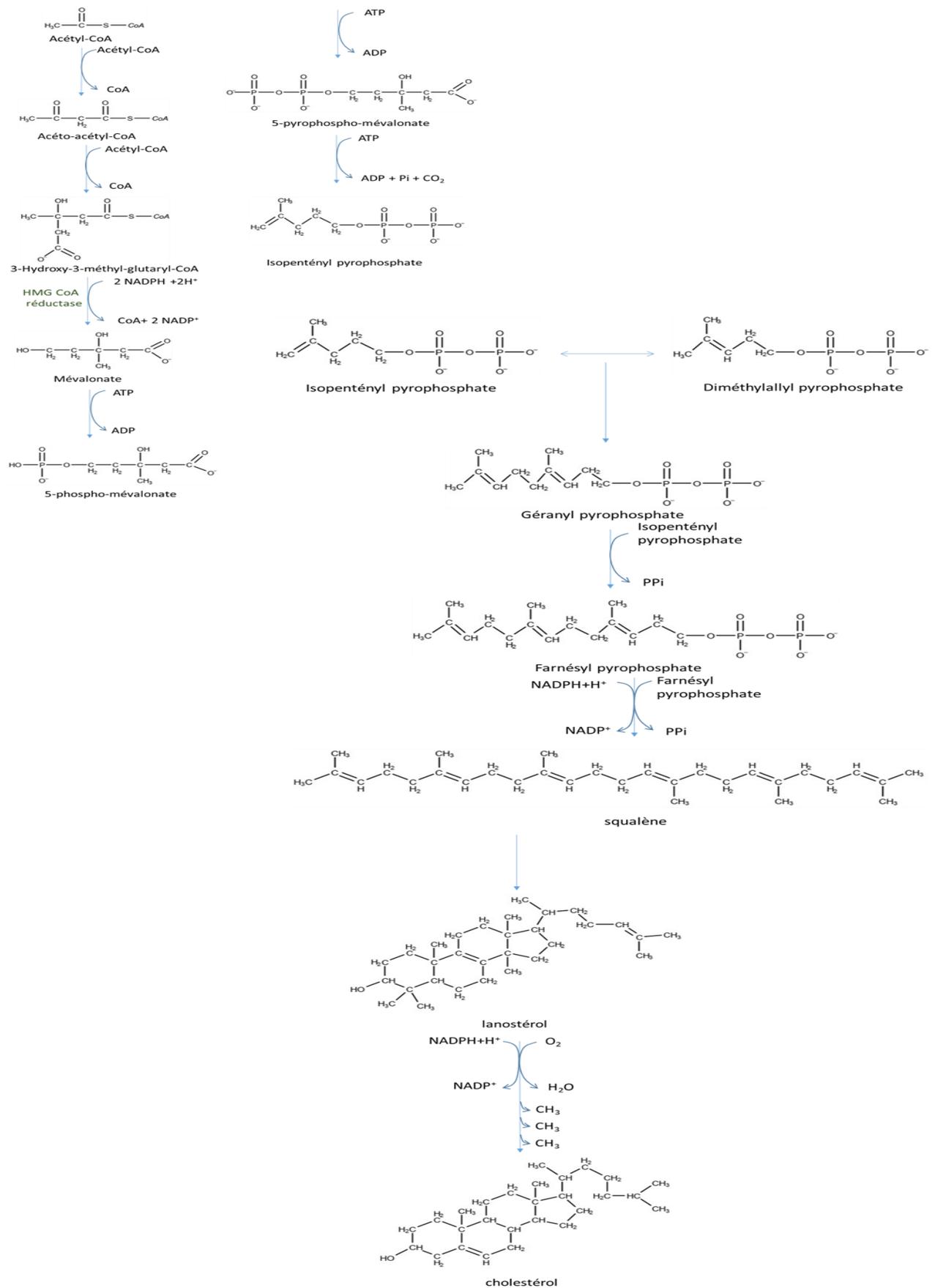


Figure 21: synthèse du cholestérol

3.1.2 Localisation

Le cholestérol est présent sous 2 formes dans les cellules : le cholestérol libre et le cholestérol estérifié par un acide gras. La majorité du cholestérol libre se retrouve dans la membrane plasmique (40%), ensuite dans les endosomes tardifs (lieu de sa distribution cellulaire lors d'apport exogène), puis à peu près dans des proportions similaires dans l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique puis la mitochondrie (tableau 16). Le cholestérol est présent dans toutes les membranes cellulaires. Il joue un rôle dans la fluidité et la dynamique des membranes. Il se trouve dans des régions riches en cholestérol nommées radeaux lipidiques. Les esters de cholestérol sont une forme de stockage du cholestérol dans le RE où est réalisée l'estérification du cholestérol, et dans les gouttelettes lipidiques où sont stockés les esters de cholestérol.

Tableau 16: répartition cellulaire du cholestérol (van Meer et al., 2008)

Membranes /Organites	Réticulum endoplasmiques	Membrane plasmique	Mitochondrie	Appareil de Golgi	Endosome tardifs
Ratio (Cholestérol/ Phospholipides total)	0.15	1	0.1	0.2	0.5

3.2 Homéostasie du cholestérol

3.2.1 Apport du cholestérol

Bien que toutes les cellules soient capables de synthétiser le cholestérol, la majorité du cholestérol est apportée aux cellules par le biais des lipoprotéines. C'est le cas pour les macrophages qui sont capables de capter les LDL circulantes grâce aux LDL-R : récepteurs aux LDL. Ce récepteur a été découvert par Goldstein et Brown en 1973 (Goldstein et al., 1985), lauréats du prix Nobel de médecine en 1985. Le complexe LDL /LDL-R est ensuite internalisé dans les macrophages selon un mécanisme d'endocytose médié par la clathrine (voir partie endocytose) et rejoint ainsi les endosomes précoces. Le pH faiblement acide d'environ 6,5 des endosomes précoces, permet de séparer spontanément les LDL, des LDL-R (Davis et al., 1987; Rudenko et al., 2002). Les LDL sont acheminées vers la voie endosomale tandis que les LDL-

R sont recyclés vers la membrane plasmique via les endosomes de recyclage (Mesmin & Maxfield, 2009). Les LDL sont dégradées dans les endosomes tardifs /lysosomes, permettant de libérer leur cœur d'esters de cholestérol qui sont hydrolysés pour libérer du cholestérol libre, par la lipase acide lysosomale LAL (Bartuzi et al., 2016; Zanoni et al., 2018). Le cholestérol libre va sortir des endosomes tardifs par divers mécanismes, dont un mécanisme dépendant des protéines NPC1 et NPC 2 (Infante et al., 2008, p. 2; Kwon et al., 2009; McCauliff et al., 2019; Vanier, 2010). NPC2 , présente dans le lumen des endosomes tardifs, transporte le cholestérol libre des ILV des endosomes tardifs à NPC1, en coopération avec le BMP (McCauliff et al., 2019). NPC1 est une protéine transmembranaire localisée dans les membranes des endosomes tardifs, elle permet la sortie du cholestérol des endosomes tardifs.

Des études portant sur le BMP et les protéines ORP (*OSBP related protein ; oxysterol-binding protein*) ont montré que la protéine ORP11 en coopération avec le BMP joue un rôle dans la sortie du cholestérol des endosomes tardifs mais les mécanismes sont pour le moment inconnus (Luquain-Costaz et al., 2020).

La protéine STARD3 est une protéine membranaire liant le cholestérol qui crée des sites de contact membranaire entre l'endosome tardif et le réticulum endoplasmique. Cette protéine permet le transfert du cholestérol entre les endosomes tardifs et le réticulum endoplasmique via les protéines VAPs (*VAMP-Associated Proteins ; Vesicular Associated Membrane Protein*) (Wilhelm et al. 2017; Wilhelm, Tomasetto, et Alpy 2016).

Le cholestérol libre issu des endosomes tardifs est dirigé soit vers le RE, soit vers la membrane plasmique. Dans le RE, le cholestérol est estérifié par l'ACAT (*acetyl CoA cholesterol acyl Transferase*) (Chang et al., 2009; Luo et al., 2020). Les esters de cholestérol ainsi formés sont stockés dans les gouttelettes lipidiques, et peuvent être hydrolysés par la cholestéryl ester hydrolase neutre (nCEH)(M. S. Brown et al., 1979; Sekiya et al., 2011) pour donner du cholestérol libre qui sera efflué par le biais des transporteurs ABC A1 et ABC G1, et capté par les accepteurs extracellulaires ApoA1 ou HDL (figure 22).

Des études ont montré que le cholestérol libre peut sortir de la cellule sous la forme d'exosomes, mécanisme toutefois marginal qui sera abordé dans le chapitre 4 (Strauss et al., 2010).

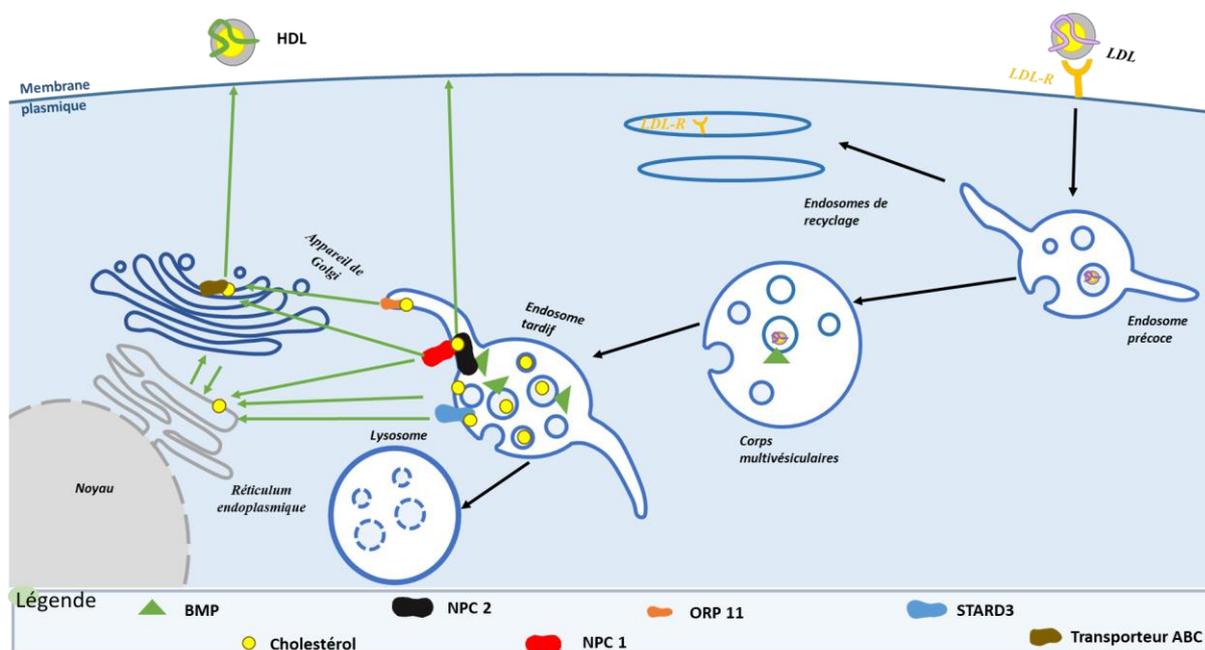


Figure 22 : distribution intracellulaire du cholestérol

3.2.2 Régulation cellulaire du cholestérol

L'homéostasie du cholestérol intracellulaire est très importante pour les cellules. Il y a une régulation fine entre la captation, la sortie et la synthèse *de novo* du cholestérol.

Quand la cellule est appauvrie en cholestérol, 3 mécanismes peuvent être mis en jeu : l'augmentation de la synthèse de cholestérol, l'augmentation de la captation de cholestérol et enfin la diminution de l'efflux de cholestérol (figure 23 B).

SREBP2 (*Sterol regulatory element binding protein 2*) est une protéine cytosolique qui, lorsqu'il y a peu de cholestérol dans la cellule, est dirigée vers le noyau et active la transcription des gènes de la synthèse de cholestérol, plus particulièrement celui de l'HMGCoA réductase qui est l'enzyme limitante de la synthèse de cholestérol. En parallèle, on observe une augmentation du nombre de LDL-R sur la surface cellulaire. Cette augmentation permet d'accentuer l'apport de cholestérol exogène aux cellules. D'autre part, les niveaux intracellulaires d'ABCG1 et ABCA1 sont diminués permettant de limiter l'efflux de cholestérol par les HDL et donc de garder le cholestérol dans la cellule (Luo et al., 2020).

A l'inverse quand les cellules sont en excès de cholestérol, elles vont diminuer la quantité de cholestérol intracellulaire : en diminuant la synthèse de cholestérol, en limitant l'entrée des LDL et en augmentant la sortie de cholestérol (figure 23 A).

LXR (*liver X receptor*) est une protéine cytosolique qui est délocalisée vers le noyau quand la concentration intracellulaire de cholestérol est trop importante. Les principaux ligands des LXR sont des oxystérols, dérivés oxydés qui sont produits lors d'une accumulation de cholestérol (Janowski et al., 1996, 1999). Les oxystérols se liant au LXR sont principalement ceux d'origine enzymatique (partie 3.3.3). Dans le noyau, LXR inhibe la transcription des enzymes de synthèse du cholestérol. L'efflux de cholestérol est accentué par l'augmentation de la proportion d'ABCA1 et ABCG1. On observe par ailleurs une diminution du recyclage du LDL-R entraînant une diminution de la captation de cholestérol (Luo et al., 2020).

Un autre mécanisme de régulation du cholestérol a récemment été découvert chez des patients atteints d'hypercholestérolémie familiale. Il s'agit d'une régulation extracellulaire par le biais de la PCSK9 (*proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*). PCSK9 est une protéine circulante d'origine hépatique qui lie les LDL-R et permet, après internalisation, de diminuer la concentration de LDL-R à la surface des cellules et donc de diminuer la captation cellulaire de cholestérol, augmentant ainsi la concentration sanguine de cholestérol. Contrairement au complexe LDL-R-LDL, le complexe PCSK9-LDL-R est irréversible empêchant le recyclage du LDL-R et entraînant sa dégradation (Leren, 2014) (figure 23).

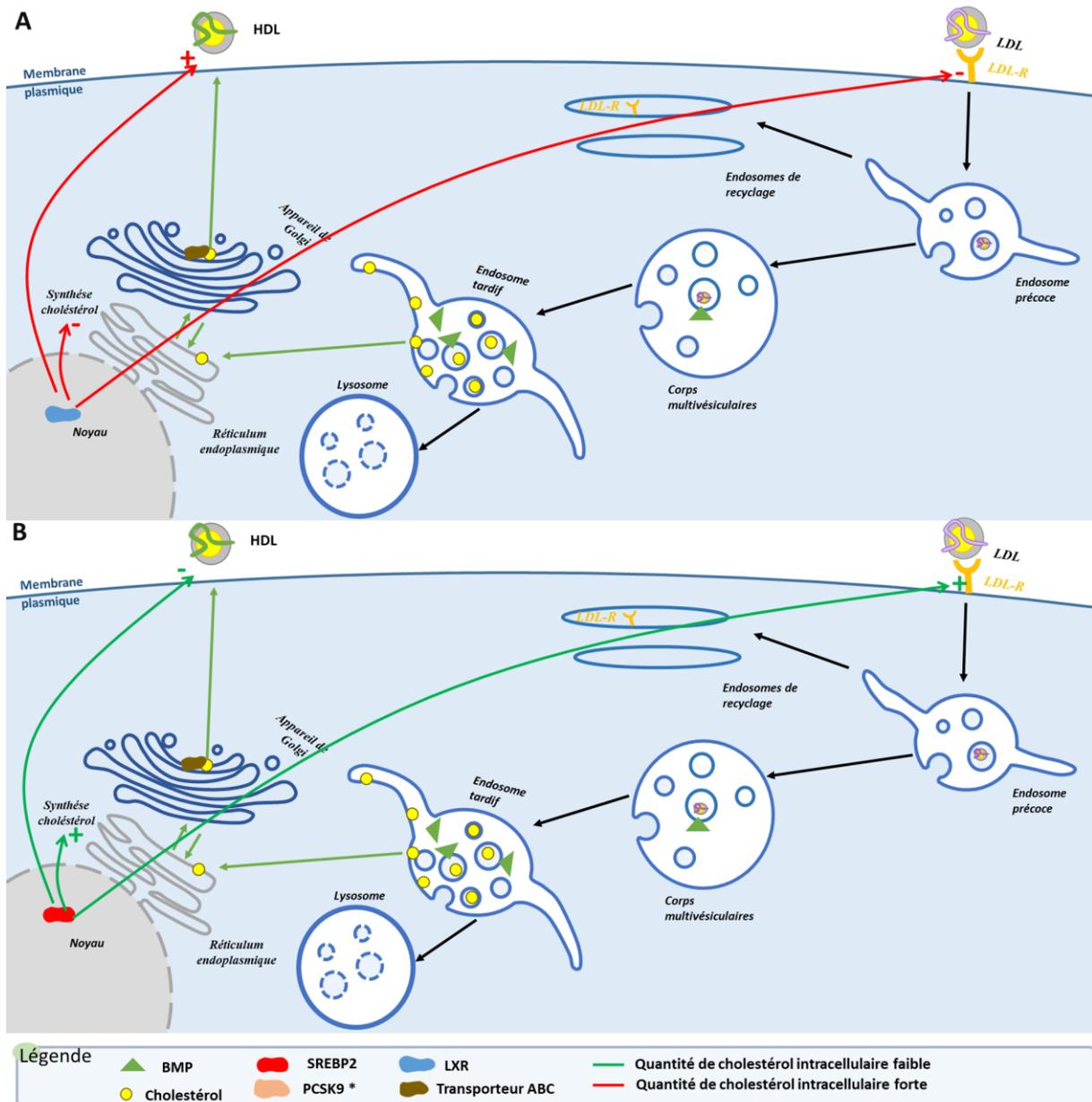


Figure 23: régulation du cholestérol intracellulaire, A : quantité de cholestérol intracellulaire trop importante régulation via LXR ; B : quantité de cholestérol intracellulaire faible régulation via SREBP2 ; * PCSK9 : régulation du cholestérol extracellulaire, lors d'une hypercholestérolémie.

3.2.3 Devenir du cholestérol

Le cholestérol est le précurseur de 3 classes de molécules : les oxystérols, les acides biliaires et les hormones stéroïdiennes.

Les oxystérols sont issus de l'oxydation du cholestérol. Cette oxydation peut être enzymatique ou non enzymatique. Les oxystérols formés par réaction enzymatique jouent un rôle dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol. Les oxystérols formés par l'oxydation non enzymatique du cholestérol jouent un rôle dans l'apoptose cellulaire. Dans la figure 24 se trouvent les principaux oxystérols connus.

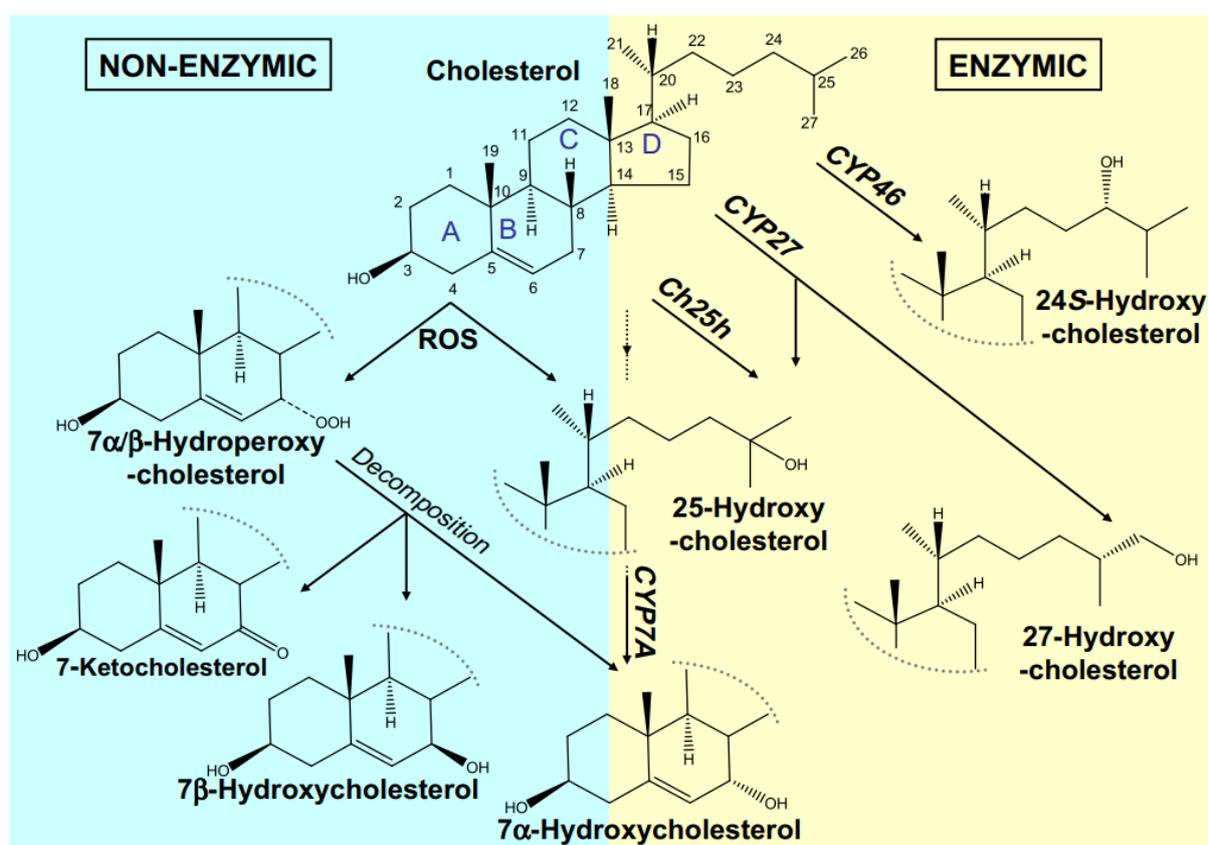


Figure 24 : schéma représentant les oxystérols les plus courants et leur formation enzymatique ou non. Ch25h, cholesterol 25-hydroxylase, CYP27: cholesterol 27-hydroxylase, CYP46: cholesterol 24-hydroxylase, CYP7A: cholesterol 7-hydroxylase; ROS, reactive oxygen species. (A. J. Brown & Jessup, 2009)

Le cholestérol en excès va être sécrété dans les HDL sous la forme d'esters de cholestérol. Les HDL circulantes vont être captées par le foie pour y être éliminées.

Le cholestérol est le précurseur des acides biliaires. Ces derniers sont produits dans le foie et permettent d'améliorer l'absorption intestinale des lipides alimentaires.

Les cellules productrices d'hormones stéroïdiennes utilisent le cholestérol. Après clivage de sa chaîne alkyle, le cholestérol est transformé en prégnénolone, précurseur des hormones stéroïdiennes.

3.3 Pathologies du métabolisme du cholestérol

Il existe plusieurs troubles liés au cholestérol. Le tableau 17 récapitule certaines des maladies génétiques affectant son métabolisme (biosynthèse, captation, trafic intracellulaire).

Tableau 17 : liste des principales pathologies du cholestérol (Luo et al., 2020)

Maladie	Cause	Symptôme	Gène impliqué
Maladie de Niemann-Pick de type C	Accumulation de cholestérol dans les endosomes due à un défaut du transport du cholestérol	Neurodégénérescence; élargissement du foie et de la rate (ascite)	NPC1, NPC2
Dystrophie cornéenne de Schnyder	Augmentation de la production de cholestérol	Accumulation de Cholestérol dans les cornées; opacification des cornées	UBIAD1
Syndrome de Smith-Lemli-Optiz	Appauvrissement en cholestérol et augmentation du 7-déshydrocholestérol	Retard psychomoteur; malformation foie, reins etc.	DHCR7
Hypercholestérolémie familiale	Perturbation de la captation des LDL médiée par le LDL récepteur	Cholestérolémie importante contenant un grand nombre de LDL; maladie coronarienne prématurée	LDLR, APOB, PCSK9, ARH
Maladie de Tangier	Perturbation de l'efflux du cholestérol médié par le transporteur ABC A1	Niveau très bas de HDL et d'apoA-I; dépôt important d'esters de cholestérol dans les tissus riches en macrophages; risque accru de maladie coronarienne	ABCA1
Sitostérolémie	Perturbation de l'efflux du cholestérol médié par les transporteurs ABC G5 et ABCG8	Hypercholestérolémie, et accumulation de stérols végétaux, maladie coronarienne prématurée	ABCG5, ABCG8

Chapitre 4 : Les vésicules extracellulaires

Introduction

Le terme vésicule extracellulaire (EV) est un terme générique utilisé pour décrire toutes les particules constituées d'une membrane lipidique sécrétées par les cellules. Ces membranes organisées en bicouche lipidique permettent de protéger le contenu des EV, à destination d'autres cellules permettant de transmettre des informations. Les EV sont un moyen de communication entre les archées, les bactéries et les eucaryotes. Les EV sont un groupe de vésicules très hétérogènes, sécrétées par tous les types cellulaires. (Pathan et al., 2017; Théry et al., 2018). Il existe différentes classes d'EV: les exosomes, les corps apoptotiques, les microparticules, les ectosomes et de nombreux autres types selon le tissu ou la cellule d'origine (Gurunathan et al., 2021; Pegtel & Gould, 2019; Théry et al., 2018; T. Yamamoto et al., 2019). Les EV vont différer de par leur morphologie, certains marqueurs ou bien leur mode de sécrétion (Théry et al., 2018). Néanmoins, elles ont souvent pour fonction de transmettre des signaux, de permettre d'éliminer du contenu intracellulaire potentiellement toxique.

- Les exosomes en tant qu'EV d'origine endosomale seront abordés principalement dans les parties suivantes (4.2-4.5).

- Les corps apoptotiques sont des EV issues de la mort programmée des cellules. Leur formation permet l'activation de la réponse immunitaire et l'élimination des débris cellulaires.

- Les microparticules sont des EV de taille comprise entre 100-1000 nm. Elles sont issues du bourgeonnement de la membrane plasmique (Théry et al., 2018; T. Yamamoto et al., 2019).

- Les ectosomes sont des EV particulières avec une taille comprise entre 100-350nm issus du bourgeonnement de la membrane plasmique (Cocucci & Meldolesi, 2015) sécrétées dans certaines conditions (stimulation, concentration de métabolites ou composés à la membrane plasmique) et dans certains types cellulaires spécialisés (mélanocytes, cellules dendritiques, macrophages..) indépendamment de l'exocytose. Ce processus permettrait de libérer rapidement des quantités plus importantes de membrane nécessitant donc des mécanismes compensatoires de réparation membranaire. Les ectosomes sont décrits comme des organites intracellulaires directement libérés dans le milieu extracellulaire. Ils ont été

observés lors d'étude sur un phénotype NPC2 (Juhl et al., 2021). Dans cette étude, les ectosomes permettraient de désengorger la cellule du cholestérol libre accumulé dans les endolysosomes. Ce processus particulier de sécrétion est différent de la sécrétion du contenu lysosomal observée dans certaines cellules non spécialisées, après fusion du lysosome avec la membrane plasmique. Ainsi l'équipe de Gruenberg a montré qu'il existait une sécrétion du contenu endo-lysosomal dépendante du calcium (Vacca et al., 2019).

Ces différentes EV sont présentes dans la majorité des biofluides, et peuvent être secrétées par la plupart des cellules. Les méthodes actuelles de purification ne permettent pas d'obtenir des échantillons purs pour chaque classe d'EV. Il est donc nécessaire de standardiser les méthodes de purification et d'analyse des EV (Théry et al., 2006).

4.1 Historique, morphologie et purification des exosomes/vésicules extracellulaires

Les exosomes sont des vésicules extracellulaires (EV), secrétées par les cellules dans des fluides biologiques dont le sang, les urines ou bien des surnageants de cultures cellulaires (Jansen & Li, 2017). Les exosomes sont caractérisés comme des EV ayant une taille comprise entre 30-200 nm, avec une densité comprise entre 1,1-1,2 (g/mL). Ils sont constitués d'une membrane sous forme d'une bicouche lipidique et sont issus du compartiment endosomal et plus particulièrement des corps multivésiculaires (MVB). Bien que les exosomes soient définis actuellement comme étant issus des endosomes (Colombo et al., 2014; Harding et al., 1984; Pan & Johnstone, 1983; Pegtel & Gould, 2019; van Niel et al., 2018). les travaux antérieurs utilisent le terme exosomes pour des EV secrétées directement à partir de la membrane plasmique (H. C. Anderson et al., 2005; Bianchi et al., 2014; Booth et al., 2006; Fang et al., 2007). La première observation d'EV pouvant être identifiées comme des exosomes selon leur taille a eu lieu dans les années 1960 (Bonucci, 1967), et Anderson (H. C. Anderson, 1969) avec la description de vésicules ayant une taille d'environ 100 nm, lors d'études sur la calcification du cartilage en utilisant des chondrocytes. Selon Anderson, ces vésicules étaient issues de la membrane plasmique. L'équipe de Wolf (Wolf, 1967) a décrit une sécrétion d'EV par des plaquettes. Des études complémentaires ont depuis confirmé la présence d'EV identifiées comme des exosomes, et leur rôle dans diverses pathologies mais aussi au niveau physiologique (H. C. Anderson et al., 2005; Bakhshian Nik et al., 2017; Garnier et al., 2012; Melki et al.,

2017). Les exosomes présents dans le liquide séminal par exemple jouent un rôle dans le transfert de biomolécules (Arienti et al., 1997; Stegmayr et al., 1982).

3 dogmes sont admis par la communauté scientifique (Pegtel & Gould, 2019) :

- Les exosomes sont issus des MVB et sont caractérisés par une simple membrane (bicouche lipidique) avec une taille comprise entre 30-200nm
- Les exosomes ont un rôle de transfert de biomolécules comme les lipides, protéines ou ARN, mais aussi d'ions comme le calcium, ou bien de particules virales
- Les exosomes jouent un rôle physiologique mais sont aussi impliqués en pathologie

Les exosomes ont une taille trop petite pour être observées directement par microscopie optique. La microscopie électronique à transmission (MET) permet d'observer les exosomes, d'avoir une idée sur leur taille et leur morphologie. Des marquages par anticorps sont possibles avec la MET, ce qui permet de visualiser la présence de marqueurs ou de biomolécules d'intérêt dans les exosomes. La cryo-microscopie électronique et la microscopie à force atomique permettent d'avoir des informations en 2D et donc structurales. Des techniques utilisant la cytométrie en flux sont en cours de développement et sont prometteuses. Elles permettraient d'avoir un compte plus précis des exosomes que les techniques basées sur la taille des vésicules comme le Nanosizer. En effet, la cytométrie en flux permet de réaliser un comptage basé sur la fluorescence émise par l'échantillon. Elle permet ainsi d'identifier différentes sous-populations au sein de l'échantillon, grâce à la combinaison de différents marqueurs. Ceci permettrait de caractériser les différentes sous-populations d'EV. Enfin il est possible d'analyser les exosomes grâce à la microscopie à fluorescence. Pour cela, il faut transfecter des cellules avec des marqueurs exosomaux recombinants comme par exemple CD63-pHluorin, qui vont émettre de la fluorescence et donc être observable (Sung et al., 2020) (tableau 18).

Tableau 18: Avantages et inconvénients des différentes techniques d'analyse des vésicules extracellulaires

Technique	Avantages	Inconvénients
MET	Possibilité de réaliser des marquages / observation de la taille et forme des vésicules	Pas d'information 2D
Cryo ME	Information 2D	Pas de marquage possible/ très couteux et non disponible pour tous les laboratoires de recherche
AFM	Information 2D	Pas de marquage possible/ très couteux et non disponible pour tous les laboratoires de recherche
Nanocytométrie en flux	Tri et comptage des vésicules	Pas d'information morphologique, en cours de développement
Microscopie à fluorescence	Observation de la fluorescence et donc possibilité de proportion protéique	Pas d'information morphologique
NanoSizer (Malvern) *Zetasizer	mesure de la taille et comptage des vésicules ; *mesure du potentiel zêta	Pas d'information morphologique et pas de marquage possible
NTA (Malvern)	Possibilité de réaliser des marquages ; mesure de la taille et comptage des vésicules	Pas d'information morphologique
TRPS (Izon)	mesure de la taille et comptage des vésicules ; mesure du potentiel zêta ;	Pas d'information morphologique et pas de marquage possible

Plusieurs techniques de purification sont possibles, chacune apportant néanmoins des biais qui modifient l'analyse. La technique de référence est une ultracentrifugation différentielle permettant de sédimenter les exosomes, mais l'inconvénient majeur est la contamination par d'autres vésicules extracellulaires qui vont aussi culoter. Pour vérifier la présence d'exosomes, il faut donc réaliser d'autres analyses comme par exemple des western blot montrant la présence de marqueurs exosomaux (Pegtel & Gould, 2019). Pour améliorer l'isolement des exosomes, un gradient de sucrose peut être réalisé à la suite de l'ultracentrifugation différentielle, afin de séparer les vésicules extracellulaires en fonction de leur densité. Néanmoins, en réalisant ce gradient on perd énormément d'échantillon. Toutefois, la purification d'exosomes à l'aide de gradient de densité permet de séparer des sous-populations d'exosomes (Willms et al., 2016).

4.2 Composition des vésicules extracellulaires

Les exosomes sont constitués d'une double membrane, elle-même composée de protéines et de lipides. Dans le lumen des exosomes, on retrouve des protéines solubles, des ions, des ARN et possiblement de l'ADN, et dans le cas d'une infection virale, des composés viraux. La composition des exosomes va varier en fonction de la cellule sécrétrice, mais pas seulement. L'hétérogénéité observée au niveau de la composition des ILV (cf Chapitre sur l'endocytose, (Gruenberg, 2020)) est logiquement retrouvée après leur sécrétion. En effet, une seule lignée cellulaire (cellules HEK 293T) peut sécréter des exosomes de composition hétérogène contenant des milliers de protéines différentes (J. Li et al., 2016). De par leur taille réduite, les exosomes ne peuvent contenir ces milliers de protéines différentes à la fois. Deux autres arguments vont dans le sens de cette hétérogénéité, leur taille comprise entre 30 et 200 nm et leur densité variable qui est directement liée au ratio protéines/lipides présent dans un exosome. On peut mettre en évidence cette différence en réalisant un isolement des exosomes en fonction de la densité en utilisant un gradient de sucrose par exemple. Cette hétérogénéité pose un problème lors de l'identification des exosomes. En effet actuellement, il n'existe aucun marqueur spécifique des exosomes. Pour démontrer la présence d'exosomes, il faut utiliser une combinaison de plusieurs marqueurs protéiques qui sont retrouvés de façon majoritaire dans les exosomes (Théry et al., 2018; van Niel et al., 2018) telles que les tétraspanines CD63, CD81 et CD9 (Pegtel & Gould, 2019; van Niel et al., 2018). Ces protéines transmembranaires sont donc enchâssées dans la membrane ce qui en fait de bons marqueurs car elles seront liées à la membrane exosomale. Néanmoins, ces protéines sont présentes non seulement au niveau endosomal mais aussi au niveau de la membrane plasmique. Des protéines solubles comme ALIX et TSG101 sont aussi considérées comme marqueurs exosomaux (van Niel et al., 2018). Elles sont impliquées dans la formation des ILV des endosomes (cf Chapitre sur l'endocytose), des vésicules extracellulaires et la réparation membranaire (Baietti et al., 2012; Gruenberg, 2020; Pegtel & Gould, 2019).

Les exosomes contiennent aussi des lipides, dont la proportion varie en fonction du type cellulaire, mais peut aussi différer entre la cellule sécrétrice et les exosomes. L'équipe de Llorente a mis en évidence cette différence lors d'une étude lipidique sur les exosomes sécrétés par des cellules cancéreuses issues de la prostate. Ils ont observé une similitude entre le profil lipidique exosomal et cellulaire. Néanmoins, le ratio des différentes classes de lipides est

modifié. Pour les exosomes, le ratio phospholipide/cholestérol est de 1 contre plus de 3 pour les cellules. D'autres différences ont été observées, comme par exemple une plus grande proportion de SM dans les exosomes que dans les cellules, ou bien une modification des proportions de phospholipides. Dans la cellule PC-3, les PC sont majoritaires de l'ordre de 70%, ensuite viennent les PE (14%) puis PS (7.7%). Dans les exosomes issus de ces cellules, les PC et PS sont majoritaires et représentent environ 70% des phospholipides (PC 40%, PS 30%) puis viennent les PE avec 15%. De plus, une plus grande proportion de cholestérol est présente dans les exosomes (44 % contre 19%) (Llorente et al., 2013). Enfin, on va pouvoir retrouver différentes classes de lipides dans les exosomes : PC, PE, PS, BMP, SM, cholestérol, DAG et d'autres (Illytska, Jeziorek, et al., 2021; Llorente et al., 2013; Miranda et al., 2018; Rabia et al., 2020; Simbari et al., 2016; Strauss et al., 2010; Subra et al., 2007). Les exosomes peuvent également contenir des acides nucléiques comme de l'ARN et de l'ADN. Ces molécules pourront être transmises à d'autres cellules, comme décrit plus loin dans cette partie.

4.3 Biogenèse des exosomes : les machineries moléculaires impliquées

Bien que les exosomes soient décrits depuis plusieurs décennies, leur biogenèse n'est pas encore complètement connue. Un consensus propose que les exosomes proviennent des MVB, qui après fusion avec la membrane plasmique vont relarguer dans le milieu extracellulaire leurs ILV et donc former les exosomes (Cocucci & Meldolesi, 2015; van Niel et al., 2018; Yáñez-Mó et al., 2015). Néanmoins, des revues récentes évoquent deux autres types de sécrétion des EV considérant leur origine membranaire à la fois plasmique et endosomale (exosomes) (figure 25) (Gurunathan et al., 2021; Pegtel & Gould, 2019). Il s'agirait d'une part, du bourgeonnement de la membrane plasmique et d'autre part de la formation d'IPMC (compartiments intracellulaires connectés à la membrane plasmique) (Pegtel & Gould, 2019). En effet, plusieurs études ont montré des EV secrétées par bourgeonnement de la membrane plasmique caractérisées comme étant des exosomes en fonction de leurs critères morphologiques et de marqueurs protéiques (H. C. Anderson et al., 2005; Bianchi et al., 2014; Fang et al., 2007; Fordjour et al., 2019; Pegtel & Gould, 2019)(source). Cependant, ce mode de sécrétion est aussi caractéristique des microparticules, créant un biais lors de l'identification de ces EV.

Les IPMC quant à eux sont issus de l'invagination de la membrane plasmique. Une vésicule intracellulaire serait formée par invagination de la membrane plasmique mais cette vésicule serait en contact continu avec le milieu extracellulaire via un canal. Les exosomes seraient ensuite secrétés lors de la formation d'ILV dans cette vésicule, qui seront directement secrétés dans le milieu extracellulaire sous la forme d'exosomes. Ces résultats ont été obtenus après infection par le VIH (virus de l'immunodéficience humaine). Il est donc possible qu'en condition physiologique, ce phénomène ne soit pas présent. (Deneka et al., 2007; Nkwe et al., 2016; Welsch et al., 2007).

La biogenèse des EV est un processus membranaire très dynamique variable selon les types cellulaires et dépendant à la fois des protéines recrutées (séquences spécifiques d'adressage membranaire et possibilité d'oligomérisation à la membrane) et des propriétés physico-chimiques des lipides membranaires impliqués (comme nous verrons plus loin). Le système de sécrétion serait secondaire pour la définition des exosomes. En effet une hypothèse soutient le fait, que le contenu des exosomes serait défini en amont de la cellule peu importe le système de sécrétion (Gurunathan et al., 2021). Contrairement au mécanisme habituel de séquences spécifiques ou peptide signal, permettant aux protéines d'être adressées aux différents organites de la cellule ou vers le milieu extracellulaire, l'adressage des protéines aux exosomes serait réalisé par oligomérisation des protéines (Fang et al., 2007). Quel que soit le lieu primaire de formation et de sécrétion des EV, il semble qu'un facteur important soit la formation locale de domaines membranaires par oligomérisation /agrégation de protéines mais aussi de lipides.

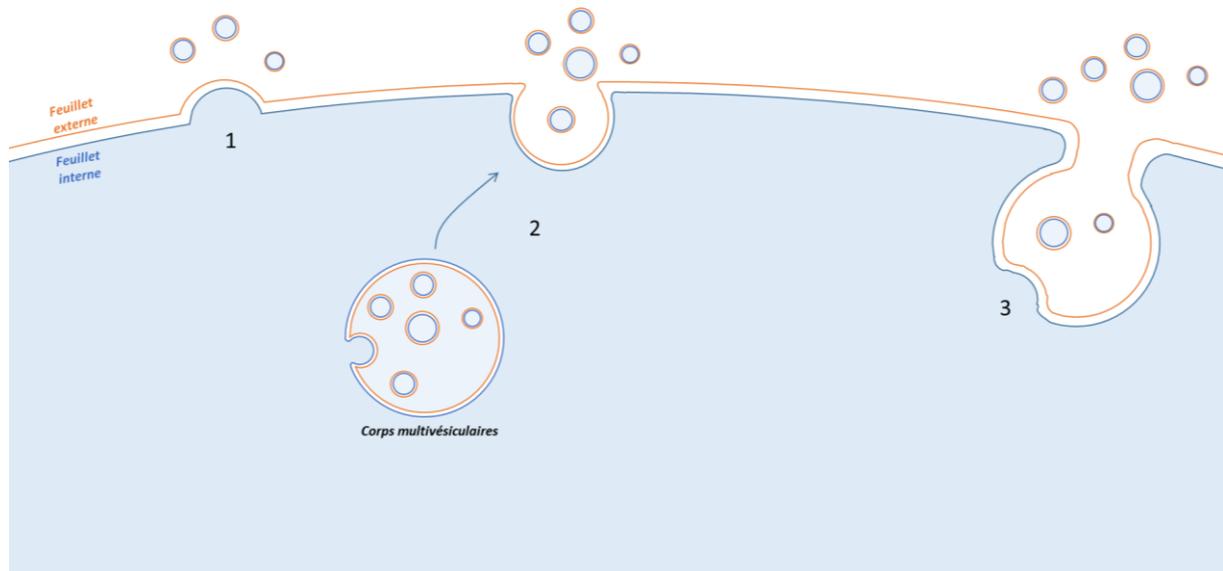


Figure 25 : schéma rassemblant les 3 types possibles de sécrétion d'exosomes de taille compris entre 30-200 nm ; 1 : bourgeonnement direct de la membrane plasmique lié à la formation de domaines membranaires ; 2 : fusion des MVB avec la membrane plasmique ; 3 : IPMC (compartiments intracellulaires connectés à la membrane plasmique) modifié de (Pegtel & Gould, 2019)

Les exosomes sont définis comme des EV ayant une taille comprise entre 30-200 nm, avec une simple membrane en bicouche lipidique et une densité comprise entre 1-1.2 (g/mL). Les exosomes doivent être définis par ces critères morphologiques mais aussi par les marqueurs protéiques déjà établis, comme par exemple les tétraspanines CD63, CD81, ou bien d'autres protéines comme par exemple ALIX, TSG101, flotiline ou certains ARN (tableau 19)(Pegtel & Gould, 2019; Théry et al., 2018; van Niel et al., 2018). Mais aussi des marqueurs lipidiques comme le BMP, qui a été détecté de façon variable dans les exosomes des cellules (Inytska, Jeziorek, et al., 2021; Miranda et al., 2018; Rabia et al., 2020; Record et al., 2018; Skotland et al., 2017). Les protéines jouent un rôle essentiel dans la sécrétion des exosomes, comme par exemple, les tétraspanines ou bien les protéines associées au complexe ESCRT ou constitutives qui jouent un rôle dans les invaginations et la fusion des membranes, permettant ainsi la formation des ILV et leur sécrétion tous modèles confondus(Gurunathan et al., 2021). Néanmoins, les différents complexes ou protéines impliqués sont dépendants du type cellulaire. Par exemple pour les cellules MCF-7, la protéine ALIX et les ESCRT sont nécessaires pour la sécrétion d'exosomes contrairement aux oligodendrocytes murins.

Tableau 19: liste non exhaustive des protéines présentes dans les exosomes et leur fonctions (van Niel et al., 2018)

Lipides	Protéines								
	Organisatrices des membranes	Adhésion cellulaire	Trafic intracellulaire	Spécifique du type cellulaire	Enzymes	Transduction du signal	Facteur de synthèse	Chaperones	Acide nucléique
Cholestérol	CD9	Intégrines	RAB	CMH-I	Peroxydases	Protéines Kinases	ALIX	HSP70	Micro ARN
Céramides	CD81	Actadhérines	GTPases	CMH-II	Pyruvate Kinase	β-caténine	TSG101	HSP90	ARN non codant
Sphingolipides	CD63	ICAM	Annexines	APP	Enolase	14-3-3,G protéine	Synténine		ARN m
BMP	TSPAN6			PMEL	GAPDH		Ubiquitine		ADN
	TSPAN8			TCR			Clathrine		
CD151	FasI			VPS32					
CD37	CXCR4			VPS4					
CD53	HSPG								
Flotilin 1 et 2	CD86								
	PrP								
	TFR								
	WNT								

Les lipides jouent aussi un rôle très important dans la biogenèse des exosomes et plus particulièrement dans la fusion et l'invagination membranaire. En effet, les phospholipides ayant une forme conique comme le BMP, PE, PS ont la particularité de jouer un rôle dans la fusion et la fluidité membranaire. L'équipe de Subra a émis l'hypothèse que le BMP en raison de ses propriétés fusogéniques, participerait à la sortie des exosomes via les MVB, en favorisant la fusion des membranes des MVB et de la membrane plasmique. Dans cette hypothèse, le BMP ne sortirait pas de la cellule (Subra et al., 2007). Cette hypothèse est toujours d'actualité. Néanmoins, il a été montré depuis que le BMP pouvait sortir de la cellule par le biais des exosomes (Miranda et al., 2018; Rabia et al., 2020). Le BMP jouerait aussi un rôle dans la formation des exosomes. En effet, plusieurs études ont montré des modifications du BMP contenu dans les exosomes lors de perturbation de l'autophagie et de la voie endosomale. Miranda et al. ont pu montrer lors de l'inhibition de la formation des PI3P (Phosphatidylinositol-3-Phosphate), qu'il y avait stimulation de la sécrétion d'exosomes enrichis en BMP (Miranda et al., 2018). Cet effet était dépendant du dysfonctionnement endolysosomal et indépendant du défaut d'autophagie. Une autre étude récente a montré une augmentation de la sécrétion d'exosomes lors d'une augmentation de la quantité de BMP intracellulaire dans un modèle de cellules déficientes en NPC 1 (Ilnytska, Jeziorek, et al., 2021).

Le métabolisme des céramides est indispensable à la biogenèse des exosomes. En effet, une des façons de stopper la sortie des exosomes est d'utiliser l'inhibiteur de la nSMase2 sphingomyélinase neutre GW4869, qui bloque la formation de céramides dans les endosomes (Blanc & Vidal, 2018). Dans ce cas particulier, la formation de vésicules est indépendante des protéines ESCRT et en lien avec la déformation membranaire induite localement par les

céramides agissant donc sur la formation des ILV. Toutefois le mécanisme impliqué n'est pas complètement connu en raison de la localisation de la nSMase2 dans le Golgi, RE et sur le feuillet interne de la membrane plasmique (Airoola & Hannun, 2013).

Ces incertitudes et ce manque de données obligent la communauté scientifique, à s'entourer d'une multitude de contrôles morphologiques, de marqueurs protéiques, lipidiques ou ARN, pour caractériser la présence d'exosomes et comparer les résultats obtenus. Des études doivent être menées pour clarifier le mode de sécrétion des exosomes et leur biogénèse.

4.4 Rôle des exosomes

4.4.1 Rôle physiologique

Les exosomes ont plusieurs fonctions, amenant à les comparer à un couteau suisse (Gurunathan et al., 2021). Ils vont en effet jouer un rôle dans l'homéostasie cellulaire, le transfert d'information, la communication cellulaire... (Gurunathan et al., 2021; Rieu et al., 2000). Au début de la découverte des exosomes, un rôle bénéfique dans l'élimination des déchets intracellulaires toxiques leur a été attribué. Les exosomes seraient utilisés pour relarguer des protéines, lipides, ADN ou ARN en trop grande quantité dans la cellule et pouvant donc déclencher des dysfonctionnements cellulaires. Lors de l'inhibition de la formation des exosomes en utilisant le GW486, une accumulation d'ADN est constatée entraînant une augmentation du stress oxydant dans la cellule, déclenchant la mort cellulaire. Ce stress est dû à une augmentation des ROS dans la cellule liée à la présence d'ADN détérioré (Hyung et al., 2020). Une autre étude portant sur la NPC a montré que les exosomes pouvaient faire sortir du cholestérol pour limiter l'accumulation de cholestérol dans les endosomes. Néanmoins, ce mécanisme de sortie des déchets par les exosomes est un mécanisme limité ne permettant pas de retrouver un phénotype normal dans la durée (Strauss et al., 2010). Ces différentes expériences montrent que les exosomes ont un rôle de soupape de sécurité, en relarguant dans le milieu extracellulaire des éléments, qui, en trop grande quantité, sont toxiques pour la cellule.

Les exosomes jouent en outre un rôle dans la communication intercellulaire en transportant des protéines, des lipides, de l'ADN ou bien de l'ARN (Costa-Silva et al., 2015;

Tkach & Théry, 2016; Valadi et al., 2007). En effet, l'ARN issu des exosomes est retrouvé dans les cellules réceptrices (Valadi et al., 2007). Les exosomes vont activer des voies de signalisation cellulaire en activant des récepteurs de surface, mais aussi en délivrant directement à la cellule des récepteurs déjà activés (Khalyfa et al., 2017). Le transfert de ce matériel génétique (ADN ou bien des ARN) jouerait un rôle dans l'activation de différents gènes.

Les exosomes jouent aussi un rôle dans l'immunité. En effet, les exosomes vont pouvoir porter le CMH-II et d'autres stimulateurs, ou bien directement présenter des antigènes aux lymphocytes permettant de déclencher l'immunité (Raposo et al., 1996). En effet, l'injection d'exosomes contenant des antigènes permet de ralentir la progression de tumeurs (Zitvogel et al., 1998). De par leur faculté de transfert de matériel génétique, les exosomes peuvent réguler la réponse immunitaire en délivrant des miRNAs (Montecalvo et al., 2012). Les exosomes issus de cellules dendritiques peuvent réguler la réponse immunitaire en permettant la présentation du CMH-II et permettre ainsi l'activation des lymphocytes T par exemple (Giri & Schorey, 2008; Raposo et al., 1996).

Les exosomes jouent un rôle primordial dans la viabilité cellulaire. Ils peuvent dégorger les cellules d'éléments toxiques ou en trop grande quantité. Ils permettent le transfert de signaux permettant la modification phénotypique des autres cellules par le transfert de protéines, de lipides, d'ADN, d'ARN ou bien en déclenchant une cascade de signalisation. Ils jouent aussi un rôle dans la défense immunitaire en arborant le CMH-II ou bien en transportant des antigènes.

4.4.2 Rôle en pathologie

Les fonctions des exosomes vont être détournées dans certaines pathologies. Lors d'infections virales, les exosomes vont contenir des éléments viraux permettant la propagation de l'infection vers d'autres cellules saines. Les exosomes issus de cellules infectées par des virus peuvent transporter du matériel viral comme des protéines ou du matériel génétique (M. R. Anderson et al., 2016; Chahar et al., 2015). Ce matériel va pouvoir agir de deux façons, soit en propageant l'infection aux autres cellules saines, soit en agissant contre le système immunitaire pour permettre à l'infection de progresser.

Une étude clinique portant sur le virus de l'hépatite B a permis de mettre à jour une corrélation entre des patients infectés avec des ARN retrouvés dans les exosomes de ces patients (J. Chen et al., 2020). Les cellules infectées par le VIH peuvent produire des exosomes contenant des particules virales du VIH permettant ainsi de tromper le système immunitaire et donc d'infecter plus efficacement d'autres cellules saines (Sims et al., 2018)). Un mécanisme similaire est utilisé par virus Zika qui utilise les exosomes pour transporter son matériel génétique et les protéines virales permettant sa dissémination aux autres cellules saines (W. Zhou et al., 2019). Enfin, il a été montré que des exosomes sécrétés par des cellules infectées par le VIH contiennent des éléments TAR (*Transactivation response element RNA*) qui jouent un rôle dans la prolifération tumorale (L. Chen et al., 2018).

Lors de cancers, les exosomes vont jouer un rôle à plusieurs niveaux. D'une part, les exosomes peuvent promouvoir l'angiogenèse qui est un phénomène essentiel à la croissance tumorale. Les cellules cancéreuses ont en effet un besoin important en nutriments amenés par le sang et donc un réseau capillaire très développé (Datta et al., 2017; Kucharzewska et al., 2013; Peinado et al., 2017). Les exosomes vont aussi pouvoir être détournés lors de cancer et tumeur favorisant ainsi la prolifération cellulaire (Kucharzewska et al., 2013; Lai et al., 2010; Lobb et al., 2017). De plus, les exosomes produits par les cellules cancéreuses vont délivrer des signaux inhibant la réponse anti-tumorale et limitant ainsi la réaction immunitaire, permettant donc la croissance tumorale. Des exosomes produits par des cellules tumorales contenant le miR-212-3p inhibent la formation du CMH-II des cellules dendritiques, entraînant ainsi une réponse immunitaire diminuée contre ces tumeurs. Les neutrophiles circulants dans le sang peuvent internaliser des exosomes issus de tumeurs. Les exosomes contenant du matériel génétique tumoral induisent une réponse inflammatoire entraînant la production d'IL-8. Des études réalisées sur les mélanomes ont montré que des exosomes issus de mélanome contenaient PD-L1 (*program cell death ligand 1*) induisant l'inhibition de l'activation des lymphocyte T CD8+ entraînant une diminution de la fonction anti tumorale de l'organisme (G. Chen et al., 2018). Les exosomes ayant la capacité de transmettre du matériel génétique, les cellules cancéreuses vont pouvoir utiliser ce système pour transférer leur matériel génétique tumoral aux autres cellules saines. Ils permettent aussi de promouvoir la croissance tumorale, mais de plus en passant par la circulation sanguine, ces exosomes vont pouvoir délivrer le contenu cancéreux vers des cellules d'autres tissus et donc déclencher des métastases (Gurunathan et al., 2021).

Toutes ces études montrant l'importance des exosomes en physiopathologie ont suscité un intérêt grandissant pour leur utilisation comme biomarqueurs pour suivre l'évolution des maladies et aussi comme biovecteurs thérapeutiques de molécules ou plus généralement pour moduler des fonctions cellulaires.

4.4.3 Outils thérapeutiques et diagnostiques

Dans le domaine médical, les exosomes sont intéressants pour deux raisons. La première porte sur l'origine des exosomes. En effet, la composition des exosomes dépend de la cellule sécrétrice ce qui permet d'utiliser les exosomes comme biomarqueur et donc dans le diagnostic des maladies (Gurunathan et al., 2021). Les exosomes sont des vésicules que l'on retrouve dans tous les biofluides : urines, sang, salive... (Gurunathan et al., 2021; Pegtel & Gould, 2019). De plus, elles ont la particularité de ne pas ou peu induire de réaction immunitaire lors de leur injection *in vitro* et *in vivo* (Montecalvo et al., 2012).

Les exosomes permettant le transport et la délivrance de molécules tout en entraînant une faible ou pas de réponse immunitaire sont très intéressants pour l'industrie pharmaceutique. En effet, des études sont en cours permettant d'encapsider des molécules pharmacologiques dans des exosomes pour soigner diverses maladies dont les cancers (Gurunathan et al., 2021). Il a été montré que la cisplatine administrée dans des exosomes est plus efficace que la cisplatine seule en permettant de cibler plus précisément les cellules cancéreuses (X. Zhang et al., 2020). Une étude utilisant un modèle de Parkinson murin a montré que l'on pouvait cibler les cellules neuronales en intégrant le peptide RVG aux exosomes. De plus, en incorporant à ces exosomes RVG un sh RNA-MC dirigé contre l' α -synucléine, les agrégats de cette protéine dans le cerveau des souris sont réduits, améliorant l'état moteur des souris (Izco et al., 2019). Actuellement, il y a plusieurs études cliniques réalisées en France et aux Etats-Unis utilisant les exosomes comme vecteur de traitement pharmacologique (Gurunathan et al., 2021).

La composition des exosomes étant dépendante de la cellule sécrétrice, il est intéressant d'étudier leur contenu pour les utiliser comme outils diagnostiques. Lors de la grossesse par exemple, des exosomes sécrétés par les cellules du placenta se retrouvent dans tous les

biofluides. Lors de complication durant une grossesse on retrouve une quantité d'exosomes placentaires plus importante que dans une grossesse normale (Salomon & Rice, 2017). Les ARN présents dans les exosomes peuvent être utilisés pour diagnostiquer des cancers comme par exemple le cancer ovarien. En effet, les exosomes présents dans le plasma de patientes atteintes de cancer ovarien vont contenir le miR-10b-5p. De même pour les cancers gastriques et du foie, pour lesquels des exosomes contenant respectivement miR-101-3p et miR-143-5p sont retrouvés (Y. Zhang et al., 2020). Le contenu en protéines exosomales peut aussi être utilisé comme biomarqueur comme par exemple lors de cancer du pancréas, de l'ADN oncogénique mais aussi un mutant de la protéine Kras sont retrouvés en effet dans les exosomes des sujets cancéreux (Cha et al., 2015).

Enfin les exosomes étant des voies de sortie de molécules, des études sont en cours pour utiliser les exosomes comme voie de sortie thérapeutique, en favorisant cette faculté de dégorgement cellulaire par la stimulation de la sécrétion d'exosomes. Des études récentes portant sur la NPC montrent ainsi que les exosomes peuvent faire sortir un excès de cholestérol (Strauss et al., 2010).

Lors de travaux sur les perturbations endolysosomales et les maladies neurodégénératives, Miranda et al, ont mis en évidence un lien entre les exosomes et le peptide β amyloïde. Lors de l'inhibition de la voie endolysosomale chez des neuroblastes murins, une sécrétion d'exosomes enrichis en peptide β amyloïde est observée. Les exosomes peuvent jouer un rôle dans l'élimination du peptide β amyloïde des cellules (Miranda et al., 2018; Miranda & Paolo, 2018).

Les exosomes ont des rôles divers qu'ils soient physiologiques ou pathologiques, mais aussi en tant qu'outil thérapeutique. Il faut poursuivre toutes ces études mais surtout celles permettant d'utiliser les exosomes comme biomarqueurs dans des biofluides plus facile d'accès, ce qui permettrait d'éviter les actes de diagnostics invasifs pour les patients.

Tous ces travaux récents montrant l'importance des vésicules extracellulaires comme outils thérapeutiques et diagnostiques en particulier lors des dysfonctionnements endolysomaux nous ont poussé à étudier plus précisément le rôle joué par le phospholipide spécifique de ce compartiment, le BMP.

Chapitre 5 : Le Bis(monoacylglycéro)phosphate (BMP)

Introduction

Le Bis(monoacylglycéro)phosphate est un phospholipide appartenant à la classe des glycérophospholipides. Il a été découvert en 1967 par Body & Gray (Body & Gray, 1967) dans des poumons de cochon, de rat et de lapin. Cette découverte a été faite dans le cadre de recherche portant sur la composition lipidique du poumon de plusieurs espèces animales. Une première estimation des acides gras estérifiés a pu être faite dans des poumons de cochon mettant en évidence une richesse en acide oléique 51%, acide linoléique 16%, acide stéarique 14%, acide palmitique 14% (Body & Gray, 1967). Le BMP est caractérisé par sa structure inhabituelle, mais aussi par sa localisation spécifique. Le BMP est un lipide sous représenté, ne représentant dans la majorité des cellules que seulement 1% des phospholipides totaux. Toutefois, il représente jusqu'à 18 % des phospholipides totaux de macrophages alvéolaires des poumons (Hostetler, 1982).

5.1 BMP : structure et nomenclature

Le BMP est un isomère structural du PG, sa structure est unique chez les eucaryotes supérieurs (figure 26). Contrairement aux autres phospholipides eucaryotes, le BMP a une configuration stéréochimique en *sn-1 : sn-1'* (Hullin-Matsuda et al., 2009). Le BMP est constitué de 2 molécules de glycérol qui sont liées entre elle par un groupement phosphate. Les liaisons phosphodiester sont en position *sn-1* du premier glycérol et *sn-1'* du deuxième glycérol. Le PG est composé aussi de 2 molécules de glycérol reliées entre elles par un groupement phosphate. Mais contrairement au BMP, les liaisons phosphodiester sont en position *sn-3* du premier glycérol et en position *sn-1'* du deuxième glycérol. Les 2 acides gras du PG sont estérifiés sur le premier glycérol en position *sn-2* et *sn-3*.

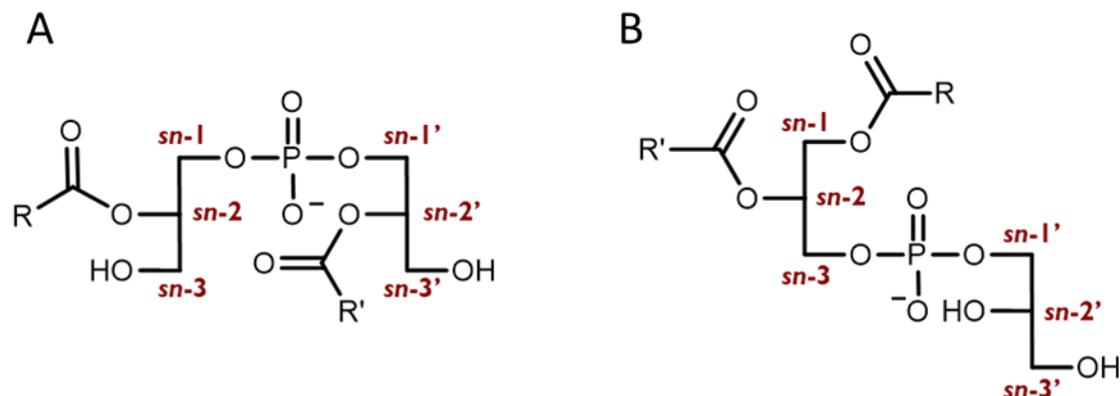


Figure 26 : A : structure du Bis(monoacylglycero)phosphate ; B : structure du Phosphatidylglycérol

Dans le cas du BMP, chaque glycérol est estérifié par un acide gras. La position des acides gras dans la molécule native de BMP est encore sujet à discussion (Kobayashi et al., 2002; Luquain et al., 2000; Waite et al., 1990). En effet, en condition cytosolique, c'est-à-dire à pH 7,4, les acides gras estérifiés sur le BMP devraient être estérifiés en position *sn-3* et *sn-3'*, car cette position est thermodynamiquement la plus stable (Chevallier et al., 2000; Luquain et al., 2000, 2001). Néanmoins, le BMP se trouvant dans le milieu endosomal, le pH acide lui permet de maintenir l'estérification des acides gras en position *sn-2* : *sn-2'* si particulière (Tan et al., 2012).

Le BMP est une molécule chirale, en effet les carbones *sn:2* et *sn:2'* des glycérols sont chiraux. Très simplement, une molécule est dite chirale lorsqu'elle dispose d'un atome de carbone stéréogène / asymétrique. C'est-à-dire que ce carbone est associé à 4 groupements chimiques différents. Une molécule portant au moins un carbone chiral ne peut se superposer sur elle-même. Ce carbone pourra alors prendre 2 formes soit R, soit S. Pour tous les phospholipides, les carbones *sn:2* et *sn:2'* sont asymétriques de plus le carbone *sn:2* est en configuration R sauf pour le BMP où il est en position S dû à la liaison phosphodiester en *sn:1*. Le BMP a une conformation S,S' (Brotherus et al., 1974) contrairement à son isomère PG qui a une conformation R,S (Itabashi & Kuksis, 1997).

5.1.1 Divergence de nomenclature

Bien que la structure du BMP soit établie et acceptée par la communauté scientifique, une certaine divergence existe encore car deux noms différents continuent à être utilisés : l'acide lysobisphosphatidique (LBPA) (Gruenberg, 2020; Ilnytska, Jeziorek, et al., 2021) et le bis(monoacylglycéro)phosphate (Gallala & Sandhoff, 2011; Hullin-Matsuda et al., 2009; Pribasnig et al., 2015; Rabia et al., 2020). L'appellation BMP apparait dès 1972 (Wherrett & Huterer, 1972), basée sur la structure du phospholipide. En effet le BMP est constitué de deux molécules de glycérol, chacune estérifiée par une molécule d'acide gras: « bis(monoacylglycero) », et d'un groupement phosphate: « phosphate ». La dénomination LBPA est apparue plus tardivement, notamment pour éviter la confusion avec les *Bone morphogenic protein* dont l'acronyme est aussi BMP et dont la recherche comporte plus de 15000 entrées dans pubmed (Gruenberg, 2020). Toutefois, du point de vue structural, l'appellation LBPA acide lyso-bis-phosphatidique signifie deux acides lysophosphatidiques. Comme énoncé par l'équipe de Sandhoff et la classification des lipides (*the International Union of Pure and Applied Chemists and the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUPAC-IUBMB)*), le terme Bis(Monoacylglycéro)phosphate (BMP) devrait être privilégié (Fahy et al., 2005; Gallala & Sandhoff, 2011) (figure 27).

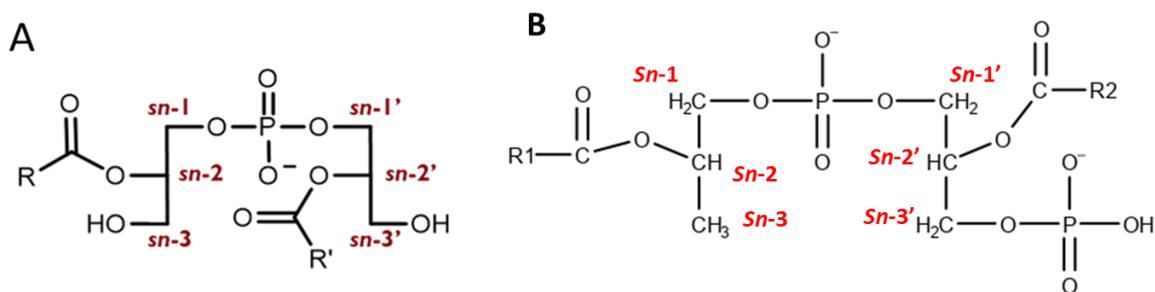


Figure 27: A : structure du BMP; B : structure théorique de l'acide lysobisphosphatidique

5.1.2 Composition en acide gras

Le BMP est un phospholipide enrichi en acide gras insaturés (Besson et al., 2006; Bouvier et al., 2009; Luquain et al., 2000; Rabia et al., 2020; Wherrett & Huterer, 1972), en particulier l'acide oléique et l'acide docosahéxaénoïque (22 :6n-3, DHA). Le DHA est un acide gras peu abondant, représentant en général moins de 5% des acides gras des PL cellulaires. Néanmoins, les espèces contenant au moins un DHA estérifié vont représenter jusqu'à 40 % des espèces moléculaires du BMP dans les cellules utérines de rat (Hullin-Matsuda et al., 2009).

L'équipe a mis en évidence l'enrichissement en DHA du BMP par rapport à d'autres phospholipides comme les PC et les PE, dans les macrophages RAW 264.7 et THP-1, et dans le foie de souris (Besson et al., 2006; Bouvier et al., 2009) (tableau 20). De plus, le contenu en DHA du BMP est sélectivement augmenté, lors d'apport exogène en DHA par rapport aux autres PL (Besson et al., 2006; Bouvier et al., 2009) (tableau 21)

Tableau 20 : enrichissement en DHA du BMP exogène (% de DHA (% molaire par rapport au acide gras totaux du PL) modifié de (Besson et al., 2006; Bouvier et al., 2009)

% de DHA (% molaire par rapport au acide gras totaux du PL)			
Origine	BMP	PC	PE
RAW 264.7	7,4		3,9
THP-1	6,6	0,8	5,2
Foie de souris	31,9	7,5	19,5

Tableau 21 : Augmentation sélective du DHA contenu dans le BMP lors d'apport exogène (% de DHA (% molaire par rapport au acide gras totaux du PL) modifié de (Besson et al., 2006; Bouvier et al., 2009)

% de DHA (% molaire par rapport au acide gras totaux du PL)						
condition	contrôle	+DHA	contrôle	+DHA	contrôle	+DHA
Origine	BMP	BMP	PC	PC	PE	PE
RAW 264.7	7,4	59,4			3,9	30,1
THP-1	6,6	29,3	0,8	2,4	5,2	4,8
Foie de souris	31,9	70,7	7,5	14,3	19,5	32,3

Une espèce moléculaire d'un phospholipide est caractérisée par les acides gras qui y sont estérifiés, par exemple l'espèce moléculaire di-DHA BMP contient deux molécules de DHA (figure 28). Cette espèce est particulière car on la retrouve peu dans d'autres phospholipides (PE et PC dans le cerveau) (Bisogno et al., 1999; Delton-Vandenbroucke et al., 1998; Hullin-Matsuda et al., 2009; Stinson et al., 1991), mais aussi par sa forte insaturation conférant une fonction de fluidifiant des membranes (voir Chap1) . Cette richesse en acides gras insaturés ajoutée à une forme conique du BMP permet d'augmenter ce rôle de fluidifiant dans la membrane (Burger, 2000; Dikic, 2004; Hullin-Matsuda et al., 2009; Matsuo et al., 2004). Bien que le DHA soit très présent dans le BMP de certains tissus, l'espèce prédominante dans la plupart des cellules est le di-oléate BMP qui représente entre 50 et 80% du BMP total (figure 29) (Besson et al., 2006; Bouvier et al., 2009; Holbrook et al., 1992; Huterer & Wherrett', 1979; Luquain et al., 2000; Wherrett & Huterer, 1973). Lors de l'analyse du BMP intracellulaire, on remarque une différence au niveau des acides gras estérifiés. On constate que les cellules en culture ont une proportion plus forte en acide gras oléique que les cellules primaires (Besson et al., 2006; Bouvier et al., 2009; Holbrook et al., 1992; Huterer & Wherrett', 1979; Luquain et al., 2000; Wherrett & Huterer, 1973). De plus on constate que les espèces moléculaire sont plus diversifiées lors d'une analyse *in vivo* comme dans des urines humaines (Rabia et al., 2020).

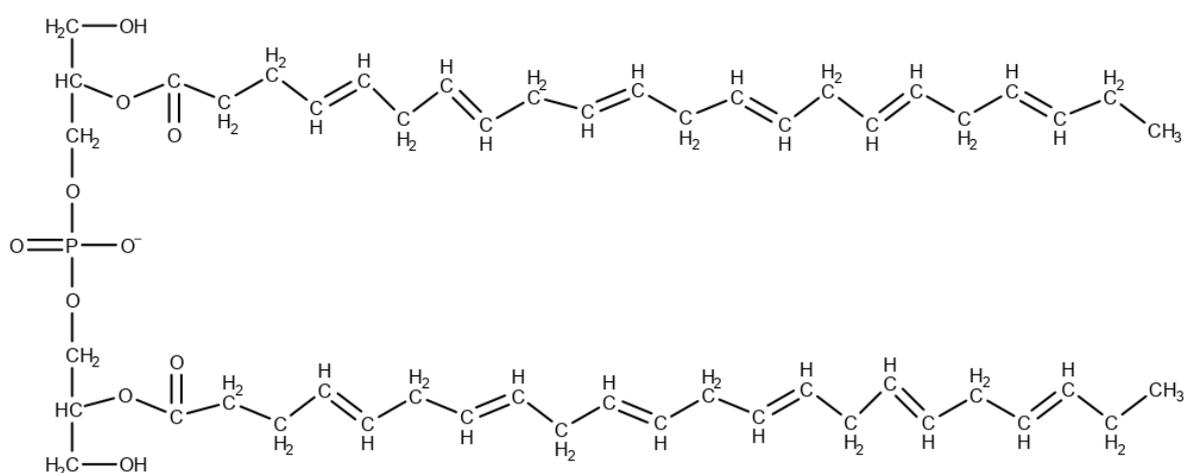


Figure 28 : *sn*-(3- hydroxy-2- docosahexenoyl)-glycerol-1-phospho-*sn*-1'-(3'- hydroxy-2'- docosahexenoyl)-glycerol

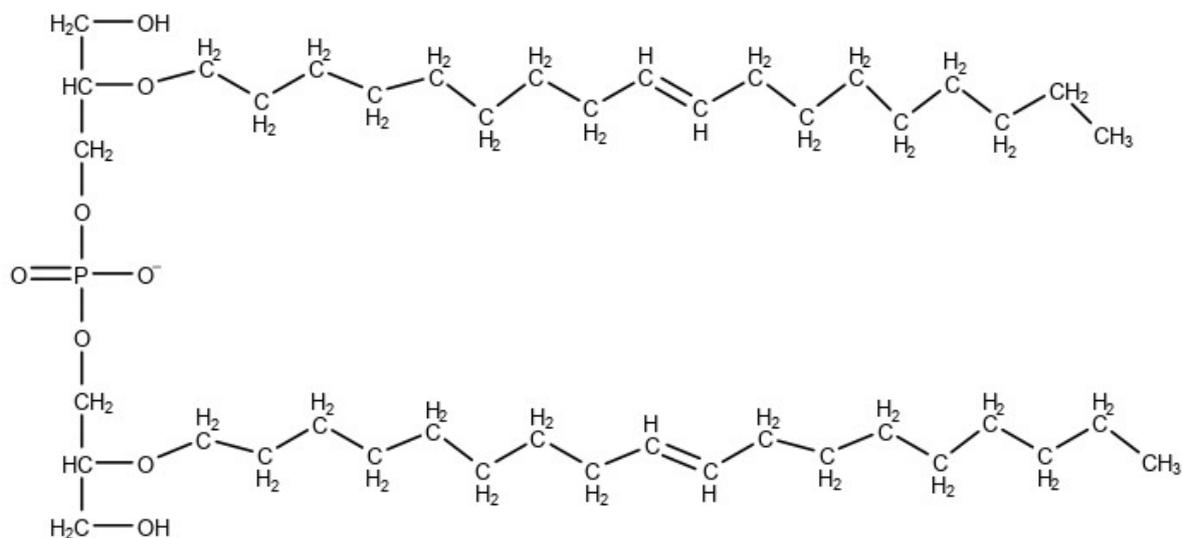


Figure 29 : *sn*-(3- hydroxy-2-oleoyl)-glycerol-1-phospho-*sn*-1'-(3'- hydroxy-2'-oleoyl)-glycerol

Tableau 22 : composition en acide gras du BMP dans différents tissus et cellules % massique(% en masse de l'acide gras par rapport à la masse totale de BMP) ; Lipid maps : 1 :(Wherrett & Huterer, 1973) ; 2 :(Huterer & Wherrett', 1979) ; 3 :(Luquain et al., 2000) ; 4 :(Brotherus & Renkonen, 1974)

Acide gras	Lysosome de foie de rat ¹	Foie humain ¹	Macrophages pulmonaire de lapin ²	Cellule utérine de rat ³	Testicules de rat ³	Cellule BHK ⁴
16 :0	3	6	4	6	5	4
18 :0	1	5	6	3	3	Trace
18 :1	5	57	47	30	5	83
18 :2	6	40	29	2	1	6
20 :4		6	4	4		
22 :4				6	5	
22 :5(n-6)	4		2	3	70	
22 :5(n-3)	4		2	8	Trace	
22 :6(n-3)	69	9	1	36	5	

5.1.3 Propriétés physico-chimiques

Le BMP est un phospholipide anionique, qui porte la charge sur son groupement phosphate. Sa surface polaire n'étant constituée que du groupement phosphate elle est plus petite que sa surface apolaire. Il a donc une forme conique (voir Chapitre 1), lui permettant de faire des courbures négatives dans les membranes.

Cette stéréoconfiguration atypique lui permet d'être moins sensible à l'hydrolyse par les phospholipases *in vivo* (Cochran et al., 1987; Luquain et al., 2000).

5.2 Métabolisme du BMP : synthèse et catabolisme

5.2.1 Synthèse

Bien que le BMP soit connu depuis un peu plus de 50 ans, sa synthèse est encore méconnue. En effet plusieurs aspects de sa biosynthèse sont encore méconnus tant pour les enzymes impliquées que sa localisation.

Tout d'abord, deux localisations subcellulaires de la synthèse de BMP ont été envisagées : dans la mitochondrie et dans les endolysosomes (Hullin-Matsuda et al., 2007). Pour la mitochondrie, on s'appuie sur son précurseur principal le PG, qui est produit dans la mitochondrie par la PGP synthase. De plus, le type de structure particulière du BMP en *sn-1* : *sn-1'* se retrouve dans d'autres organismes comme les archées. Comme la mitochondrie proviendrait de l'endosymbiose d'une bactérie par une cellule, on pourrait supposer que le BMP et/ou un précurseur pourrait y être synthétisé. Pour les endolysosomes, on s'appuie sur la localisation spécifique du BMP dans ce compartiment. En effet, ne pouvant actuellement détecter le BMP que dans les endolysosomes, on peut émettre l'hypothèse que le BMP y est produit. La possibilité de stimuler la synthèse de BMP en apportant son précurseur PG sous forme de liposomes est un autre argument. (Amidon et al., 1995, 1996; Arnal-Levron et al., 2019; Bouvier et al., 2009; Ilnytska, Jeziorek, et al., 2021; Poorthuis & Hostetler, 1976, 1978; Somerharju & Renkonen, 1980; Thornburg et al., s. d.; Waite et al., 1987, 1990). Les liposomes sont internalisés par les cellules par le biais de la voie d'endocytose, de plus, de nombreuses

transacylases sont présentes dans la voie endolysosomale pour permettre le réarrangement des acides gras sur les phospholipides.

Il semblerait que le BMP soit synthétisé dans les endosomes, bien que le PG endogène se trouve exclusivement dans les mitochondries.

Le BMP est majoritairement synthétisé *de novo* à partir du PG, précurseur endogène issu de l'acide phosphatidique (Hullin-Matsuda et al., 2007). Lors de travaux sur l'incorporation d'acides gras dans les phospholipides, Huterer et Wherrett (Huterer & Wherrett, 1986) ont mis en évidence que le réarrangement des acides gras du BMP, est beaucoup plus rapide que le recyclage du squelette de glycérol. D'autres études ont mis en évidence un tropisme du BMP pour le DHA, et que le BMP incorpore plus rapidement les acides gras polyinsaturés puis les monoinsaturés et enfin les acides gras saturés que les autres phospholipides. Ce réarrangement est sûrement dû à une activité transacylase.

Une voie de synthèse du BMP a été proposée par Waite & al (Amidon et al., 1996) (TA=activité transacylase) (figure 30). Selon ce schéma encore hypothétique, le PG est hydrolysé par la PLA2 (ou PLA1 si migration de l'acide gras), formant ainsi un *sn*-3 :*sn*-1' lysophosphatidylglycérol. Une transacylase forme un intermédiaire *sn*-3 :*sn*-1' PG/BMP avec un acide gras estérifié par glycérol en position *sn*-1 et *sn*-2'. Ensuite, un réarrangement structurel se fait spontanément, ou un complexe enzymatique de réorientation non identifié permet l'inversion de la stéréoconfiguration de la liaison phosphodiester. De plus en libérant un des acides gras en *sn*-1, le *sn*-3 :*sn*-1' PG/BMP devient un *sn*-1 :*sn*-1' lysophosphatidylglycérol. Enfin une transacylase permet l'estérification d'un acide gras sur le *sn*-2 qui devient le *sn*1 :*sn*1' BMP.

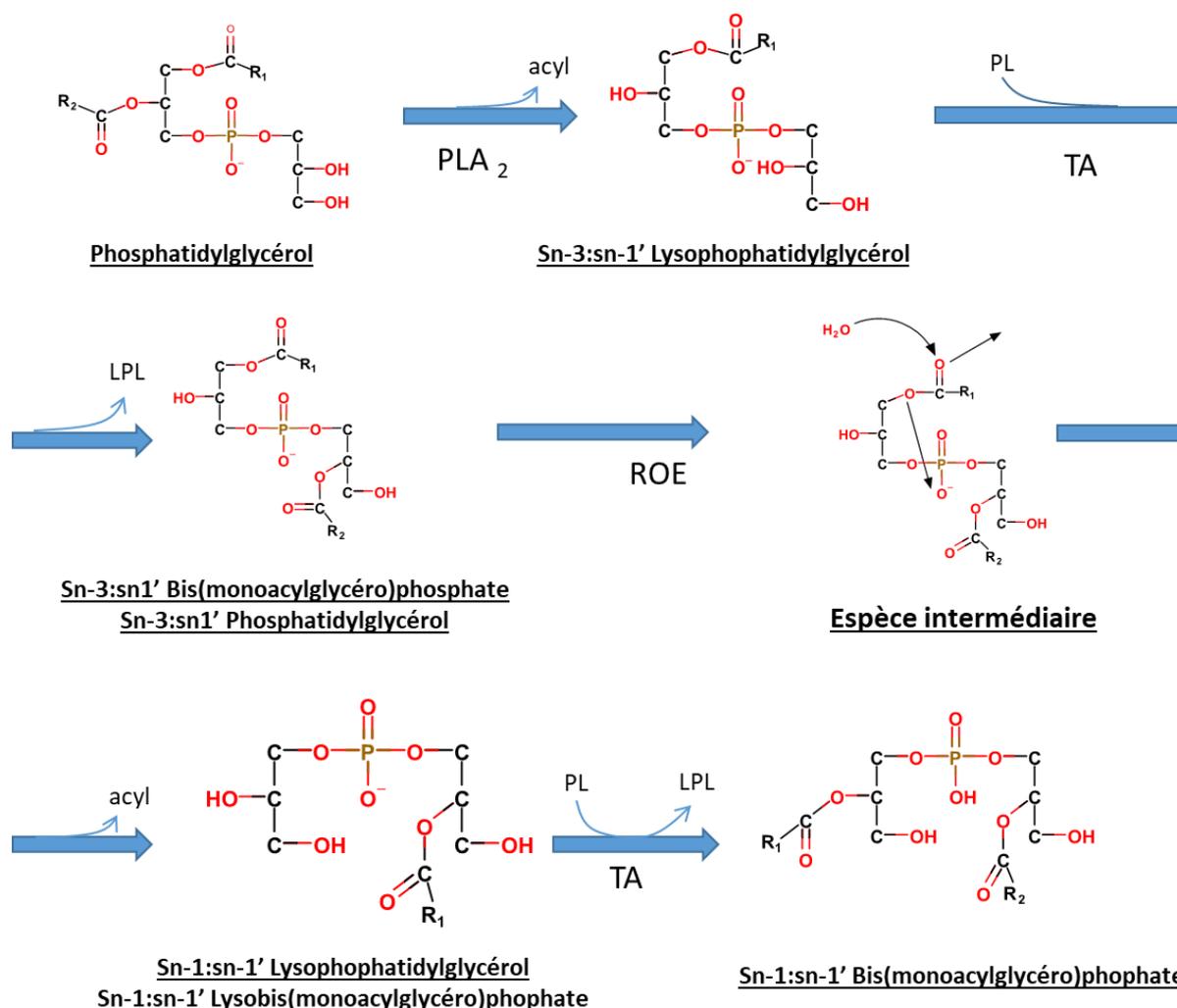


Figure 30 : schéma possible synthèse BMP (Amidon et al., 1996), TA : activité transacétylase, ROE : enzyme de réorientation

Il semblerait que le BMP soit synthétisé dans les endosomes, or le PG son précurseur endogène se trouve exclusivement dans les mitochondries.

Les cardiolipines ont aussi été proposées comme précurseur de BMP. Lors d'incubation de cardiolipines avec des lysosomes de rat à pH acide, on observe une synthèse de BMP. Le BMP serait synthétisé via le lysoPG issu de la dégradation du cardiolipine (Poorthuis & Hostetler, 1978). Les auteurs ont émis l'hypothèse que le BMP est synthétisé dans les endolysosomes, à des zones de contact entre les endolysosomes et des membranes contenant des précurseurs. On peut envisager une intervention des protéines MAM aux zones de contact entre les endosolysosomes et la mitochondrie.

5.2.2 Catabolisme

Bien que le BMP soit peu sensible à la dégradation enzymatique, plusieurs activités d'hydrolyse ont été rapportées. La Lipase de *R. arrhizus* est capable d'hydrolyser *in vitro* le BMP extrait de cellules utérines de rat (Luquain et al., 2000). Matsuzawa et al ont montré la présence dans les lysosomes d'une phosphodiesterase acide qui hydrolyse le BMP (Matsuzawa & Hostetler, 1980). La PLA1 (Cochran et al., 1987), la PLA2 (Ito et al., 2002), la PLRP2 (Record et al., 2011) et l'ABHD6 (Grabner et al., 2020; Pribasnic et al., 2015) sont aussi capables d'hydrolyser le BMP *in vitro*. Les PLA (phospholipase acide) sont des hydrolases acides des phospholipides, elles hydrolysent un acide gras, elles sont localisées de façon ubiquitaire dans les cellules. La PLRP2 (*pancreatic lipase-related protein 2*) a une activité PLA2 au pH optimum de 5,5, localisée de façon ubiquitaire dans la cellule. L'ABHD6 (*α/β Hydrolase domain-containing 6*) est une enzyme ayant une activité monoacylglycérol hydrolase. Son pH optimum est neutre voir faiblement acide. Elle se retrouve localisée avec le BMP dans certaines conditions (Pribasnic et al., 2015). Enfin la sphingomyélinase acide (ASM) est capable d'hydrolyser un grand nombre de lipides dont le BMP grâce à sa fonction phosphodiesterase (Breiden & Sandhoff, 2021). Elle est active à pH acide au niveau des endolysosomes.

5.3 Localisation du BMP

5.3.1 Intracellulaire

Le BMP est détecté dans la majorité des cellules de mammifères. Il est aussi présent dans les archées et certaines bactéries alcalinophiles mais il est absent des levures (Nishihara et al., 1982; Rodriguez-Paris et al., 1993). Le BMP a la particularité de n'être présent qu'au niveau du compartiment endolysosomal acide correspondant aux endosomes tardifs et lysosomes (Hullin-Matsuda et al., 2014; Kobayashi et al., 1998) (voir chapitre endocytose). Ces organelles sont des compartiments semblables mais ne jouant pas le même rôle dont la distinction est récente, ce qui a conduit dans un premier temps à localiser le BMP uniquement dans les lysosomes. Le BMP apparaît dans la voie endolysosomale à partir des corps multi vésiculaires (MVB) et sa concentration augmente en parallèle de l'acidification du compartiment endosomal

(Hullin-Matsuda et al., 2014). Sa concentration est à son maximum au niveau de l'endosome tardif. Bien que le BMP soit un phospholipide peu représenté dans les cellules (de l'ordre de 1 à 3% des lipides totaux), il représente 15 à 20 % des phospholipides totaux des endosomes, et jusqu'à 70 % des phospholipides des membranes des vésicules intra luminales des endosomes, les ILV (Galve-de Rochemonteix et al., 2000; Gruenberg, 2020; Hullin-Matsuda et al., 2009, 2014; Kobayashi et al., 1998) (figures 31 et 32). Dans de rares cas, le BMP va pouvoir être observé au niveau du feuillet externe des endosomes tardifs. Cette localisation atypique est dû au phénomène de *back fusion* (Gruenberg, 2020).

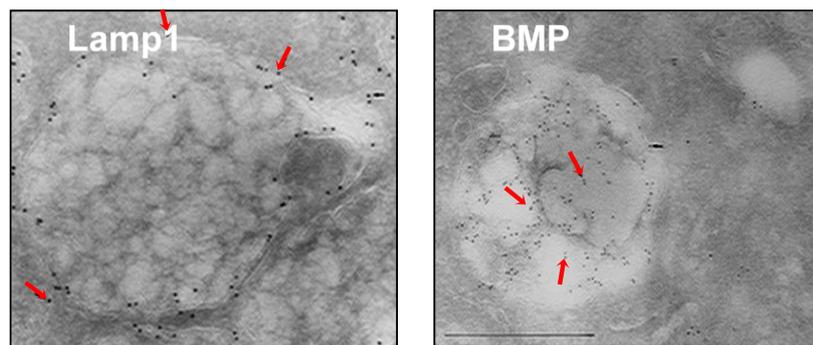


Figure 31 : localisation intracellulaire du BMP, d'après (Kobayashi et al., 1998), marquage immunologique couplé à un immunogold dirigé contre le BMP présent dans les endosomes tardifs

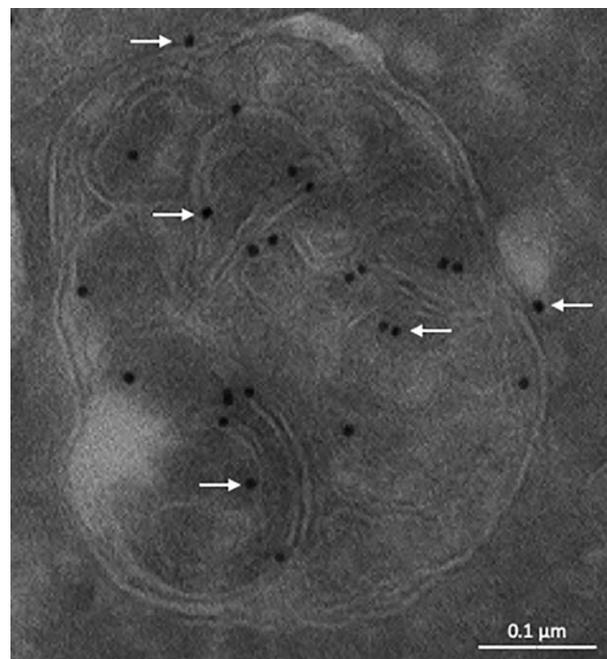


Figure 32: distribution dans les endosomes tardifs du BMP, dans des cellule HeLa. Immunogold dirigé contre le BMP via l'anticorps 6C4 (anti-BMP), taille des billes d'or 10 nm source (Gruenberg, 2020)

5.3.2 Extracellulaire

Jusqu'à une dizaine d'années, le BMP n'était observé qu'au niveau du compartiment endolysosomal. L'évolution des techniques d'analyse permettant de détecter des quantités infimes, le BMP a aussi été mesuré dans des fluides biologiques, au niveau plasmatique, dans l'urine, et dans les surnageants de culture (sécrétion des cellules). L'équipe de Meikle a montré qu'en absence de pathologie, le BMP est présent dans le plasma humain associé aux lipoprotéines dans une proportion de 40%, les 60 % restant seraient transportés par la BSA ou bien des vésicules extracellulaires comme les exosomes (Meikle et al., 2008). La présence de présence de BMP dans les exosomes est encore aujourd'hui débattue (Laulagnier et al., 2004; Miranda et al., 2018; Miranda & Paolo, 2018; Wubbolts et al., 2003). Notre équipe a montré par microscopie électronique la présence de BMP dans des exosomes urinaires et sécrétés par des cellules (Rabia et al., 2020). Les résultats de ces études sont présentés dans la partie résultat BMP et exosomes.

5.4 Rôle physiologique

5.4.1 Rôle dans l'endocytose et la dynamique membranaire des endolysosomes

La structure et la charge négative sur le groupement phosphate confèrent au BMP une conformation conique dans les membranes, très déstabilisante pour les membranes biologiques. De nombreuses études ont montré le rôle de fluidifiant et déstabilisant des membranes contenant du BMP. Des liposomes contenant du BMP et du GM1 en proportion équimoléculaire soumis à une différence de pH interne/externe similaire à celle des endosomes (figure 33) forment des vésicules multi-lamellaires rappelant les structures multilamellaires observées lors de maladies lysosomales comme les gangliosidoses (Hayakawa et al., 2007). Des liposomes de BMP de différentes configurations forment spontanément des ILV, en faisant varier le pH interne et externe dans ces liposomes (Matsuo et al., 2004). Ces résultats ont permis de montrer *in vitro* la capacité du BMP sous forme native à former spontanément des invaginations de la membrane vers l'intérieur de liposome à pH acide et donc d'extrapoler sa fonctionnalité dans l'endosome. La forme native du BMP est *sn-2* ; *sn-2'*, en position *sn-3* ; *sn-3'* le BMP perd son

activité de fusion et de vésiculation (Carrière et al., 2020; Matsuo et al., 2004). Des études cellulaires ont aussi été réalisées.

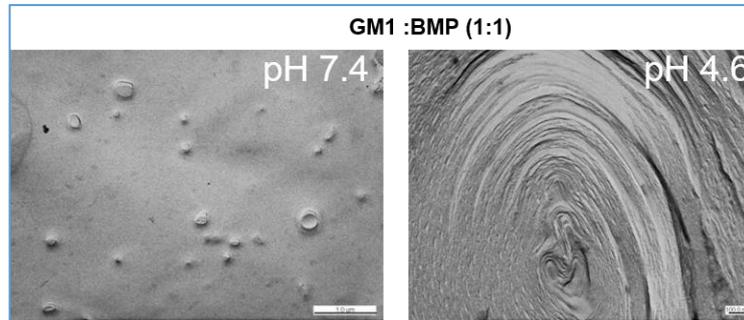


Figure 33 - Empilement de lipides (ganglioside GM1 et BMP) dépendant du pH (d'après Hayakawa et al., 2007)

Le D-PDMP qui entraîne une diminution du pH augmente le nombre de corps multi vésiculaires dans les endosomes. Ces MVB contiennent des régions riches en BMP (Makino et al., 2006). Une autre étude portant sur la déplétion du récepteur au mannose-6-phosphate, a mis en évidence cette formation de corps multi vésiculaires dans des endosomes riches en BMP (Reaves et al., 2000).

Les domaines riches en BMP présents dans la membrane endosomale ont la faculté de former des ILV (Burger, 2000; Dikic, 2004; Matsuo et al., 2004). En effet, par sa forme conique le BMP a la faculté de réaliser des courbures négatives spontanées des membranes par un mécanisme dépendant de la protéine ALIX (Hullin-Matsuda et al., 2009; Hurley, 2008). ALIX et le BMP vont interagir pour contrôler la formation d'IVL vers le lumen endosomal mais aussi vers le cytosol (*back fusion*) (Dikic, 2004; Falguières et al., 2009; Gruenberg, 2020; Hullin-Matsuda et al., 2009; Matsuo et al., 2004). Lors de la *back fusion*, le BMP est observé au niveau du feuillet externe de la membrane limitante des endosomes (Gruenberg, 2020), ce qui pourrait permettre à l'hydrolase ABHD6 de dégrader le BMP (voir partie catabolisme du BMP) (Grabner et al., 2020; Pribasnig et al., 2015). La réalisation de ces phénomènes d'invagination par le BMP et ALIX requièrent d'autres facteurs, comme par exemple les complexes ESCRTs (Dikic, 2004; Falguières et al., 2009; Gruenberg, 2020; Hullin-Matsuda et al., 2009; Matsuo et al., 2004). La *back fusion* permet de faire le lien entre les endosomes et le TGN. Plusieurs pathogènes vont utiliser la *back fusion* comme par exemple la toxine de l'anthrax, le virus HIV, le virus de la stomatite vésiculaire (VSV), de l'encéphalite japonaise et de la fièvre jaune flavivirus (Abrami et al., 2013; Carrière et al., 2020; Gruenberg, 2020; Gruenberg & van

der Goot, 2006; Le Blanc et al., 2005; Luquain-Costaz et al., 2020; Luyet et al., 2008) . Il est intéressant de voir que dans les endosomes, il peut y avoir des ILV avec du BMP et d'autres sans (Gruenberg, 2020; Scott et al., 2014). Le BMP joue donc un rôle très important dans la dynamique membranaire des endosomes mais pas seulement. Le rôle du BMP dans la fusion membranaire est à l'origine de l'hypothèse émise par Subra et al (Subra et al., 2007) considérant le rôle du BMP dans la fusion membrane plasmique - corps multi vésiculaire, permettant la sécrétion d'exosomes, qui sera développée plus loin.

5.4.2 Rôle dans l'homéostasie et le trafic intracellulaire du cholestérol

Le BMP joue plusieurs rôles dans le transport et le métabolisme du cholestérol. Le cholestérol issu des LDL est distribué dans la cellule à partir des LE. Le cholestérol libre va sortir des endosomes tardifs par le biais des protéines NPC 1 et 2, protéines mutées dans la maladie de NPC (Vanier, 2010). L'utilisation de l'anticorps anti-BMP, d'anticorps anti-phospholipides ou de composés lipophiles cationiques (permettant de neutraliser la charge négative du BMP) entraîne une modification du trafic du cholestérol (Delton-Vandenbroucke et al., 2007; Hullin-Matsuda et al., 2009; Kobayashi et al., 1999; Reaves et al., 2000). Il est observé une augmentation du cholestérol libre dans les LE et une diminution de la mobilité des LE, lors de l'utilisation d'U18666A sur des cellules HeLa et BHK (Lebrand et al., 2002). Ce phénotype est semblable à celui observé dans la maladie de NPC. Lors de l'utilisation de l'anticorps anti-BMP, il y a une diminution de l'efflux du cholestérol par les HDL, le BMP jouerait donc un rôle au niveau de la voie des transporteur ABC G1 et A1 (Arnal-Levron et al., 2019; Delton-Vandenbroucke et al., 2007; Luquain-Costaz et al., 2013). Des études récentes ont montré qu'une interaction physique entre le BMP et NPC 2 est nécessaire au transport du cholestérol par NPC 1 (McCauliff et al., 2019).

Notre équipe a montré que lors de l'incubation de l'anticorps anti-BMP avec des macrophages (RAW, THP1) le cholestérol intracellulaire est modifié. Il a été observé une augmentation du cholestérol libre, sans modification de la capacité d'estérification du cholestérol des cellules. On observe aussi une augmentation du cholestérol présent dans la membrane plasmique lors d'une surcharge en cholestérol médiée par des LDL acétylés

(Delton-Vandenbroucke et al., 2007), associée à une diminution de l'efflux de cholestérol par les HDL.

L'augmentation du BMP intracellulaire en incubant des cellules RAW 264.7 avec du PG, entraîne une diminution de l'expression de SREBP2 et de la HMGCOA réductase, enzymes clés de la synthèse du cholestérol, suggérant une diminution de la synthèse de cholestérol (Luquain-Costaz et al., 2013). Il y aurait aussi une augmentation du cholestérol libre présent dans le RE sans augmentation de l'estérification du cholestérol. Toutefois, l'augmentation du BMP entraîne aussi une diminution de l'efflux par les HDL, résultant d'une diminution de l'expression des ABC transporteurs A1 et G1 et des LXR α et β . L'enrichissement en BMP dans des cellules traitées ou non par des LDL oxydés ne modifie pas le cholestérol libre et estérifié cellulaire.

Ces résultats prouvent donc l'importance du taux de BMP endosomal dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol en contrôlant sa distribution intracellulaire et ses pools fonctionnels, et donc le métabolisme du cholestérol.

Chevalier et al, ont montré que le BMP et la protéine ALIX jouent un rôle dans le trafic du cholestérol. En effet, la diminution de l'expression d'ALIX dans des cellules Hela par siARN entraîne une diminution du BMP, suggérant un lien fonctionnel. Le contenu en cholestérol est aussi diminué ainsi que le nombre d'ILV dans les endolysosomes. Les auteurs concluent que la diminution du cholestérol intracellulaire est due à la diminution des ILV, il serait dirigé vers la sécrétion. Par ailleurs, en incubant des cellules NPC avec des liposomes de BMP, ils ont montré une diminution de l'accumulation du cholestérol cellulaire, concluant que le BMP pourrait réverser le phénotype NPC et serait donc limitant dans cette pathologie (Chevallier et al., 2008).

Des travaux de l'équipe ont en outre suggéré un rôle protecteur du BMP contre l'oxydation du cholestérol qui génère les oxystérols. Ces produits d'oxydation sont issus des LDL oxydées et /ou après oxydation intracellulaire du cholestérol dans le LE (Y. Chen et al., 2015, 2018) . Le rôle protecteur du BMP serait médié par la protéine ORP11 (Arnal-Levron et al., 2019). De plus l'espèce moléculaire di-DHA BMP joue un rôle d'antioxydant permettant d'éviter l'oxydation du cholestérol en oxystérols (Bouvier et al., 2009)

L'utilisation de l'anticorps anti-BMP a permis de mettre en évidence un lien entre la mobilité des endosomes, le BMP et le cholestérol. En effet lors de l'incubation de cellules NPC avec l'anti-BMP ou bien des cellules incubées avec l'anti-BMP et l'U1866A, les endosomes

tardifs perdent leur mobilité. Les auteurs suggèrent que cette inhibition est due à l'augmentation du cholestérol dans les endosomes (Lebrand et al., 2002).

Enfin, une étude sur le rôle du BMP dans des modèles NPC1 ont montré un lien entre le BMP et l'autophagie. En effet, l'augmentation du BMP intracellulaire entraîne une diminution du cholestérol cellulaire via l'autophagie dans ces modèles (Ilnytska, Lai, et al., 2021).

5.4.3 Rôle du BMP dans les voies de dégradation intra-lysosomales

Le BMP est aussi associé à la régulation de certaines hydrolases. En effet sa charge négative permettrait d'augmenter l'accessibilité des phospholipides avec leur hydrolase (Hullin-Matsuda et al., 2009; Linke, Wilkening, Lansmann, et al., 2001). La saposine C peut s'associer avec le di-oléate BMP permettant de faire des fusions membranaires. La saposine C active indirectement les céramidases acides, et son association avec le BMP aussi (Linke, Wilkening, Sadeghlar, et al., 2001). *In vitro*, le BMP semble augmenter l'activité de la LAL (Makino et al., 2006). La LAL permet l'hydrolyse des esters de cholestérol issus des LDL. Néanmoins lors de l'utilisation de l'anti-BMP dans des cellules, il n'y a pas de modification de l'activité de la LAL (Delton-Vandenbroucke et al., 2007). La phospholipase A2 lysosomale, la sphingomyélinase acide ont leur activité augmentée en présence de BMP (Hsp70 facilite la liaison BMP_ASM)(Abe & Shayman, 2009; Linke, Wilkening, Lansmann, et al., 2001). De plus, lors de maladie auto immune comme par exemple les syndromes anti-phospholipides (APS), on constate une immobilisation du BMP par des anticorps, conduisant à une augmentation de la quantité de phospholipides et de sphingolipides dans les endolysosomes. Cette augmentation est aussi observée avec l'anticorps anti-BMP (Kobayashi et al., 1998). Le BMP joue donc un rôle dans la dégradation intra-lysosomale en augmentant les interactions hydrolase - substrat.

Des études antérieures et récentes ont démontré un lien entre le BMP et les maladies auto-immunes. Kobayashi et al, ont montré que lors des APS, le BMP est reconnu par les anticorps anti-phospholipides (AP) entraînant une perturbation du trafic endosomal (Galve-de Rochemonteix et al., 2000; Kobayashi et al., 1998). Une accumulation anormale des récepteurs IGF2 et MPR est observée dans les endosomes suggérant que le BMP joue un rôle dans le trafic endosomal des protéines (Kobayashi et al., 1998). (Kobayashi et al., 1998). En effet, en

condition physiologique, ces récepteurs sont présents majoritairement dans l'appareil de golgi, d'où ils sont recrutés vers les endosomes puis recyclés vers l'appareil de golgi, conduisant à des cycles entre les 2 organites. De plus, la reconnaissance par les AP du BMP, entraîne une accumulation de matériels dans les endosomes visibles par microscopie électronique (Kobayashi et al., 1998). La β 2GPI est une protéine plasmique, qui est la cible principale des AP (Garcia & Erkan, 2018). L'interaction entre le BMP et les AP est médiée en partie via β 2GPI, mais pas que, elle est aussi directe ou indirecte via d'autres protéines (Galve-de Rochemonteix et al., 2000). Les APS sont connus pour provoquer des thromboses et d'autres pathologies, les auteurs ont ainsi conclu que le BMP joue un rôle dans ces pathologies associées aux APS (Galve-de Rochemonteix et al., 2000). Récemment Muller-Calleja et al (Kaplan, 2021; Müller-Calleja et al., 2021) ont montré un lien direct entre les thromboses associées aux APS et le BMP. Ce lien est médié par le récepteur EPCR (récepteur endothélial à la protéine C). En condition physiologique, l'EPCR est associé à différents phospholipides comme les PC, mais pas le BMP (Dahlbäck & Villoutreix, 2005). Cette association permet l'activation de la protéine anti-coagulante C, permettant le déclenchement de réaction anti inflammatoire et anti thrombotique. Mais lors d'APS, l'EPCR est associé au BMP (Kaplan, 2021; Müller-Calleja et al., 2021). L'EPCR est un récepteur de la membrane plasmique, cette association est donc surprenante (BMP uniquement dans les endosomes). Les AP vont reconnaître le complexe BMP/EPCR, provoquant l'activation des cellules β induisant une augmentation des AP, l'activation des plaquettes pouvant déclencher des thromboses et une réaction inflammatoire (Kaplan, 2021; Müller-Calleja et al., 2021). Des cas d'APS ont pu être observés lors de syndrome de déficience respiratoire sévère lors de la COVID-19 (Martirosyan et al., 2019) ou lors de Lupus (Kaplan, 2021).

Le rôle du BMP dans les APS est à étudier pour permettre de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu et développer des options thérapeutiques.

5.5 Applications médicales

5.5.1 Biomarqueur à but diagnostique et pronostic

Une élévation du BMP cellulaire et plasmatique est observée dans de nombreuses LSD : Maladie de Niemann Pick de type C, Fabry... (Meikle et al., 2008; K. L. Thompson et al., 2012). Le BMP permet donc d'être un biomarqueur de LSD/phospholipidose. Cependant, il s'agit d'un biomarqueur générique. C'est-à-dire qu'il n'est pas spécifique d'une seule maladie mais de plusieurs, ce qui permet de le considérer comme un excellent marqueur de dysfonctionnement du compartiment endolysosomal. On pourrait donc utiliser le BMP pour permettre de différencier les personnes atteintes d'une maladie endolysosomale génétique ou induite, suivre son évolution. (Syndrome métabolique etc.)

Le BMP est utilisé comme biomarqueur de phospholipidoses induites par les CAD lors des tests de dépistage toxicologique dans l'industrie pharmaceutique. De nombreuses études chez le rat ont montré que la chloroquine et l'amiodarone augmentent le BMP urinaire chez le rat (Hullin-Matsuda et al., 2009; Matsuzawa & Hostetler, 1980; K. L. Thompson et al., 2012; A. Yamamoto et al., 1971, 1976). L'équipe de Thompson a montré une augmentation du di-DHA BMP urinaire chez le rat lors d'une phospholipidose induite par l'amiodarone (K. L. Thompson et al., 2012). Notre équipe a récemment montré que le traitement à l'amiodarone entraîne une augmentation du BMP urinaire chez l'homme (Rabia et al., 2020). Dans la partie résultat nous reviendrons en détail sur cette étude.

5.5.2 Implication du BMP dans le désengorgement cellulaire

Des études sont en cours pour l'utilisation du BMP comme outil thérapeutique. Une étude préliminaire portant sur la NPC est prometteuse. L'équipe de Storch (Ilnytska, Jeziorek, et al., 2021) a en effet montré qu'une augmentation de BMP intracellulaire dans des fibroblastes NPC (*human primary NPC1 Fibroblasts* (GM03123) incubées avec du OO-PG) stimule la sécrétion d'exosomes, confirmant le lien entre BMP et la sécrétion exosomale. De plus, l'augmentation de BMP est corrélée à une meilleure sortie du cholestérol des cellules NPC. Le

BMP aide en outre à éliminer du cholestérol via un mécanisme d'autophagie. En effet l'augmentation du BMP intracellulaire stimule l'autophagie et permet de diminuer la surcharge en cholestérol (Ilnytska, Lai, et al., 2021). Cette étude supporte l'utilisation du BMP dans diverses maladies de surcharge en cholestérol comme la NPC.

Le BMP jouerait un rôle dans le dégorgement des cellules du peptide β amyloïde. En effet lors de perturbation endosomale induite dans des neuroblastes, les cellules secrètent des exosomes enrichis en BMP et peptide β amyloïde. Il serait intéressant de poursuivre ces études pour étudier le rôle du BMP dans les maladies neurodégénératives. (Miranda et al., 2018; Miranda & Paolo, 2018).

Enfin l'équipe a pu mettre en évidence un lien entre la production des oxystérols et la concentration en BMP, via la protéine ORP11. Il serait intéressant de poursuivre ces travaux et de voir si un enrichissement en BMP pourrait dégorger l'excès d'oxystérols dans les cellules (Arnal-Levron et al., 2019). Pour rappel, les oxystérols provoquent un stress oxydatif qui conduit à l'apoptose des cellules.

5.5.3 Implications thérapeutiques du BMP lors des infections virales.

Le BMP a été impliqué dans les infections virales. En effet, les virus à ARN comme celui de la Dengue ou du SARS CoV-1 ont besoin de phospholipides anioniques comme le BMP pour infecter les cellules de leur hôte (Carpio & Villalaín, 2020; Luquain-Costaz et al., 2020; Stadler et al., 2008; Zaitseva et al., 2010). Les virus sont internalisés et rejoignent la voie endosomale. Les virus détournent ainsi le trafic endosomal pour être libérés dans le cytosol et donc poursuivre et propager l'infection. Ce détournement nécessite une composition lipidique spécifique de la membrane des endosomes (Carpio & Villalaín, 2020; Luquain-Costaz et al., 2020; Roth & Whittaker, 2011). Le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) requiert du BMP pour échapper à la voie endosomale et poursuivre l'infection (Luyet et al., 2008): des études ont en effet montré que la diminution de la quantité de BMP (en diminuant l'expression de la protéine ALIX) réduit l'infection par le VSV (Carrière et al., 2020; Matsuo et al., 2004). L'utilisation de l'anticorps anti-BMP provoquant l'immobilisation du BMP dans les endosomes entraîne une diminution de l'infection par le virus de la dengue (Carrière et al., 2020; Pattanakitsakul et al., 2010). (Carrière et al., 2020; Pattanakitsakul et al., 2010). L'augmentation

de BMP obtenue lors de perturbation endosomale induite par l'U18666A ou le MAFP conduit à une diminution de l'infection par le HIV (Carrière et al., 2020; Chapuy-Regaud et al., 2013).

Deux récentes revues (Carrière et al., 2020; Luquain-Costaz et al., 2020) ont mis en évidence le double rôle du BMP dans les infections virales. Le BMP jouerait un rôle pro viral lorsque l'infection virale a lieu sans perturbation endosomale. Le BMP jouerait un rôle anti viral lorsque l'infection virale a lieu lors de perturbations endosomales. Ces perturbations doivent entraîner une augmentation ou une diminution du BMP, et/ou une augmentation du pH des endosomes.

Le BMP aide à la *back fusion* grâce à ces propriétés fusogéniques, qui sont maximales à pH acide et faible à pH 6,4 (dû à une modification de la position des acides gras). La chloroquine augmente le pH des endosomes, conduisant à un pH d'environ 7,4 (Tycko & Maxfield, 1982). Ce qui diminuerait la *back fusion* des endosomes due à une modification de la position des acides gras du BMP, et donc limiterait l'infection des virus (Carrière et al., 2020).

Le BMP pourrait donc être à la fois une cible et un outil thérapeutique dans les infections virales.

PARTIE II-MATERIELS ET METHODES

Chapitre 6 : Matériels et produits utilisés

6.1 Matériels spécifiques utilisés

Tableau 23: liste du matériel utilisé

Matériels	Utilisation
Centrifugeuse 5804R Eppendorf (rotor S-4-72 /FA 34-6-38/FA 45-30-11)	Toutes les centrifugations jusqu'à 10 000g
Ultracentrifugeuse Ultra Beckman CO-LE80K (rotor 50.2 Ti)	Purification EV et préparation du milieu « EV free »
Ultracentrifugeuse Optima TL Ultracentrifuge Beckman (rotor TLA 100.3/100.2)	Purification EV après ultrafiltration
Ultracentrifugeuse Optima XE-90 Beckman Coulter (rotor SW 41 Ti)	Gradient de sucrose
Tube amicon cut off 100 kDa (Sigma ref UFC 9100/24)	Ultrafiltration
Lecteur de plaque : Multiscan Go (Thermo scientific)	Lecture absorbance dosage protéines
Imageur : Camera Image Master VDS-CL (Amersham Biosciences)	Analyse Western blot

6.2 Produits (chimiques et autres)

6.2.1 Standards lipidiques

Les standards lipidiques proviennent d'Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, USA).

Tableau 24: liste des différents standards lipidiques

Nom usuel	Nom référence Avanti Polar Lipids	référence
di-oléate BMP	bis(monooleoylglycero)phosphate (S,R Isomer)	857133P
di-oléate PG	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho- (1'-rac-glycerol)	840475P
di-myristate BMP	bis(monomyristoylglycero)phosphate (S,R Isomer)	857131P
di-myristate PG	1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3- phospho-(1'-rac-glycerol)	840445P
Cholestéryl oléate (EC 18 :1)		700269P
cholestérol		700000P
di-oléate PC	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3- phosphocholine	850375P
di-oléate PE	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3- phosphoethanolamine	850725P
di-oléate PS	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho- L-serine	840035P
Oléate sphingomyéline	N-oleoyl-D-erythro- sphingosylphosphorylcholine	860587P
Triolein (tri-oléate TAG)	1,2,3-tri-(9Z-octadecenoyl)-glycerol	870110O
di-oléate DAG	1-2-dioleoyl-sn-glycerol	800811O
Acide oléique		861809O

6.2.2 Divers réactifs chimiques

Tous les solvants utilisés proviennent de VWR Chemicals et sont soit HPLC grade ou RPE. Le formate d'ammonium, l'amiodarone hydrochloride, l'U18666A, la chloroquine et le sucrose proviennent de Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

6.2.3 Produits pour culture cellulaire

Tous les produits de culture cellulaire : les milieux, le sérum de veau fœtal (SVF), les antibiotiques proviennent de Gibco (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) sauf pour le milieu HAM F10 qui provient de Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

6.2.4 Anticorps

Les anticorps monoclonaux proviennent de Santa Cruz biotechnology (Heidelberg, Germany), Anti CD 63 (sc-5275), Anti ALIX (sc-53540), Anti TSG 101 (sc-7964), Anti CD 81 (sc-166 028), Anti Lamp1 (sc-20011).

L'anticorps secondaire dirigé contre les anticorps monoclonaux de souris couplé à la peroxydase provient de Jackson ImmunoResearch Labs (Baltimore Pike, West Grove, Etats-Unis)

Le conjugué fluorescent AF488 (références 44708S) provient de Cell Signaling technology (Danvers, Massachusetts, Etats-Unis)

L'anticorps anti-BMP (6C4) est un anticorps monoclonal de souris donné par le Dr T.Kobayashi (Université de Strasbourg, France et RIKEN, Japon) (Kobayashi et al., 1998)

Tableau 25: liste des anticorps utilisés

Nom anticorps/cible	Référence	Type (mono/polyclonal)	Immunoglobuline	Cible	Origine
Anti-BMP	6C4	Monoclonal	Hybridome (et IgG _{1κ} sous forme purifiée)	BMP de hamster (membranes endosomales de cellules BHK)	Souris
Anti CD63	Sc-5275	Monoclonal	IgG ₁	Protéine totale humaine	Souris
Anti CD81	sc-166 028	Monoclonal	IgG _{2b}	Acides aminés 90-210 de la protéine humaine	Souris
Anti TSG101	sc-7964	Monoclonal	IgG _{2a}	Acides aminés 1-138 de la protéine de souris	Souris
Anti ALIX	sc-53540	Monoclonal	IgG _{1κ}	Protéine totale humaine	Souris
Anti Lamp1	Sc-2011	Monoclonal	IgG _{1 κ}	Protéine totale humaine	Souris

6.3 Matériels biologiques

6.3.1 Cellules en culture :

Toutes les cellules sont cultivées en routine au laboratoire et sont contrôlées pour vérifier l'absence de mycoplasme.

6.3.1.1 Lignées cellulaires commerciales

Toutes les lignées cellulaires sont issues de l'*American Type Culture Collection (ATCC)*.

6.3.1.1.1 Cellules RAW 264.7

Les cellules RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™) sont cultivées avec du milieu MEM (*Minimum Essential Media*), supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté, 1% d'acides aminés non essentiels (NEAA), et 100U/ml de pénicilline, 100 µg/ml streptomycine (1% P/S). Les cellules sont placées à 37°C dans une atmosphère humide avec 5% CO₂. Ces cellules sont des macrophages péritonéaux murins, obtenus après infection par « le virus de la leucémie Abelson ». Elles ont un temps de doublement d'environ 18h. Elles sont utilisées jusqu'à un passage n=20. Elles sont cultivées en routine dans des flasques de culture de 75cm², et récupérées par grattage du tapis cellulaire pour la subculture. Les cellules sont ensuiteensemencées à 5.10⁵ cellules pendant 1 semaine puis repiquées. Le milieu est changé 2 fois par semaine.

6.3.1.1.2 Cellules HEK 293

Les cellules HEK 293 (*Human Embryonic Kidney*) (ATCC CRL-1573) sont cultivées dans du milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté, et 1% P/S. Les cellules sont placées à 37°C dans une atmosphère humide avec 5% CO₂. Les HEK 293 sont des cellules embryonnaires rénales humaines. Elles ont un temps de doublement d'environ 24h et sont utilisées jusqu'au passage 20. Elles sont cultivées en routine dans des flasques de culture de 75cm². La subculture est réalisée par trypsination du tapis cellulaire. Les cellules sont ensuiteensemencées à 3.10⁶ cellules pendant 1 semaine puis repiquées. Le milieu est changé 2 fois par semaine.

6.3.1.1.3 Cellules THP-1

Les cellules THP-1 (ATCC TIB-202) sont des monocytes humains. Elles sont cultivées avec du milieu RPMI 1640 supplémenté par 10% de SVF décomplémenté, 100U/mL de pénicilline et 100µg/mL de streptomycine. Les cellules sont placées à 37°C dans une atmosphère humide avec 5% CO₂. Les THP 1 sont des monocytes humains issus d'un prélèvement sanguin d'un enfant atteint de leucémie. Elles ont un temps de doublement

d'environ 24h et sont utilisées jusqu'à un passage n=20. Elles sont cultivées en routine en suspension dans des flasques de culture de 75cm². La subculture est réalisée par centrifugation du milieu cellulaire et reprise du culot. Les cellules sont ensuiteensemencées à 30.10⁵ cellules pendant 1 semaine puis repiquées. Le milieu est changé 2 fois par semaine.

Les monocytes THP-1 sont différenciés en macrophages en présence de 50ng/ml de PMA (*phorbol 12-myristate 13 acetate*) pendant 72h.

6.3.1.2 Cellules non transformées (primaires et assimilées)

6.3.1.2.1 Fibroblastes de peau issus de sujets contrôles ou patients NPC

Les cellules, fibroblastes issus de biopsie de peau de sujets contrôles ou de patients atteints de NPC, ont été obtenues dans le cadre d'un contrat de transfert avec le Centre de Ressources Biologiques des Hôpitaux Civils de Lyon CRB-HCL, CBC Biotec (www.chu-lyon.fr/fr/centre-de-ressources-biologiques) (tableau 26). Elles sont cultivées dans du milieu Ham F10 supplémenté avec 20% de SVF décomplémenté, 100U/ml de pénicilline, 100 µg/ml streptomycine et l'ajout de CaCl₂ (2 mM final). Les cellules sont placées à 37°C dans une atmosphère humide avec 5% CO₂. Elles ont un temps de doublement d'environ 48h. Elles sont cultivées en routine dans des flasques de culture de 75cm². La subculture est réalisée par trypsination du tapis cellulaire. Les cellules sont ensuiteensemencées à 1,5.10⁶ cellules pendant 1 semaine puis repiquées. Le milieu est changé 2 fois par semaine.

Tableau 26 : Caractéristiques des cellules de fibroblastes de patients NPC et sujets contrôles utilisés

Cellule	Age sujet	Type	Mutation
AC900	20 jours	Contrôle	
AC935	1 an et demi	Contrôle	
AD160	9 mois	Contrôle	
R935	1 an et demi	NPC	NPC1 : R218Q (homozygote)
R715	1 mois et demi	NPC	NPC2 : C99R (homozygote)
R075	4 mois	NPC	NPC1 : L850P + R958X (hétérozygote)

6.3.1.2.2 Cellules primaires monocytaires humaines

Ces monocytes sont issus de l'interface enrichie en leucocytes sanguins (ou « *buffy coat* ») obtenue auprès de la Croix Rouge Suisse et provenant de poches de sang de volontaires sains (selon Projet P_103 de René Köffel, ayant obtenu l'autorisation du comité d'éthique de la Croix Rouge Suisse). Les monocytes sont obtenus selon le protocole publié (Köffel et al., 2014). Les monocytes primaires sont différenciés en macrophages en milieu RPMI supplémenté avec 10% de SVF décomplémenté, 100U/ml de pénicilline, 100 µg/ml streptomycine, et 75 µg/mL de M-CSF (*Macrophage colony-Stimulating Factor* / Facteur de Stimulation des Colonies de Macrophages) pendant 7 jours à 37°C dans une atmosphère humide avec 5% CO₂.

6.3.2 Produits biologiques :

6.3.2.1 Urines

Les échantillons d'urines ont été obtenus dans le cadre d'une étude clinique qui est décrite plus loin (partie 7.1.1).

Brièvement, la seconde urine du matin a été recueillie puis congelée à -80°C. Après décongélation, le volume d'urine a été mesuré, les urines ont été centrifugées puis analysées puis stockées à -80°C.

6.3.2.2 Lipoprotéines

6.3.2.2.1 Préparation des LDL

Les lipoprotéines de faible densité sont obtenues par ultracentrifugation différentielle, à partir de sang prélevé chez des donneurs sains, par l'établissement français du sang de Lyon. Les LDL sont présentes dans le plasma, il faut donc dans un premier temps isoler le plasma du sang. Le plasma est obtenu par une centrifugation à 900g, pendant 20min, à température ambiante. Les LDL sont ensuite séparées des autres lipoprotéines. Le plasma est ultracentrifugé pendant 18h, à 180 000 g, à 10°C pour éliminer les VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) et

chylomicrons qui forment un anneau par flottaison. Le mélange de LDL+ HDL est recueilli, le volume est mesuré et la densité est ajustée à 1,063 avec du bromure de potassium (KBr) à raison de 85,7 mg de KBr par mL. Après ultracentrifugation pendant 20h, à 180 000g, à 4°C, les LDL flottent et les HDL sédimentent. Les LDL sont récupérées et dialysées toute la nuit, à 4°C, sous agitation dans un tampon Tris contenant 2mM d'EDTA avec un pH de 7,4 (Tris-HCl : 10 mM ; NaCl 150 mM ; pH 7,4). La quantité de protéines des LDL est quantifiée par le réactif de Bradford (partie 6.1), les LDL sont conservées à -80°C.

6.3.2.2.2 Acétylation des LDL

Les LDL sont acétylées par réaction chimique (Basu et al., 1976). Les LDL sont placées dans une solution d'acétate de sodium saturée à raison d'un volume de LDL pour un volume d'acétate de sodium saturé. Pour permettre l'acétylation des LDL, un ajout d'anhydride acétique est réalisé à hauteur de 1,5 fois la masse de protéine, à 4°C, en plusieurs fois soit 1µL=1mg d'anhydride acétique toutes les 10min, les acLDL sont ensuite dialysées pour éliminer l'excédent d'acétate de sodium et d'anhydride acétique dans le tampon Tris-EDTA, toute la nuit à 4°C sous agitation. Les LDL acétylées sont conservées à 4°C, jusqu'à 15 jours avant leur utilisation.

6.3.3 Préparation des liposomes de phosphatidylglycérol

La solution stock de liposomes de di-oléate PG utilisée pour l'incubation des cellules est préparée à la concentration de 4,7mM dans du PBS.

Une quantité de di-oléate PG contenue dans du chloroforme, permettant d'obtenir une concentration finale 4,7mM de liposome de PG, est prélevée et déposée dans un tube en pyrex avec un bouchon avec du téflon, évaporée sous azote puis par dessiccation sous cloche à vide, pendant environ 1h20 à température ambiante. Un volume adéquat de PBS stérile froid est ajouté puis le tube est fermé sous azote. Le tube est ensuite vortexé 5 fois 1min avec 30 sec de pause dans de la glace. Ceci permet la formation de liposomes multilamellaires (MLV). Les MLV vont ensuite subir une étape de sonication pour obtenir des liposomes unilamellaires. La

sonication est réalisée à l'aide du sonicateur Bioblock Scientific VibraCell 75043_750W_20Hz couplé à la sonde CV33 (Sonics and Materials Inc) de diamètre 32 mm. La sonication dure 15min avec des *pulses on* de 5 sec et des *pulses off* de 1sec à 4°C. Les liposomes unilamellaires de di-oléate PG sont ensuite stockés à 4°C pendant 1 semaine maximum.

Chapitre 7 : Protocoles expérimentaux

7.1 Modification de la voie endosomale par des amines cationiques (amiodarone, chloroquine) : étude clinique et *in vitro*

7.1.1 Etude clinique

Le formulaire de consentement éclairé des patients et des volontaires sains (agrément ministériel N° DC2010-117) a été validé, et le recrutement des patients a été établi après évaluation du dossier clinique avec l'équipe médicale des services d'Endocrinologie du Pr Philippe Moulin, et du service de Cardiologie du Dr Cyrille Bergerot des Hôpitaux de Lyon-Est (Rabia et al., 2020).

L'étude a porté sur 24 patients traités avec des doses orales moyennes d'amiodarone de 200g/jour pendant des temps variables, dont 6 patients souffrant de dysthyroïdie due au traitement par l'amiodarone ; 6 patients atteints d'une stéatose hépatique non alcoolique (NASH) permettant d'observer l'impact d'une accumulation de lipides dans le foie sur le BMP urinaire ; et 12 sujets sains.

Les données biologiques et générales des différents sujets se trouvent dans le tableau ci-dessous (tableau 27).

Tableau 27: paramètres biologiques des sujets de l'étude clinique

Données générales		Sujets contrôles	Patients sous amiodarone	Patient NASH
	Nombre	12	24	6
	Age	61 ± 2	71 ± 2	61 ± 7
	Homme/Femme	6/6	10/14	3/3
	Amiodarone : durée moyenne du traitement, dose amiodarone moyenne		5-12 mois ; 200g	
	Cardiomyopathie		15	
	Dysthyroïdie		6	
	Hypothyroïdie		4	
Hyperthyroïdie		2		
Données biologiques	Créatinine urinaire (mmol/L)	9,2 ± 1,9	7,4 ± 0,8	9,3 ± 1,9
	IMC (kg/m ²)		27 ± 1	39 ± 1,9
	AST plasmatique (UI/L)		40 ± 13	36 ± 7
	ALT plasmatique (UI/L)		50 ± 23	43 ± 11
	HbA1c plasmatique (%)		6,9 ± 0,3	7,6 ± 0,4
	HDL plasmatiques (g/L)		0,45 ± 0,04	0,34 ± 0,05
	LDL plasmatiques (g/L)		0,97 ± 0,09	1 ± 0,2

7.1.2 Etude *in vitro* (culture cellulaire)

La modification du compartiment endosomal *in vitro* a été réalisée sur des macrophages RAW 264.7, deux agents pharmacologiques connus pour provoquer des phospholipidoses ont été utilisés : l'amiodarone et la chloroquine.

Pour étudier la production des EV, les cellules sont cultivées dans des flasques de culture de 150cm². Le jour J un million de cellules sontensemencées par flasque, dans leur milieu habituel (10% SVF). A J+3 le milieu est changé par des milieux contenant les stimuli (tableau 28). Après 24h de stimulation, le surnageant est retiré et les cellules sont lavées comme précédemment. Puis, 25 mL de milieu « EV free » sont ajoutés et les cellules sont mises à sécréter pendant 48h en maintenant la chloroquine et l'amiodarone. Puis les milieux de culture (pour analyser les EV) et les cellules sont recueillis.

Pour réaliser ces expériences les volumes de surnageants utilisés sont de 200 mL (équivalent à 8 flasques de cultures)

Tableau 28: concentration et milieu des différentes conditions pour les expériences de perturbation de la voie endosomale par des amines cationiques.

Stimuli	Concentration Finale
Amiodarone	5µM
Chloroquine	5µM
Stimuli	Milieu de stimulation
Contrôle	Milieu MEM 1% SVF + 1% NEAA + antibiotiques
Amiodarone	Milieu MEM 10% SVF + 1% NEAA + antibiotiques + 5µM amiodarone
Chloroquine	Milieu MEM 10% SVF + 1% NEAA + antibiotiques + 5µM chloroquine

7.2 Modification de la voie endosomale par surcharge en cholestérol induite par les lipoprotéines et incubation en présence de liposomes de PG : étude *in vitro* (culture cellulaire)

Ces expériences utilisent le même protocole que précédemment. Les différents stimuli utilisés sont indiqués dans le tableau ci-dessous (tableau 29).

Tableau 29 : concentration et milieu des différentes conditions pour les expériences de surcharge en cholestérol

Stimuli	Concentration Finale
LDL acétylées	50µg/mL
U18666A	0,1µg/mL
di-oléate PG	30µM
Stimuli	Milieu de stimulation
Contrôle	Milieu MEM 1% SVF + 1% NEAA + antibiotiques
LDL acétylées	Milieu MEM 1% SVF + 1% NEAA + antibiotiques + 50µg/mL de LDL acétylées
LDL acétylées + U18666A	Milieu MEM 1% SVF + 1% NEAA + antibiotiques + 50µg/mL de LDL acétylées + 0,1µg/mL U18666A
LDL acétylées + PG	Milieu MEM 1% SVF + 1% NEAA + antibiotiques + 50µg/mL de LDL acétylées + 30µM de di oléate PG
PG	Milieu MEM 1%, SVF + 1% NEAA + antibiotiques + 30µM de di oléate PG

7.3 Modification de la voie endosomale par maladie génétique NPC : étude *in vitro*

Afin d'étudier la production des EV, les cellules de fibroblastes sont cultivées dans des flasques de culture de 150cm². Le jour J, trois millions de cellules sontensemencées par flasque dans leur milieu habituel (20% SVF). A J+4, les cellules sont mises à sécréter pendant 48h dans leur milieu « EV free » après deux lavages par du milieu Ham F10 sans sérum. Puis les milieux de culture (pour analyser les EV) et les cellules sont recueillis.

Pour réaliser ces expériences, les volumes de surnageant utilisés sont compris entre 200-800mL (équivalent à 8-32 flasques)

Chapitre 8 : Isolement des vésicules extracellulaires

8.1.1 Matériel utilisé

Tableau 30 : liste du matériel utilisé pour l'isolement des vésicules extracellulaires

Matériels	Utilisation
Centrifugeuse 5804R Eppendorf (rotor S-4-72 /FA 34-6-38/FA 45-30-11)	Toutes les centrifugations jusqu'à 10 000g
Ultracentrifugeuse Ultra Beckman CO-LE80K (rotor 50.2 Ti)	Purification EV et préparation milieu « EV free »
Ultracentrifugeuse Optima TL Ultracentrifuge Beckman (rotor TLA 100.3/100.2)	Purification EV après ultrafiltration
Ultracentrifugeuse Optima XE-90 Beckman Coulter (rotor SW 41 Ti)	Gradient de sucrose
Tube Amicon cut off 100 kDa (Sigma ref UFC 9100/24)	Ultrafiltration
Lecteur de plaque : Multiscan Go (Thermo scientific)	Lecture absorbance dosage protéines

8.1.2 Préparation de milieu de culture avec sérum sans vésicule extracellulaire contaminante: « milieu EV Free »

Pour l'analyse des vésicules extracellulaires (EV) sécrétées par les cellules nécessitant un milieu contenant du sérum, il faut éliminer les possibles vésicules extracellulaires présentes dans le sérum de veau (Aswad et al., 2016; Gardiner et al., 2016; Théry et al., 2006). Les cellules sont donc mises dans un milieu appauvri en vésicules extracellulaires contaminantes (*EV free*) lors de la sécrétion. Ce milieu est préparé par ultracentrifugation. Nous détaillons la méthode utilisée pour le milieu des cellules RAW.

Du milieu MEM supplémenté avec 20% de sérum de veau fœtal décomplémenté, 1% de NEAA et de 1% P/S, est centrifugé pendant 18h, à 4°C, à 100 000g. Cette centrifugation permet d'éliminer les EV présentes dans le SVF. La phase supérieure du surnageant est récupérée (figure 34), puis filtrée à 0,22 µm permettant sa stérilisation, puis stockée à -20°C. Pour l'utiliser lors de la sécrétion des cellules, le milieu est dilué au demi en utilisant un milieu MEM sans sérum complémenté avec 1% de NEAA et 1% P/S.

Pour les cellules HEK293, le milieu utilisé est le DMEM.

Pour les fibroblastes, on utilise du milieu HAM F10 avec 20% SVF. Pour la sécrétion, le milieu n'est pas dilué, mais du CaCl₂ (2 mM final) est ajouté dans le milieu de culture juste avant la mise en sécrétion des cellules.

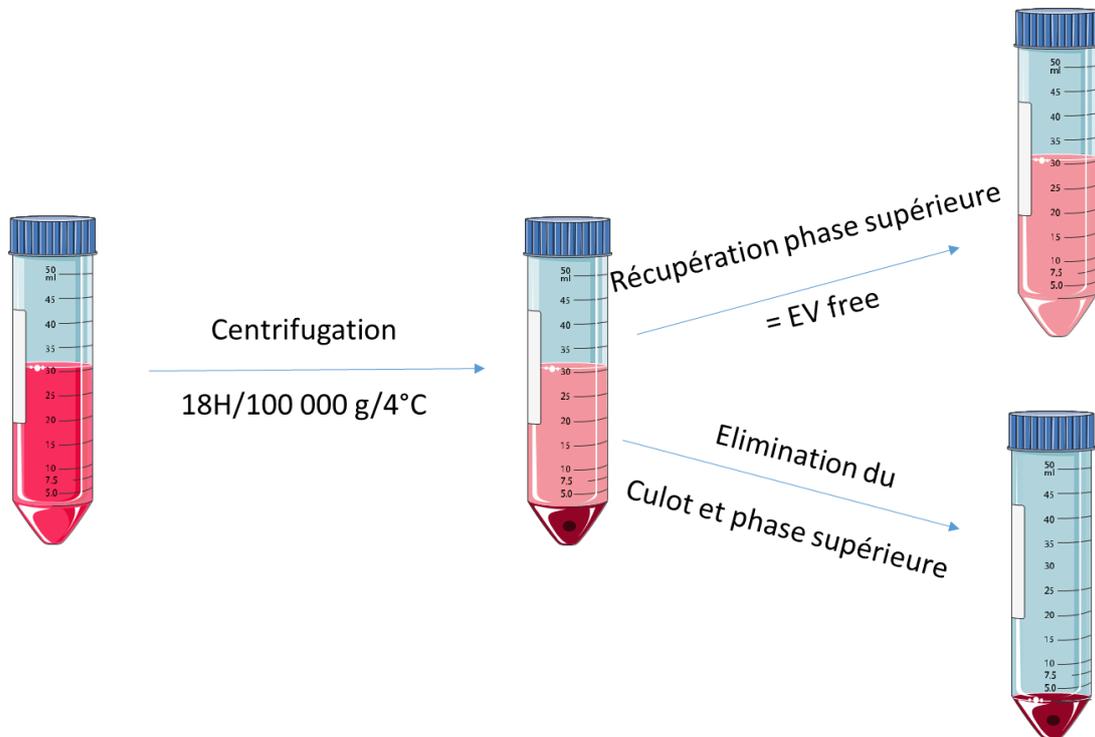


Figure 34 : schéma de la préparation du milieu EV free

8.1.3 Purification des vésicules extracellulaires par centrifugation différentielle et ultracentrifugation : gold standard / méthode de base

La méthode de base utilisée est une centrifugation différentielle suivie de 2 ultracentrifugations (figure 35).

Une centrifugation préalable du surnageant de culture à 200g pendant 15min à température ambiante, peut être nécessaire pour éliminer des cellules flottantes. C'est le cas des cellules RAW 264.7 par exemple. Cette centrifugation permet d'éliminer les cellules non adhérentes (vivantes) sans les dégrader. Ensuite le surnageant est centrifugé à 2 000g pendant 20 min à 4°C, pour éliminer les possibles cellules mortes et gros débris cellulaires. Le culot est éliminé et le surnageant est ensuite centrifugé à 10 000g pendant 30 min à 4°C, afin d'éliminer

les gros corps apoptotiques. Le surnageant est collecté et filtré à 0,2 μm pour enlever toutes les vésicules de taille supérieure à 200 nm et stériliser les échantillons. Ce surnageant filtré est ensuite congelé à -20°C (H. Zhou et al., 2006). Ultérieurement, ce surnageant filtré est décongelé puis ultracentrifugé pendant 90 min à 100 000g à 4°C , pour culoter les vésicules extracellulaires. Après élimination du surnageant, le culot est repris par du PBS stérile à 4°C . S'il y a plusieurs tubes, les culots lavés sont ensuite poolés dans 24 mL de PBS. Ce pool est ensuite de nouveau ultracentrifugé à 100 000g pendant 90 min à 4°C pour pouvoir éliminer le plus de contaminants. Le surnageant est éliminé et le culot est repris par du PBS stérile à 4°C par le plus petit volume possible. Les échantillons d'EV sont ensuite stockés à 4, -20 ou -80°C en fonction des analyses à effectuer.

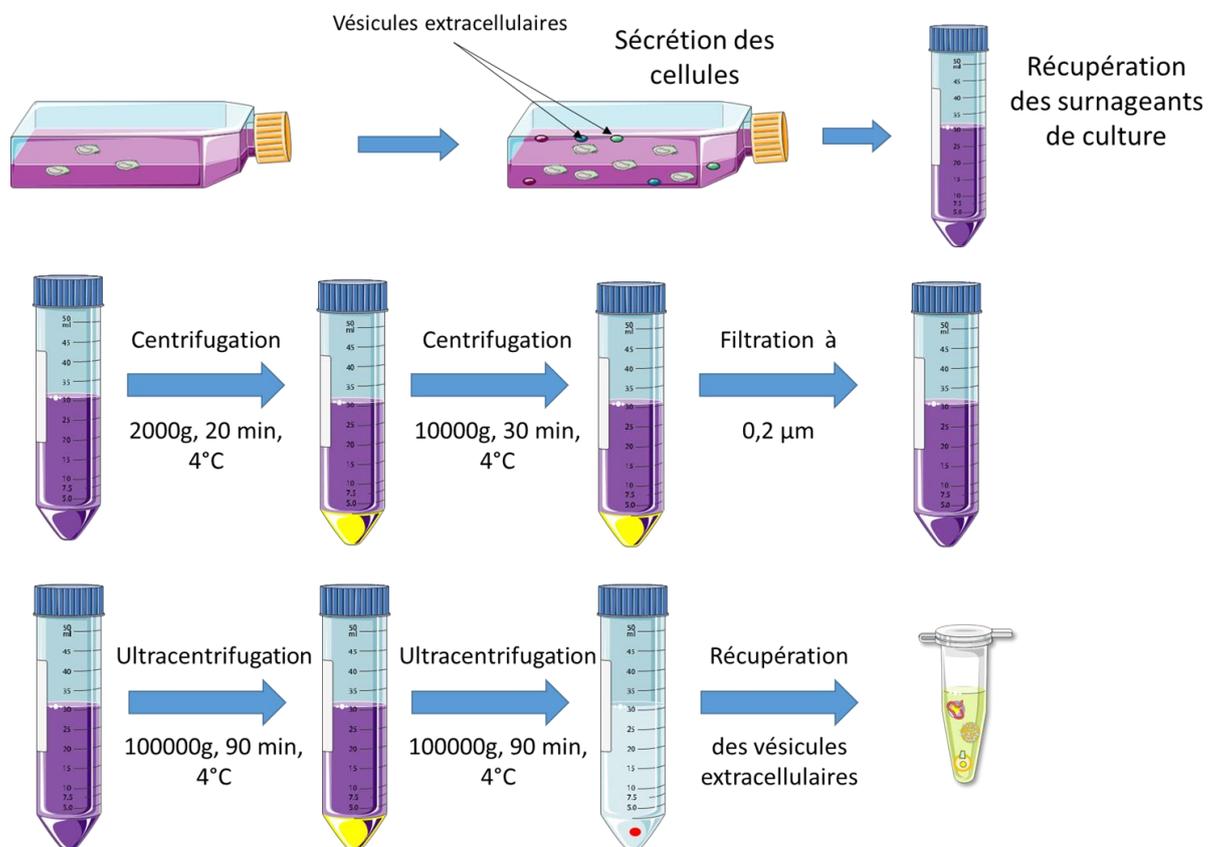


Figure 35: schéma de la purification des EV secrétées par des cellules par la méthode de base (ajout possible d'une pré-centrifugation à 200g, 15 min à RT pour éliminer les cellules flottantes)

- a) L'isolement des EV par cette technique est réalisée avec un volume de surnageant de culture cellulaire compris entre 200 et 900mL en fonction du type cellulaire et des expériences réalisées.

b) Dans les cas des échantillons d'urines, la méthode standard décrite précédemment est utilisée mais une étape est rajoutée pour éliminer l'uromoduline (protéine THM / *Tamm-Horsfall protein*)

L'isolement des EV est réalisé à partir de 50mL d'urines (figure 36). Le surnageant 10 000g est récupéré puis stocké à 4°C. Le culot est récupéré puis resuspendu avec du PBS contenant du DTT dithiothreitol à une concentration finale de 200mg/mL. Le mélange est maintenu à 37°C pendant 10 min et vortexé tous les 2min pendant 30sec. Cette étape permet de dénaturer l'uromoduline et de libérer les vésicules extracellulaires qui y sont accrochées (Fernández-Llama et al., 2010; Merchant et al., 2017). Le culot est resuspendu par du PBS stérile, puis centrifugé pendant 30 min à 10 000g, 4°C. Le surnageant est récupéré puis ajouté au surnageant précédent (centrifugé à 10 000 g). Le surnageant 10 000g total (surnageant+culot resuspendu) est filtré à 0,2µm. Les surnageants sont ensuite congelés à -20°C (H. Zhou et al., 2006). La suite est identique à la méthode de base (partie 8.1.2).

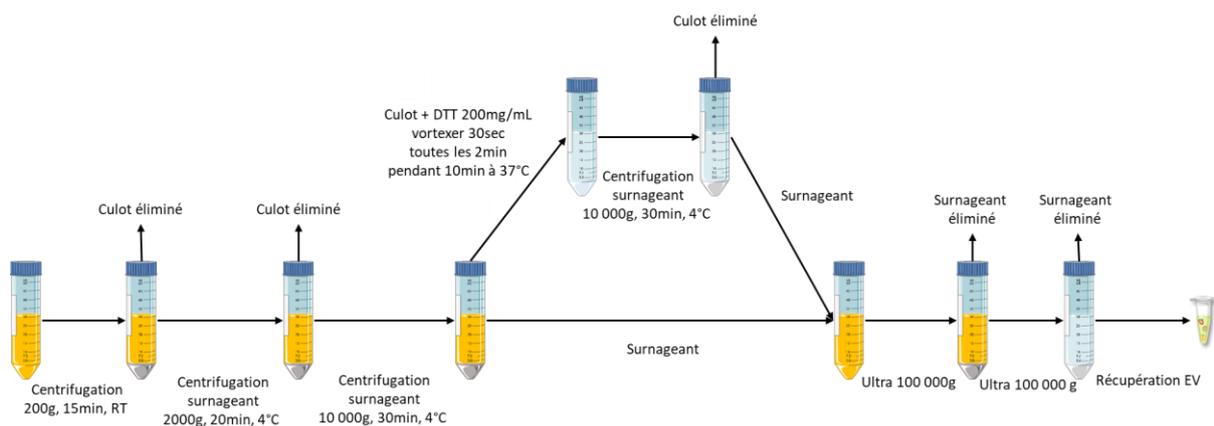


Figure 36: schéma de la purification des EV dans des urines

8.1.4 Purification de vésicules extracellulaires par ultracentrifugation avec d'un gradient de sucrose

La purification par gradient de densité des EV est réalisée avec un volume de surnageant de culture cellulaire compris entre 800 mL à 900mL en fonction du type cellulaire et des expériences réalisées (figure 37).

Cette technique permet de séparer les vésicules extracellulaires en fonction de leur densité. Le gradient de sucrose est utilisé à la suite de l'isolement des vésicules extracellulaires par centrifugation différentielle (partie 8.1.4). Pour réaliser ce gradient, il faut au préalable préparer extemporanément les différentes solutions de sucrose permettant d'obtenir les couches du gradient de densité différentes. Le gradient est constitué de 12 couches, exprimées en pourcentage poids:volume (% w/v) de sucrose dans la solution : 0% (l'échantillon), 10, 16, 22, 28, 34, 40, 46, 52, 58, 64, 70%. Voici le calcul permettant de réaliser une des couches du gradient, il faut ensuite réadapter ce calcul en fonction du pourcentage de sucrose de la couche.

Pour une solution de 15 mL à 34 % de sucrose :
$$\frac{34 \text{ g} \times 15 \text{ mL}}{100 \text{ mL}} = 5,1 \text{ g de sucrose pesé.}$$

Pour préparer les solutions au pourcentage de sucrose élevé (> 40%), il faut chauffer le PBS pour permettre une solubilisation plus rapide et homogène du sucrose. Les solutions sont stockées à température ambiante pour éviter la précipitation du sucrose. Les solutions sont préparées la veille de leur utilisation pour éviter la croissance de microorganismes pour les fractions ayant une faible concentration de sucrose.

Le gradient est réalisé en tube d'ultracentrifugation de volume maximum 13,8ml. On dépose au fond du tube 1mL de la solution à 70%, puis on dépose délicatement au-dessus 1mL de la solution à 64% et ainsi de suite pour chaque solution jusqu'à la solution 10%. Une fois toutes les couches réalisées, la totalité de l'échantillon d'EV (volume maximum 1,3ml) est déposé.

Ce gradient est ensuite ultracentrifugé pendant 18h à 4°C à 120 000g. La centrifugation commence à température ambiante pour éviter de précipiter le sucrose.

Les différentes couches sont ensuite prélevées : 12 fractions de 1ml sont récupérées (tableau 31).

Tableau 31: liste des pourcentages des différentes couches du gradient de sucrose

Fractions	Pourcentage en sucrose (%)
1	0-10
2	16
3	22
4	28
5	34
6	40
7	46
8	52
9	58
10	64
11	70
12	Culot

La fraction numéro 12 va être obtenue en récupérant le culot par du PBS stérile à 4°C. Chaque fraction va être ultracentrifugée pendant 1h30 à 100 000g, 4°C dans 24mL de PBS pour éliminer le sucrose du gradient. Le surnageant est éliminé, le culot lui est repris par du PBS stérile à 4°C par le plus petit volume possible. Les échantillons d'EV sont ensuite stockés à 4, -20 ou -80°C en fonction des analyses à effectuer.

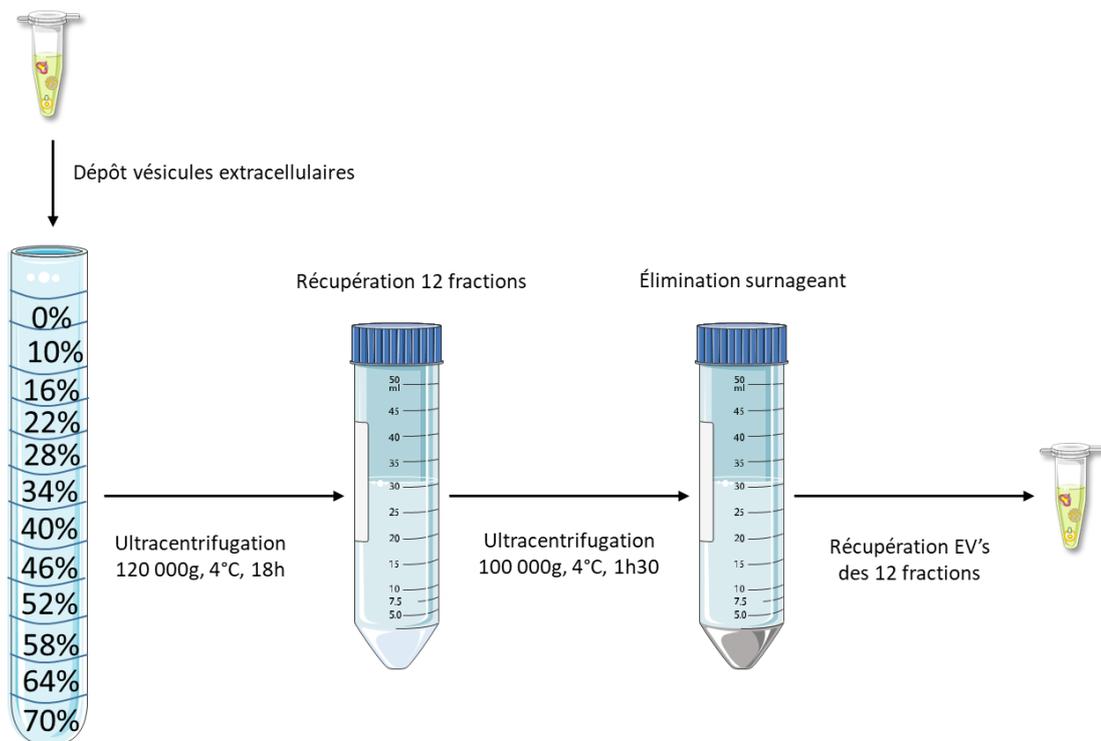


Figure 37: purification par gradient de sucrose d'EV secrétées par des cellules

8.1.5 Purification de vésicules extracellulaires par ultracentrifugation après une ultrafiltration (UF-UC)

L'isolement des EV est réalisée avec un volume de surnageant de culture cellulaire compris entre 200 et 900 mL en fonction du type cellulaire et des expériences réalisées (figure 38).

L'ultrafiltration préalable permet de concentrer les échantillons et donc de diminuer les volumes à centrifuger ultérieurement.

Les premières étapes sont identiques à la méthode de base. Le surnageant 10 000g filtré est décongelé rapidement puis il est ultrafiltré. Pour l'ultrafiltration, 3 x 15mL de surnageant sont introduits successivement dans un tube Amicon 100kDa, puis centrifugé 30min à 3 000g à 10°C. Le filtrat est éliminé. Les tubes Amicon sont réutilisés 3 fois, ce qui permet de centrifuger et concentrer 45mL de surnageant de culture par tube.

Les surnageants concentrés seront nommés « concentrats ». Les concentrats obtenus sont ensuite dilués au demi avec du PBS stérile avant de les ultracentrifuger pendant 1h30 à 100 000g à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est repris par 1 ml de PBS puis ultracentrifugé pendant 1h30 à 100 000g à 4°C. Le surnageant est éliminé, le culot lui est repris par le plus petit volume possible de PBS stérile. Enfin, les échantillons sont stockés à 4, -20 ou -80°C en fonction des analyses à réaliser.

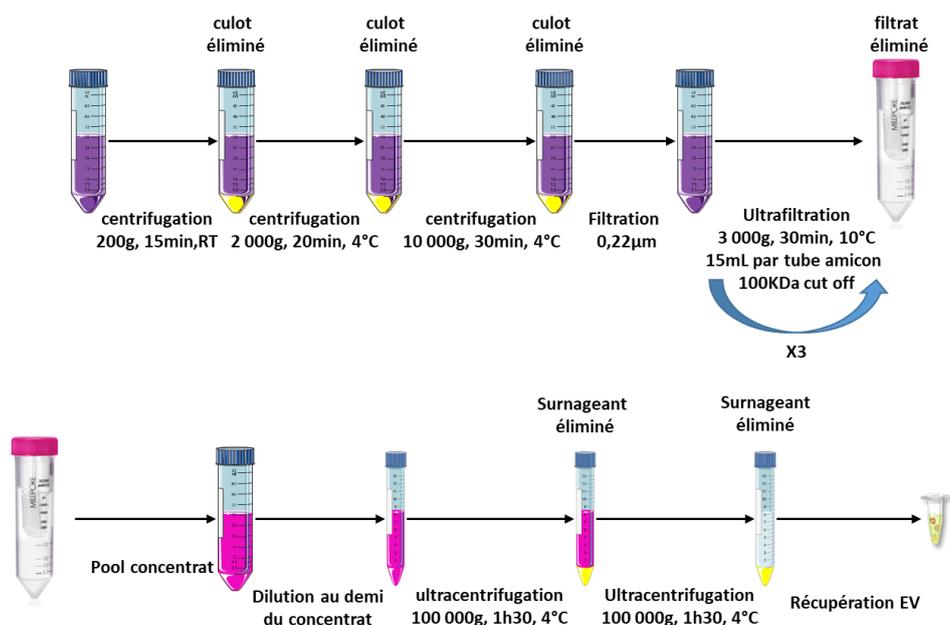


Figure 38: schéma de la purification d'EV secrétées par des cellules par ultrafiltration suivis d'ultracentrifugation

8.1.6 Purification de vésicules extracellulaires secrétées par des cellules par ultrafiltration suivie d'une chromatographie d'exclusion (UF-SEC)

L'isolement des EV par ultrafiltration suivie d'une chromatographie d'exclusion est réalisée avec un volume de surnageant compris entre 200 et 900mL, en fonction du type cellulaire et des expériences réalisées (figure 39).

Cette technique sépare les vésicules extracellulaires en fonction de leur taille permettant d'obtenir des fractions riches en exosomes avec le moins de contaminant possible (<https://store.izon.com/collections/qev/products/qevoriginal-35nm-5-pack>).

Pour la chromatographie d'exclusion, on utilise des colonnes « izon qEV original 35nm+ » (<https://store.izon.com/collections/qev/products/qevoriginal-35nm-5-pack>) qui permettent de séparer et récolter spécifiquement des vésicules extracellulaires ayant une taille comprise entre 35-350nm.

Brièvement, la chromatographie d'exclusion sépare les constituants de l'échantillon en fonction de leur taille. La colonne est remplie de billes poreuses, avec des pores de tailles définies en fonction de la taille des constituants (protéines, vésicules extracellulaires...) à isoler. Plus le constituant sera petit, plus il sera retenu sur la colonne, et inversement, plus le constituant aura une taille élevée moins il sera retenu par la colonne.

La colonne qEV originale, est activée en suivant le protocole fourni par le fabricant (volume de la colonne : 10mL, type de résine : polysaccharide, taille des pores de la colonne : 35nm, séparation optimale des vésicules de taille comprise entre 35 et 350 nm). Nous utilisons comme phase mobile (éluant) du PBS stérile à température ambiante pour éviter la cristallisation de la colonne.

Les premières étapes sont identiques à la méthode de base. Le surnageant 10 000g filtré est décongelé rapidement puis il est ultrafiltré. On dépose 500µL à 1mL de concentrat sur la colonne. Une fois que l'échantillon a pénétré dans la colonne, on ajoute petit à petit du PBS jusqu'à l'obtention de toutes les fractions souhaitées. 22 fractions sont obtenues :

- Les fractions 1-16 ont un volume d'environ 500µL,
- Les fractions 17-22 ont un volume d'environ 1mL.

Les 6 premières fractions correspondent au volume mort de la colonne et permettent de vérifier la qualité de la colonne puisque nous ne devons retrouver aucune protéine ou lipide. En fonction des échantillons, les fractions 7-16 peuvent contenir les exosomes (vésicules extracellulaires d'intérêt).

Une fois les 22 fractions obtenues, une étape de concentration est réalisée pour les fractions 7 à 16. En effet, bien que la chromatographie d'exclusion soit très puissante, elle dilue l'échantillon. L'échantillon de départ mesure entre 500µL et 1mL et le volume total des fractions d'intérêt est de 5mL. Pour cela, on utilise des tube SPIN-X UF 500 Corning 5kDa (référence : 431481) qui vont retenir les vésicules extracellulaires, et diminuer le volume permettant de concentrer les échantillons pour les analyses suivantes. Les fractions 7-16 sont centrifugées à 10 000g à 10°C jusqu'à obtenir un volume le plus faible possible (temps de centrifugation de 30-45min). Puis, les volumes des fractions concentrées sont ajustés à la fraction concentrée ayant le plus grand volume avec du PBS stérile. Enfin, les fractions sont stockées à 4, -20 ou -80°C en fonction des analyses à réaliser.

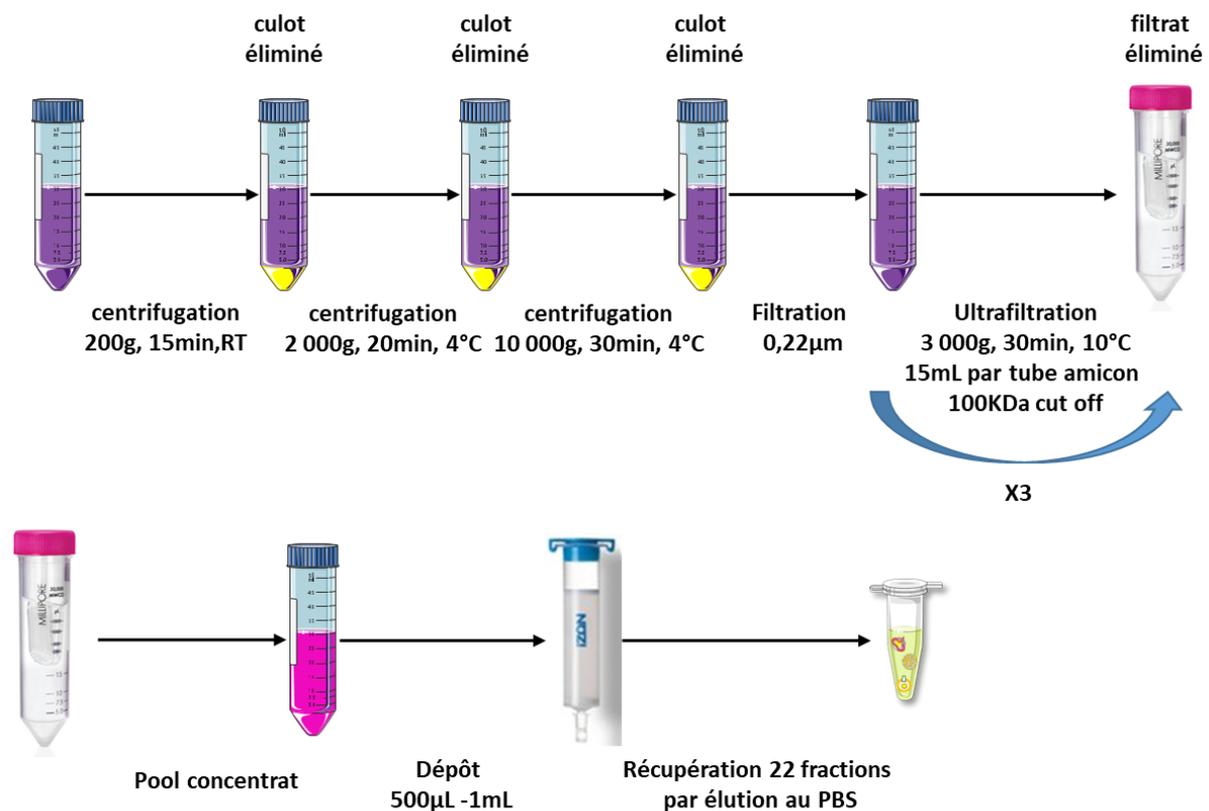


Figure 39: schéma de la purification de vésicules extracellulaires secrétées par des cellules par ultrafiltration suivie d'une chromatographie d'exclusion

Chapitre 9 : Analyses lipidiques

9.1 Extraction des lipides totaux

9.1.1 BMP-PG

L'extraction lipidique du BMP et du PG est réalisée en utilisant une variante de la méthode de Bligh et Dyer en condition acide (Bligh & Dyer, 1959; Kobayashi et al., 2002). Cette extraction permet d'isoler les lipides totaux par une extraction liquide/liquide (figure 41).

Les extractions sont réalisées dans des tubes en pyrex avec des bouchons contenant du téflon, préalablement lavés avec un mélange méthanol/chloroforme v/v, puis séchés à l'air libre.

Le mélange réactionnel est constitué de méthanol, de chloroforme, d'hydroxytoluène butylé (BHT), de l'échantillon, de standard interne, d'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA), de chlorure de sodium (NaCl) et d'acide chlorhydrique (HCl).

Le méthanol et le chloroforme permettent d'extraire les lipides totaux. Le BHT est un anti oxydant. Un mélange de standard interne est utilisé. Il est composé de di-myristate BMP et de di-myristate PG (concentration finale : 120 pmol (urines/cellules), 30pmol EV (cellule et urines)). L'EDTA est un chélateur du calcium mais aussi de différents cations. Il inhibe les phospholipases dépendantes du calcium ou bien d'ions métalliques comme le magnésium. Le NaCl évite l'émulsion due aux caractéristiques amphiphiles des phospholipides et protéines présentes dans l'échantillon. L'HCl va permettre quant à lui de diminuer le pH et donc de neutraliser les phospholipides anioniques comme le BMP, facilitant leur extraction.

L'extraction s'effectue en plusieurs étapes, dans un premier temps dans un tube 1 μ L de standard interne [et 16 μ L d'EDTA (2mM final) *dans le cas du blanc réactif*], 2mL de chloroforme, 4mL de méthanol, 1,6mL d'échantillon (si l'échantillon fait moins de 1,6mL, il est complété avec de l'EDTA à 2mM jusqu'à 1,6mL), 50 μ L de BHT (25 μ M final), sont introduits dans un tube (volumes pour 1 seul tube ; possibilité de préparer des mélanges d'extraction). Le mélange est vortexé pendant 1 min puis laissé 30 min le temps que l'extraction s'effectue (rapport chloroforme:méthanol:eau v:v:v 1:2:0,8). 2 ml d'un mélange NaCl/HCl (154mM/25mM), et 2 mL de chloroforme sont ajoutés. Le mélange est homogénéisé pendant 1min, puis centrifugé pendant 15min à 1 000g, 4°C, pour accélérer la séparation des 2 phases :

phase chloroformique inférieure et phase aqueuse méthanolique supérieure. La phase chloroformique contenant les lipides est récupérée, puis évaporée à sec sous azote.

Le résidu sec est stocké à -20°C ou bien repris par du méthanol puis transvasé dans un tube en verre (100 μL pour les échantillons d'urine, de cellule, et 30 μL pour les échantillons d'EV) pour être analysé en RP-HPLC-MS/MS (chromatographie liquide à haute performance en phase inverse couplée à un spectromètre de masse en tandem).

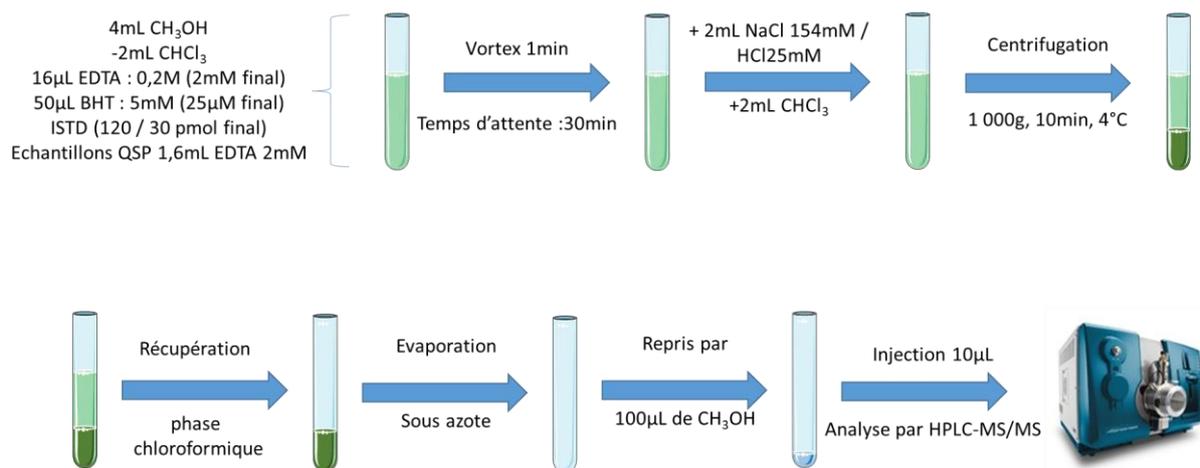


Figure 41: schéma d'extraction du BMP et du PG

9.1.2 Cholestérol-Phospholipides

L'extraction et le dosage des lipides neutres (cholestérol, ester de cholestérol et triglycérides) et des autres phospholipides (céramides, sphingolipides, phosphatidylcholines, phosphatidyléthanolamines, phosphatidylsérines, phosphatidylinositols) est réalisée par la plateforme de lipidomique de Toulouse : MetaToul-MetaboHUB.

L'extraction des lipides neutres et des phospholipides est réalisée en une fois en utilisant une variante de la méthode de Bligh et Dyer en condition acide (Bligh & Dyer, 1959). Les standards utilisés sont les suivants (concentration finale ajoutée par échantillon):

- Céramide (Cer): Cer d18:1 / C12:0 (20ng)
- Sphingolipide (SM): SM d18:1 / C12:0 (20ng)
- Phosphatidylcholine (PC): PC diC13:0 (16ng)
- Phosphatidyléthanolamine (PE): PE diC12:0 (180ng)
- Phosphatidylsérine (PS): PS diC12:0 (20ng)

- Phosphatidylinositol (PI): PI C14:1 / C17:0 (30ng)
- Cholestérol: stigmastérol (6μg)
- Ester de cholestérol: cholestérol C17:0 (6μg)
- Triglycérides (TG): TG triC19:0 (16μg)

Dans un tube en pyrex avec un bouchon contenant du téflon préalablement lavé, on introduit 100μL du mélange des standards des lipides neutres (contenu dans du dichlorométhane (CH₂Cl₂)), 40μL du mélange des standards des phospholipides (contenu dans méthanol (CH₃OH) (40μL)), et l'échantillon contenu dans une solution aqueuse (PBS, milieu de culture) (cellules : 1mL, surnageant de culture : 2mL, EV : 30μL). Ensuite, le volume de méthanol, de dichlorométhane et d'eau sont ramenés respectivement à 2,5mL pour le méthanol (contenant 2% acide acétique) et le dichlorométhane et 2mL pour l'eau, 100μl d'une solution de NaCl saturée est ajoutée pour éviter l'émulsion. Les échantillons sont centrifugés 6 min à 1000 g à 4°C, puis la phase inférieure (dichlorométhane) est récupérée puis évaporée sous azote. Enfin les échantillons sont utilisés immédiatement ou bien congelés à -20°C. Pour être analysés, les échantillons sont repris par 160 μL d'acétate d'éthyle puis 80μl sont transférés dans deux tubes pour ensuite être analysés (un tube pour les lipides neutres et un tube pour les phospholipides). La suite de l'analyse sera expliquée plus tard dans la partie dosage lipidique.

9.2 Analyse par HPTLC

La chromatographie sur couche mince (CCM) permet de séparer des molécules selon leur affinité entre une phase stationnaire et une phase mobile. Les échantillons et standards de migration sont déposés à 1cm du bord de la plaque HPTLC (référence : Merk : 1.05631.0001). Les standards utilisés sont des standards de lipides différents et à des concentrations différentes en fonction des échantillons analysés. La CCM est réalisée en deux temps, une première est réalisée avec un solvant composé de méthanol, chloroforme, et d'ammoniaque avec un rapport v/v de 65:35:5. Le solvant de la deuxième CCM est composé d'hexane, diéthyl ether et d'acide acétique avec un rapport v/v de 80:20:2. Les lipides sont ensuite révélés par la primuline (réf : sigma Aldrich : 206865), la primuline peut être observée après excitation à 365nm.

Les stérols sont révélés par un mélange de FeCl₃ :H₂SO₄ :CH₃COOH, chauffé pendant 5min à 100°C.

9.3 Analyse par LC-MS/MS

9.3.1 BMP-PG

Le dosage du BMP et du PG a été réalisé à la Plateforme de lipidomique fonctionnelle de l'INSA. Le dosage du BMP et du PG est réalisé par RP-HPLC-MS/MS. La colonne utilisée est une Acquity UPLC^R BEH C18 column (Waters). L'HPLC utilisée est un système Shimadzu LC-30AD Nexera et le spectromètre de masse est un QTRAP 4500 System^f de chez Sciex. La source d'ionisation utilisée est une source électrospray (ESI) utilisée en mode positive. L'acquisition des données s'effectue en MRM (*Multiple Reaction Monitoring*).

L'HPLC est réalisée à 60°C avec un gradient de deux solvants. Le solvant A est un solvant aqueux composé d'eau désionisée ultrapure (99,9%), d'acide formique (0,1% v/v) et de formate d'ammonium (5mM). Le solvant B est un solvant organique composé de méthanol (69,9%), d'acétonitrile (30%), d'acide formique (0,1%) et de formate d'ammonium (5mM). L'analyse dure entre 35 et 50 minutes en fonction du gradient utilisé. En effet, une modification du gradient pour accélérer les analyses a été réalisée pour les dernières analyses. Cette modification ne change en rien les données obtenues. Le débit du gradient d'élution est de 0,5 mL.min⁻¹.

L'utilisation de la RP-HPLC avant l'analyse en spectrométrie de masse permet de séparer d'une part le BMP de son isomère, le PG, ainsi que d'autre part les différentes espèces moléculaires du BMP et du PG.

La spectrométrie de masse en tandem a pour paramètres :

- Potentiel de dépolarisation DP : 101 V pour BMP; 96 V pour PG
- Energie de collision CE : 41 V pour BMP; 37 V pour PG
- Potentiel de sortie de la cellule de collision CXP : 10 V;
- Température de la source : 350 °C

Le BMP et le PG vont être fragmentés lors de l'analyse de manière différente permettant ainsi une deuxième séparation. La fragmentation aura lieu dans les 2 cas au niveau des liaisons phosphodiester entre le phosphate et l'un des deux glycérols. Dans le cas du BMP, on aura la formation de 2 MAG (monoacylglycérol), dans le cas du PG un DAG sera formé

(diacylglycérol) (figure 42). Cette méthode d'analyse a une réponse linéaire pour les standards saturés et monoinsaturés pour des concentrations en BMP et PG de 0 à 100pmol. Pour indication, cette méthode nous permet de quantifier des quantités minimums de 0,3pmol de BMP/mL d'urine par exemple.

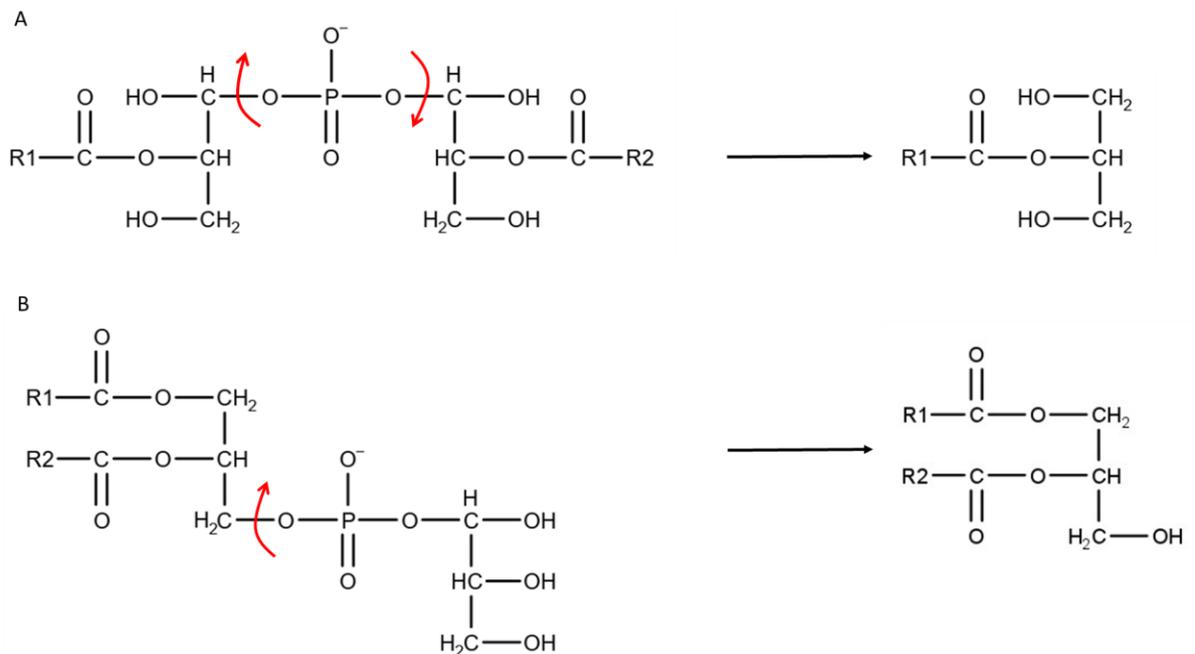


Figure 42: fragmentation du BMP et du PG; A : fragmentation du BMP en deux MAG; B : fragmentation du PG en un DAG

9.3.2 Phospholipides

Les tubes contenant les extraits pour le dosage des phospholipides sont évaporés puis repris par 50µL de méthanol. Les échantillons sont analysés par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem. L'HPLC utilisée est une infinity 1290 de chez Agilent et le spectromètre de masse est un triple quadripôle G6460 de chez Agilent. La colonne de chromatographie utilisée est une HILIC de chez Phenomenex. C'est une colonne hydrophile, de 5cm de long avec un diamètre externe de 4,6mm et un diamètre interne de 2,6µm. La phase mobile est composée de deux solvants : solvant A composé d'acétonitrile ; solvant B composé d'eau ultrapure à pH 3,2 et formate d'ammonium. L'analyse s'effectue à un débit de la phase mobile de 0,3mL.min⁻¹ et à une température de 40°C. Le volume d'injection est compris entre 2 à 10µL. La source d'ionisation est une électrospray (ESI) en mode négative. L'acquisition des données s'effectue en SRM soit en *Single Reaction Monitoring*.

9.3.3 Analyse des lipides neutres

Les tubes contenant les extraits pour le dosage des lipides neutres sont évaporés sous azote puis repris par 20 μ L d'acétate d'éthyle. Les échantillons sont analysés par chromatographie gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID). La GC-FID utilisée est une Focus GC Finnigan (Thermo Scientific). La colonne utilisée est une Zebron ZB-5MS (Phenomex), ayant une longueur de 5m, un diamètre externe de 0,25mm et un diamètre interne de 0,25 μ m. Le gaz vecteur est l'hydrogène avec un débit de 3mL.min⁻¹. L'analyse s'effectue sur 1 μ L d'échantillon, le gradient de température est de 225°C jusqu'à 350°C avec un incrément de 5°C/min. Le temps de l'analyse est de 35min.

Chapitre 10 : Analyse des protéines

10.1 Dosage des protéines

Pour la quantification des protéines, deux types de dosages sont utilisés. Pour les échantillons d'urines ou contenant une très grande quantité de rouge de phénol, le dosage par la méthode de Bradford est utilisé (Bradford, 1976). Pour résumer, 10 μ L d'un échantillon sont analysés pour 200 μ L du réactif de Bradford (réactif de Bradford, Sigma-Aldrich réf référence : B6916). Le mélange est ensuite incubé pendant 5 min à température ambiante, à l'abri de la lumière. Puis l'absorbance des échantillons est analysée à 595 nm.

Pour les échantillons contenant peu de rouge de phénol ou ayant une plus faible quantité de protéines, le kit de dosage de protéine PierceTM BCATM de ThermoFisher (référence : 23227) est utilisé. Brièvement, 10 μ L d'un échantillon sont analysés pour 200 μ L du réactif de Pierce dans les proportions 50/1 de solution A et de solution B, puis le mélange est incubé pendant 30min à 37°C, puis l'absorbance est mesurée à 562nm.

Pour chaque dosage, une courbe d'étalonnage est réalisée avec de l'albumine sérique bovine.

10.2 Analyse par western blot

10.2.1 Principe

Le Western blot est une technique permettant d'analyser des protéines d'intérêt.

Brièvement, des protéines dénaturées ou non par le réactif de Laemmli (Tris HCl, Glycérol, SDS, β -mercaptoethanol-bleu de bromophénol) et la chaleur vont migrer dans un gel d'acrylamide en présence d'un tampon alcalin supérieur au pHi moyen des protéines qui seront donc chargées négativement. Dans le cas des protéines dénaturées, les protéines migrent en fonction de leurs poids, alors que pour les protéines non dénaturées elles migreront en fonction de leurs tailles/ formes. Une fois la migration terminée, les protéines sont transférées sur une membrane, généralement de la nitrocellulose ou de PVDF (Polyfluorure de vinyldène/*PolyVinylidene Fluoride*) pour ensuite être révélées en utilisant un anticorps spécifique. Enfin, un anticorps secondaire, couplé à une enzyme permettant de produire un photon comme la luciférase par exemple, reconnaît le premier anticorps, permettant de visualiser la présence de la protéine d'intérêt mais aussi de réaliser une quantification relative.

10.2.2 Réactifs

Tableau 32: liste des réactifs pour le Western Blot

Réactifs	Concentrations finales
Laemmli	Tris HCl : 30mM / glycérol : 6% / SDS : 0,5% / β - mercaptoethanol : 2% - bleu de bromophenol : 0,005%
Solution 1 (séparation)	Tris HCl : 375 mM / SDS : 0,1 % / pH : 8,8
Solution 2 (concentration)	Tris HCl : 125 mM / SDS : 0,1 % / pH : 6,8
Gel d'acrylamide 11% (20mL de gel) (séparation)	H ₂ O : 7,52mL / solution 1 : 4,9mL / acrylamide/bisacrylamide 30% : 7,2mL / APS 10% (ammonium persulfate) : 300 μ L / TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) : 15 μ L
Gel d'acrylamide 5% (10mL de gel) (concentration)	H ₂ O : 6,16mL / solution 2 : 2,5mL / acrylamide/bisacrylamide 30% : 1,34mL / APS 10% : 200 μ L / TEMED : 10 μ L
Tampon de migration (TG-SDS)	Tris : 25mM / glycine : 192mM / SDS : 0.1% / pH : 8,6
Tampon de transfert (TG-méthanol)	Tris : 25mM / glycine : 192mM / méthanol : 20% / pH : 8,3
Tampon de lavage (TBST)	Tris : 25mM / NaCl : 137 mM / KCl : 2,68 mM / Tween 20 : 0.3% / pH : 7,5
Tampon de saturation (TBST + BSA)	Tris : 25mM / NaCl : 137 mM / KCl : 2,68 mM / Tween 20 : 0.3% / BSA : 4% / pH : 7,5
Dilution des différents anticorps utilisés	
Anticorps anti ALIX	1/5000
Anticorps anti TSG 101	1/1000 / 1/2000
Anticorps anti CD 63	1/500
Anticorps anti CD 81	1/1000 / 1/2000
Anticorps secondaire	1/5000

10.2.3 Méthode

Les échantillons vont migrer dans un gel d'acrylamide composé d'un gel de concentration à 5% d'acrylamide permettant aux protéines de migrer uniformément avant le gel de séparation (les mailles du gel sont moins resserrées), et un gel de séparation à 11% d'acrylamide, permettant la migration et la séparation des protéines en fonction de leurs poids moléculaires.

Le réactif de Laemmli 6X est ajouté à l'échantillon puis l'échantillon est chauffé à 80°C pendant 10min pour permettre la dénaturation des protéines (exemple pour un échantillon de 15µL, il faut ajouter 3µL du réactif de Laemmli 6X).

Une fois la dénaturation réalisée, les échantillons sont déposés sur le gel d'acrylamide soit à volume égal, soit à quantité de protéine égale. La migration s'effectue en deux temps, un premier temps à 75V permettant aux protéines de pénétrer et migrer dans le gel de concentration (environ 15-20 min). Puis un deuxième temps à 100-150V, durant lequel les protéines vont migrer dans le gel de séparation jusqu'à ce que le front de migration sorte du gel (environ 1h).

Ensuite, le gel est récupéré pour transférer les protéines sur une membrane de PVDF à 0,2µm (transfert liquide). Le transfert s'effectue pendant 1-2h sous une tension de 200mA par gel présent dans le caisson.

La membrane est ensuite placée dans un tampon de saturation pour éliminer les possibles faux négatifs. Cette saturation va durer 1h à température ambiante sous agitation.

Après la saturation, la membrane est placée dans un tampon constitué du tampon de saturation auquel on aura ajouté l'anticorps primaire reconnaissant la protéine d'intérêt. Si les protéines d'intérêt ont des poids moléculaires suffisamment différents, on peut couper la membrane après la saturation permettant d'économiser des réactifs. L'incubation de l'anticorps primaire se réalise toute la nuit à 4°C sous agitation.

Une fois l'incubation de l'anticorps primaire réalisée, la membrane est lavée dans du TBST 3 fois, 5 min sous agitation à température ambiante. La membrane est ensuite mise en contact avec l'anticorps secondaire (dans notre cas un anti souris de chez Jackson ImmunoResearch Labs) dans du tampon de saturation. L'anticorps secondaire est couplé à une peroxydase permettant l'émission de photon lors de la mise en contact avec le réactif de

révélation (chemiluminescence). L'incubation avec l'anticorps secondaire va durer 1h à température ambiante sous agitation.

Pour finir, la membrane est lavée 3 fois pendant 5min sous agitation avec du TBST. La membrane est ensuite mise en contact avec le réactif de révélation (Lumina Forte Millipore référence : WBLUF0500), et analysé grâce à un imageur (Image Master VDS-CL bio-imaging system (GE Healthcare Life Sciences_Amersham Biosciences, Little Chalfont, England)).

10.3 Dosage de la créatinine

Le dosage de la créatinine est réalisé sur les échantillons urinaires de l'étude clinique par le laboratoire des Hôpitaux de Lyon-Est, grâce à un automate, en utilisant un kit enzymatique : CREATININE (ENZYMATIC) 8L24-31/-41 B8L242 49-8751/R01.

Très brièvement, le but de ce dosage est d'observer la formation de la quinonéimine dont la variation d'absorbance à 584nm est proportionnelle à la quantité de créatinine de l'échantillon.

Chapitre 11 : Analyse par microscopie

11.1 Microscopie à fluorescence

11.2 Procédures utilisées en Immunofluorescence

11.2.1 Fixation des cellules sur lamelles en verre

Une fois les traitements réalisés, les cellules sont lavées au PBS puis fixées à l'aide de PBS-Paraformaldéhyde (PFA) 4% à température ambiante pendant 15min. Les cellules sont ensuite lavées trois fois avec du PBS.

11.2.2 Marquages cellulaire effectués

11.2.2.1 Marquage des compartiments acides des cellules par le LysoTracker Red DND-99_Molecular Probes

Le LysoTracker est un réactif permettant d'observer dans une cellule les compartiments acides endolysosomaux (endosomes tardifs, lysosomes) (Thermo Fisher scientific, L7528).

Avant fixation, les cellules sont incubées avec le LysoTracker. La concentration finale du LysoTracker dans un puits est de 67 nM, les cellules sont incubées à 37°C pendant 30 min avec 5% de CO₂. Les cellules sont ensuite fixées comme indiqué précédemment, puis on réalise le montage des lamelles sur une lame de microscope pour observer les cellules au microscope. L'observation est faite grâce à un microscope inversé à fluorescence, l'Axiovert 200M de Zeiss. La longueur d'onde d'excitation du LysoTracker est de 577nm. On pourra ensuite observer l'émission de photon à une longueur d'onde de 590nm.

11.2.2.2 Marquage des endolysosomes avec des anticorps spécifiques

Après fixation des cellules au PFA, les lamelles sont saturées pendant 30 min à température ambiante, avec une solution de PBS + 1% de BSA. Cette étape permet d'éviter la fixation non spécifique des anticorps. La solution contenant l'anticorps primaire anti-BMP au 1/10 dilué dans du PBS + 1% de BSA et 0,1% de saponine est ajoutée (tableau 35). La saponine est utilisée pour perméabiliser les membranes.

L'incubation avec les anticorps primaires dure 1h à température ambiante. Ensuite les lamelles sont lavées deux fois avec du PBS et incubées pendant 30min à température ambiante, à l'abri de la lumière, avec une solution contenant du PBS et l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor AF dilué au 1/100 (dépendant du type d'anticorps primaire et de la colocalisation si besoin) Une dernière étape de trois lavages par le PBS est réalisée. Les lamelles sont montées sur des lames de microscope. L'observation est faite grâce à un microscope inversé à fluorescence l'Axiovert 200M de Zeiss. La longueur d'onde d'excitation de l'anticorps AF 488

est comprise entre 480-500nm. On pourra ensuite observer l'émission de photon à une longueur d'onde de comprise entre 510-525nm

11.3 Microscopie électronique

La préparation des échantillons ainsi que leurs analyses par microscopie électronique à transmission ont été réalisées au CIQLE de Lyon.

Les vésicules extracellulaires de différentes origines ont été analysées par immunogold. Cette technique d'immunomarquage permet d'observer par microscopie électronique la présence de marqueur d'intérêt révélé par l'anticorps primaire grâce au greffage d'une bille d'or sur un anticorps secondaire (figure 43).

Les vésicules extracellulaires sont absorbées sur des grilles en nickel de 200 mailles préalablement traitées par du Formvar C (métal déposé sur les grilles). L'absorption est réalisée sur 5 μ L d'échantillon pendant 2min à température ambiante. Le marquage par immunogold est réalisé par flottation c'est-à-dire que les grilles sont déposées dans une goutte de milieu réactionnel.

Tout d'abord pour l'immunogold simple, les grilles sont placées dans une solution de saturation pour éviter le marquage non spécifique. La solution de saturation est une solution de Tris-HCl 50mM à pH 7,4 contenant 1% de BSA, et 1% de sérum de chèvre non décomplémenté. La saturation s'effectue à température ambiante pendant 10 min. Ensuite, les grilles sont mises en contact avec une solution contenant l'anticorps primaire pendant 1h à température ambiante, en chambre humide. La solution d'anticorps primaire est une solution de Tris-HCL 50mM à pH 7,4, contenant 1% de BSA et les anticorps primaires monoclonaux de souris utilisés : anti-BMP au 1/10, anti ALIX au 1/50 et anti CD63 au 1/50. Les grilles sont ensuite lavées dans un premier temps avec une solution Tris-HCl 50 mM à pH 7,4, puis dans un second temps avec une solution Tris-HCl 50 mM à pH 8,2. Les grilles sont maintenant incubées pendant 10 min en chambre humide dans du Tris-HCl, pH8,2 avec 1% de BSA. Puis pendant 45 min en chambre humide, les grilles sont mises en contact avec l'anticorps secondaire anti souris de chèvre greffé avec des billes d'or de 10nm (Tebu-Bio, Le Perray-en-Yvelines, France), l'anticorps est dilué au 1/50 dans une solution de Tris-HCL 50 mM, pH 8,2 avec 1%de BSA. Les grilles sont de

nouveau lavées à température ambiante avec une solution de Tris-HCl 50 mM, pH 8,2 puis avec une solution de Tris-HCl 50mM pH 7,4. Le complexe est ensuite fixé pendant 2min avec 2% de glutaraldéhyde, Enfin les grilles contenant les EV sont colorées avec 2% d'acide phosphotungstique pendant 2 min avant l'observation.

Pour le double marquage immunogold, les étapes de lavages et de saturation sont identiques à celles ci-dessus, mais les marquaures sont séquentiels et utilisent des tailles différentes de bille d'or pour chaque anticorps. Après l'étapes de saturation, les grilles sont mises en contact avec le premier anticorps dirigé contre le marqueur protéique des exosomes Alix ou CD63 (solutions et conditions identiques à celle de l'immunogold simple). Ensuite, la solution contenant l'anticorps secondaire anti-souris greffé avec des billes d'or de 5nm est mise en contact avec les grilles (solution et condition d'identique à celle de l'immunogold simple). Une nouvelle étape de saturation est effectuée comme pour l'immunogold simple. Puis on effectue le marquage du BMP comme précédemment. La solution contenant l'anticorps secondaire greffé cette fois avec des billes d'or de 15 nm est ensuite ajoutée comme précédemment. Le double immunocomplexe est fixé et coloré comme précédemment. Les immunogolds sont ensuite analysés par un microscope électronique à transmission (Jeol 1400 JEM, Tokyo, Japon), couplé d'une caméra Gatan (Orius 600) et d'un logiciel de micrographie numérique. Les billes distantes de 20 à 40 nm de la membrane d'une vésicule sont considérées comme appartenant à cette vésicule. Cette distance correspond à la taille des 2 anticorps.

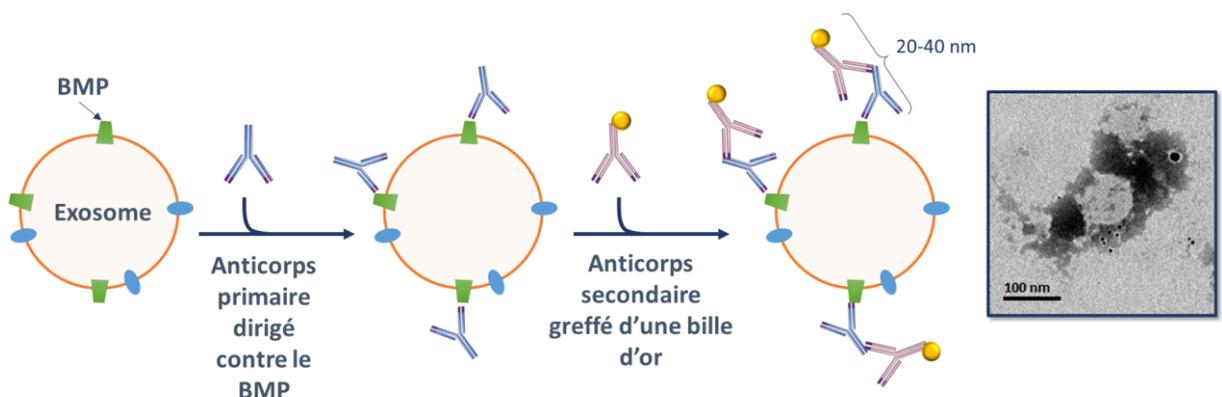


Figure 43: schéma du principe du marquage par immunogold et cliché de microscopie électronique

Chapitre 12 : Analyse des vésicules extracellulaires par *nanoparticle tracking analysis*

L'analyse par NTA (*nanoparticle tracking analysis*) ou suivi individuel des nanoparticules a été faite avec le NanoSight NS300 de chez Malvern instrument. Cette technique basée sur la dispersion de la lumière et le mouvement Brownien des particules en fonction de leur taille (pour une température et viscosité connues) permet d'analyser individuellement chaque vésicule et de déterminer leur taille et concentration. Elle permet d'analyser de façon fiable des vésicules de diamètre entre 30 et 1000 nm. Elle est utile pour les populations hétérogènes d'EV en donnant des renseignements sur leur distribution de taille.

Chaque échantillon dilué (entre 1/100 et 1/1000 selon les préparations d'EV) en PBS stérile et filtré à 0,1µm a été analysé en triplicat pendant 90 secondes en utilisant le PBS stérile pour le taux basal. La concentration relative des particules à un diamètre donné a été analysée pour donner un pourcentage cumulatif des vésicules permettant ainsi de déterminer leur distribution: D10, D50 et D90 indiquent que 10%, 50% et 90% des EV ont un diamètre inférieur à la valeur indiquée du diamètre (nm).

Chapitre 13 : Analyses statistiques

Les analyses statistiques de l'étude clinique ont été réalisées grâce au test de Student non apparié. Les analyses ont été effectuées en comparant les patients avec les sujets contrôles. Les différences significatives ont été relevées pour une p value de $p < 0.05$.

Les analyses statistiques des études *in vitro* ont été réalisées grâce au test de Student. Les différences significatives ont été relevées pour une p value de $p < 0.05$.

Tableau 33: Nombres d'expériences indépendantes et nombres de réplicats réalisés en fonction des études.

Expériences	Nombre d'expérience indépendantes	Nombre de réplicats
Modification de la voie endosomale par surcharge en cholestérol induite par les lipoprotéines	Cellule contrôle n=6 / Cellule +PG n=3 / Cellule +acLDL n=6 / cellule+acLDL+U18666A n=3/ Cellule+acLDL+PG n=3	1
Modification de la voie endosomale par maladie génétique NPC	Cellule contrôle n=3/ Cellule NPC n=3	1
Modification de la voie endosomale par des amines cationiques	Cellule Contrôle n=3/ Cellule +amiodarone n=3 / Cellule + chloroquine n=3	1

PARTIE III-RESULTATS

Introduction générale

Cette partie résultats est articulée autour de 3 parties. La première partie portera sur une étude pilote, étudiant le rôle du BMP, comme biomarqueur urinaire de dysfonctionnement endolysosomal, chez l'homme. La deuxième partie portera sur la présence de BMP dans les exosomes. Enfin, la troisième partie abordera le rôle du BMP dans la sécrétion du cholestérol par les exosomes.

Chapitre 14 : BMP : Biomarqueur extracellulaire lors de dysfonctionnement endosomal induit par l'amiodarone

Introduction

Les CAD sont des médicaments qui engendrent des effets secondaires lors du traitement des maladies. En effet, le risque de phospholipidose définie comme une accumulation intracellulaire de phospholipides (voir le chapitre sur le dysfonctionnement endolysosomal) peut conduire à des effets secondaires plus importants que les bénéfices thérapeutiques souhaités (Breiden & Sandhoff, 2019; Liu et al., 2014). Il est donc essentiel d'avoir des biomarqueurs spécifiques, sensibles et facilement accessibles dans les milieux biologiques périphériques, qui permettront de détecter précocement et de suivre l'évolution de ces phospholipidoses tissulaires. Or à l'heure actuelle, seulement une biopsie permet de diagnostiquer une phospholipidose. Des études précédentes (Baronas et al., 2007; Liu et al., 2014; K. L. Thompson et al., 2012) ont montré chez le rat que lors d'une phospholipidose induite par l'amiodarone, la quantité de di-DHA BMP urinaire se trouvait augmentée. Néanmoins, aucune étude n'a été réalisée chez l'homme. Pendant cette thèse, une étude pilote de preuve de concept a été réalisée avec des patients traités par l'amiodarone. Les informations cliniques de cette étude se trouvent dans la partie matériel et méthode (7.1.1 étude clinique). Cette étude a été publiée en 2020 dans le journal Biochimie (Rabia et al., 2020) et se trouve en

annexe. Dans cette partie, nous détaillerons les analyses préliminaires ainsi que des résultats non inclus (données non montrées) dans l'article.

L'étude est composée de 3 groupes : un groupe de sujets sains (groupe contrôle), un groupe de sujets traités par l'amiodarone (groupe Amio) et un groupe de patients atteints de stéatose hépatique non alcoolique (groupe NASH). L'amiodarone est une CAD reconnue pour provoquer des phospholipidoses entraînant des troubles hépatiques, thyroïdiens ... La NASH est une maladie caractérisée par une accumulation de lipides dans les hépatocytes. Les patients NASH nous permettent de déterminer si un dysfonctionnement au niveau du foie engendre aussi une augmentation du BMP urinaire, et donc de déterminer si l'augmentation du BMP urinaire est due à l'amiodarone ou bien à un dysfonctionnement hépatique.

14.1 Analyses préliminaires

Dans un premier temps, nous avons vérifié que le BMP urinaire analysé était bien dans la partie soluble des urines, et ne provenait pas des possibles cellules présentes dans les urines. Toutes les quantités de BMP sont ramenées à la quantité de créatinine urinaire, permettant de standardiser les résultats et aussi d'éliminer des patients atteints de troubles rénaux. La figure 44 permet d'observer qu'il n'y a pas de différence significative entre nos 3 groupes, permettant ainsi d'éliminer tout biais lié à un trouble rénal provoqué par la NASH ou bien l'amiodarone. Les urines ont dans un premier temps été analysées de 2 façons : les urines totales et les surnageants des urines. Ces surnageants sont obtenus après centrifugation à 200g pendant 10 min à RT (*room temperature*).

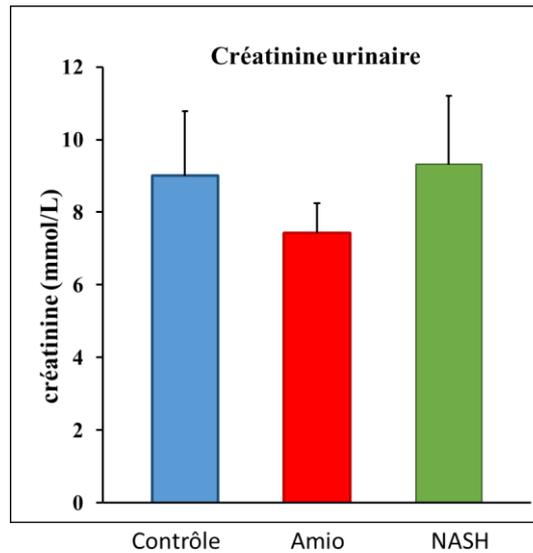


Figure 44 : quantité de créatinine urinaire en mol.L-1, moyenne +/- sem ; groupe contrôle n= 12 ; groupe NASH n= 6 ; groupe Amiodarone (Amio) n= 24. (Rabia et al., 2020)

La figure 45 ne montre aucune différence statistiquement significative dans la quantité de di-DHA BMP urinaire, entre les surnageants des urines et les urines totales pour les 3 groupes. Néanmoins, on constate une tendance à l'augmentation pour les urines totales. Cette différence est possiblement due à la centrifugation qui a permis non seulement d'éliminer les cellules présentes, mais aurait pu aussi retenir une partie du BMP « soluble » dans le culot particulaire. Ces résultats montrent que la majorité du BMP est présent dans la partie soluble des urines. Pour le reste des analyses, les surnageants des urines ont donc été utilisés.

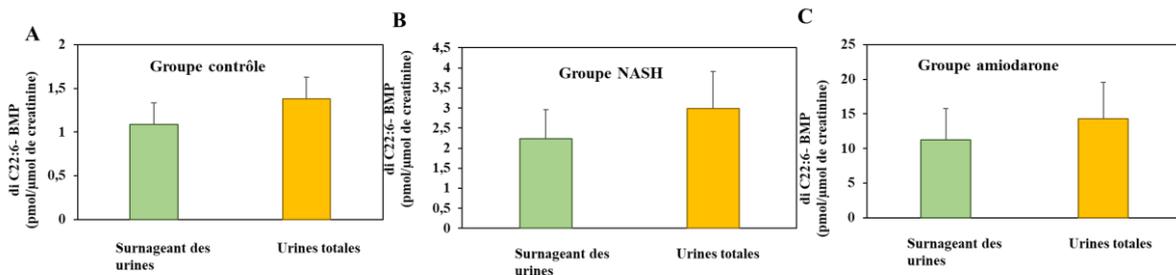


Figure 45: différence en di-DHA BMP entre les surnageants* (200g) des urines et les urines totales en pmol/μmol de créatinine, moyenne +/- sem ; A : groupe contrôle n=12 ; B groupe NASH n=6 ; C groupe amiodarone n=24 (Rabia et al., 2020) (HPLC-MS/MS)

Ensuite l'impact du genre sur la concentration en di-DHA BMP urinaire et en BMP Total a été étudié. L'absence de différence significative en fonction du genre (figures 46 et 47) a permis de comparer globalement les résultats des urines indépendamment du sexe des donneurs.

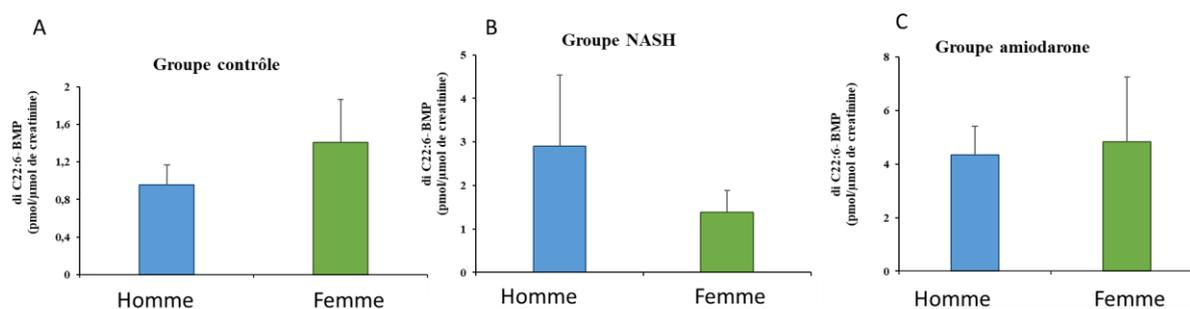


Figure 46 : différence en di-DHA BMP dans les urines en fonction du genre, en pmol/μmol de créatinine, moyenne +/- sem; A : groupe contrôle : femme n=6 homme n=6 ; B groupe NASH : femme n=3 homme n=3 ; C groupe amiodarone : femme n=14 homme n=10 (Rabia et al., 2020) (HPLC-MS/MS)

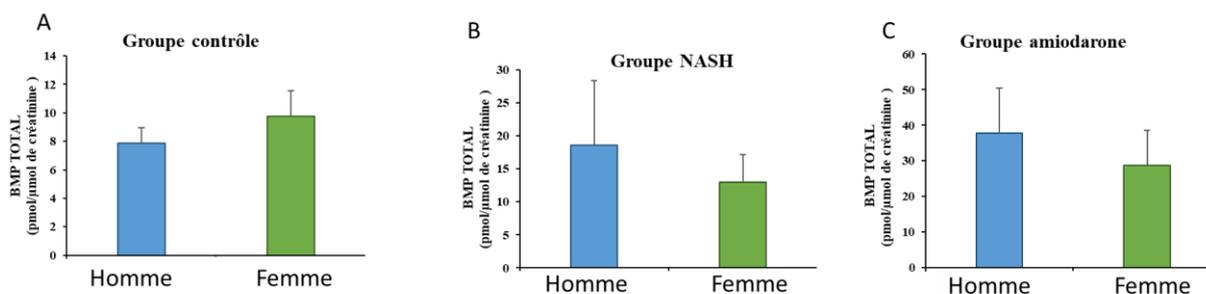


Figure 47: différence en BMP total dans les urines, en fonction du genre, en pmol/μmol de créatinine, moyenne +/- sem; A : groupe contrôle : femme n=6 homme n=6 ; B groupe NASH : femme n=3 homme n=3 ; C groupe amiodarone : femme n=14 homme n=10 (Rabia et al., 2020) (HPLC-MS/MS)

14.2 Augmentation du BMP urinaire (étude humaine)

Une fois les vérifications préliminaires réalisées, le BMP urinaire a été analysé. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au di-DHA BMP. Pourquoi cette espèce moléculaire? Premièrement, elle est l'espèce retrouvée spécifiquement augmentée chez le rat (K. L. Thompson et al., 2012), nous permettant ainsi de faire un parallèle entre les études faites chez l'homme et l'animal. Ensuite, un biomarqueur est caractérisé comme étant facilement analysable et caractéristique. L'espèce moléculaire di-DHA BMP est une espèce particulière qui semble assez spécifique du BMP. En effet, il est très rare de trouver un phospholipide estérifié par 2 molécules de DHA dans les phospholipides. De plus, cette espèce très facilement identifiable parmi les autres espèces du BMP comme nous le verrons plus loin.

Les résultats de l'analyse du di-DHA BMP urinaire sont résumés dans la figure 48. On constate une augmentation significative de la quantité de di-DHA BMP pour le groupe Amio, comparé aux groupes contrôle et NASH. Mais il n'y a pas de différence significative entre le groupe contrôle et le groupe NASH. L'augmentation du di-DHA BMP urinaire n'est pas due à un dysfonctionnement au niveau du foie mais bien à la consommation d'amiodarone.

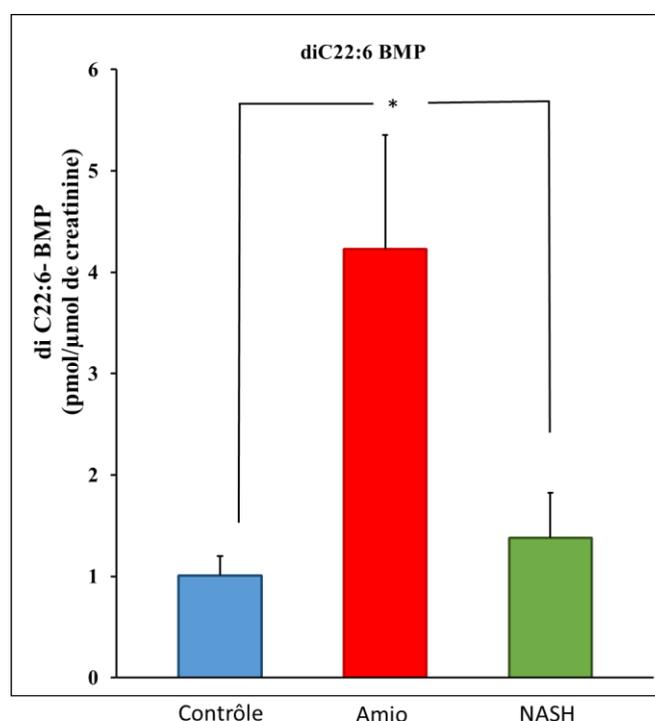
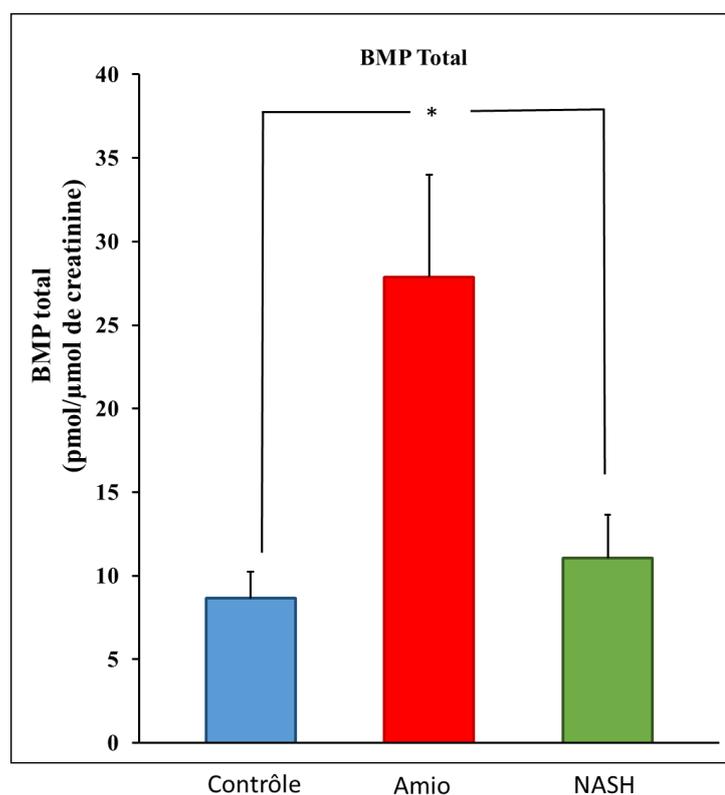


Figure 48: quantité en di-DHA BMP dans les urines, en pmol/μmol de créatinine, moyenne +/- sem ; groupe contrôle n= 12 ; groupe NASH n= 6 ; groupe Amiodarone (Amio) n= 24, * p<0.05 par rapport au groupe contrôle et au groupe NASH (Rabia et al., 2020) (HPLC-MS/MS)

Pour approfondir cette étude, l'ensemble des espèces moléculaires du BMP (une vingtaine) urinaire a été analysé. Ces résultats se trouvent dans le tableau 34. La quantité de chaque espèce moléculaire a été sommée pour chaque groupe permettant d'avoir une quantité totale de BMP urinaire. On constate que pour le groupe amiodarone, par rapport au groupe contrôle et NASH, il y a une augmentation significative de la quantité de BMP total urinaire. Néanmoins, il n'y a pas de différence significative entre la quantité de BMP total pour le groupe NASH par rapport au groupe contrôle (figure 49).



*Figure 49: quantité de BMP total dans les urines, en pmol/μmol de créatinine, moyenne +/- sem ; groupe contrôle n= 12 ; groupe NASH n= 6 ; groupe Amiodarone (Amio) n= 24, * p<0.05 par rapport au groupe contrôle et au groupe NASH (Rabia et al., 2020) (HPLC-MS/MS)*

Tableau 34: liste des espèces moléculaires du BMP urinaire analysées pmol/ μ mol de créatinine, moyenne +/- sem ; groupe contrôle n= 12 ; groupe NASH n= 6 ; groupe Amiodarone (Amio) n= 24, * p<0.05 par rapport au groupe contrôle (Rabia et al., 2020) (HPLC-MS/MS)

BMP : espèces moléculaires (pmol / μ mol de créatinine)	Contrôle (n=12)	Amiodarone (n=24)	NASH (n=6)
C16:0,C16:0	3.40 \pm 0.49	3.89 \pm 0.68	3.24 \pm 0.62
C18:1n-9,C20:1n-9	0.06 \pm 0.01	0.24 \pm 0.06 *	0.14 \pm 0.04 *
C16:0,C18:1n-9	0.08 \pm 0.01	0.34 \pm 0.09 *	0.14 \pm 0.05
C18:1n-9,C18:1n-9	0.99 \pm 0.19	4.49 \pm 1.18 *	1.57 \pm 0.51
C18:0,C18:1n-9	0.27 \pm 0.05	0.90 \pm 0.21 *	0.49 \pm 0.07 *
C16:0,C18:2n-6	0.02 \pm 0.004	0.13 \pm 0.04 *	0.04 \pm 0.01
C18:2n-6,C18:2n-6	0.08 \pm 0.02	0.66 \pm 0.22 *	0.10 \pm 0.03
C18:1n-9,C18:2n-6	0.54 \pm 0.11	3.17 \pm 0.95 *	0.75 \pm 0.28
C18:0,C18:2n-6	0.05 \pm 0.01	0.20 \pm 0.06 *	0.06 \pm 0.01
C18:2n-6,C22:6n-3	0.36 \pm 0.06	1.90 \pm 0.48 *	0.44 \pm 0.12
C18:1n-9,C22:6n-3	1.05 \pm 0.16	4.66 \pm 1.13 *	1.66 \pm 0.50
C18:0,C22:6n-3	0.10 \pm 0.02	0.31 \pm 0.07 *	0.17 \pm 0.04
C16:0,C20:4n-6	0.03 \pm 0.01	0.14 \pm 0.03 *	0.05 \pm 0.01
C20:4n-6,C22:6n-3	0.07 \pm 0.01	0.43 \pm 0.10 *	0.09 \pm 0.02
C22:6n-3,C22:6n-3	1.01 \pm 0.14	4.23 \pm 1.13 *	1.38 \pm 0.44
C16:0,C22:6n-3	0.38 \pm 0.07	1.28 \pm 0.34 *	0.50 \pm 0.15
C18:1n-9,C20:4n-6	0.06 \pm 0.01	0.36 \pm 0.10 *	0.07 \pm 0.02
C16:0,C22:5n-3/6	0.01 \pm 0.004	0.05 \pm 0.01 *	0.03 \pm 0.01
C18:1n-9,C20:3n-6/9	0.06 \pm 0.02	0.35 \pm 0.10 *	0.09 \pm 0.03
C18:1n-9,C20:2n-6	0.03 \pm 0.01	0.15 \pm 0.04 *	0.05 \pm 0.02
BMP TOTAL	8.64 \pm 1.12	27.88 \pm 6.13 *	11.05 \pm 2.60
saturées (mole%)	41.7 \pm 4.1	22.2 \pm 3.0	31.9 \pm 5.0
Monoinsaturées (mole%)	15.3 \pm 1.1	20.1 \pm 1.4 *	21.0 \pm 1.9 *
Polyinsaturées (mole%)	43.0 \pm 3.4	57.1 \pm 3.1 *	47.1 \pm 3.8

Nous avons classé les espèces moléculaires du BMP en 3 groupes selon le degré d'insaturation des acides gras estérifiés: les espèces saturées, les espèces monoinsaturées et les espèces polyinsaturées. Une espèce est considérée saturée si les 2 acides gras estérifiés sont saturés. Pour les espèces monoinsaturées, soit les deux acides gras sont monoinsaturés, soit un est saturé et le deuxième est monoinsaturé. Pour les espèces polyinsaturées, au moins un des deux acides gras doit être polyinsaturé. Dans le tableau 34 se trouvent les résultats de l'analyse de toutes les espèces moléculaires du BMP quantifiables dans les urines de notre étude. On constate que pour les trois groupes, la seule espèce moléculaire saturée est le di C16 :0 BMP. De plus, la concentration de cette espèce ne varie pas entre les groupes. Pour le groupe amiodarone, toutes les espèces insaturées sont augmentées significativement par rapport au groupe contrôle. Pour le groupe NASH, on observe une augmentation significative pour 2 espèces moléculaires monoinsaturées (C18 :1 n-9/ C20 :1 n-9 ; C18 :1 n-9 / C18 :1 n-9) par rapport au groupe contrôle. Néanmoins, il n'y a aucune différence entre le BMP total pour le groupe NASH et le groupe contrôle. Pour le groupe amiodarone, il y a une très forte augmentation des espèces contenant au moins un DHA. En effet, pour le groupe contrôle elles ne représentent qu'environ 34 % des espèces totales, alors que pour le groupe amiodarone, elles représentent environ 60% des espèces totales soit près du double. Ceci confirme donc l'enrichissement en acides gras polyinsaturés du BMP. Dans la figure 50, nous avons schématisé les proportions relatives des espèces en fonction de leur degré d'insaturation afin de visualiser les variations induites. On remarque une modification de la répartition de l'insaturation du BMP urinaire dans le groupe AMIO et NASH par rapport au groupe contrôle. Pour le groupe Amiodarone, on observe une augmentation significative de la proportion des espèces insaturées (mono et poly) du BMP comparativement au groupe contrôle. Pour le groupe NASH seules les espèces monoinsaturées voient leur proportion augmenter significativement au détriment des espèces saturées, comparativement au groupe contrôle.

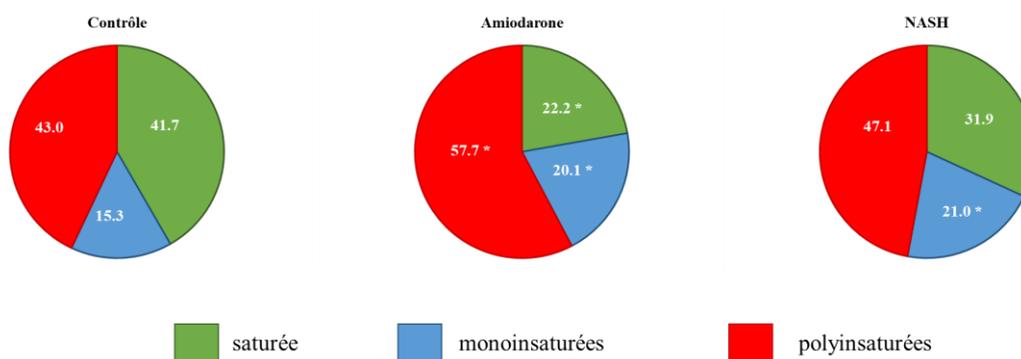


Figure 50 : répartition de l'insaturation des espèces moléculaires du BMP urinaire en fonction des groupes, valeur en %, * $p < 0.05$ par rapport au groupe contrôle (Rabia et al., 2020)

Les macrophages sont des cellules riches en BMP (Bouvier et al., 2009) et sécrètent des EV (Wang et al., 2015). Ils pourraient être la source du BMP circulant et sont connus pour incorporer de façon massive l'amiodarone (Stadler et al., 2008; Tengstrand et al., 2010). Pour étudier l'hypothèse que l'augmentation du BMP soit due à une intoxication globale de l'organisme par l'amiodarone, des macrophages ont été traités avec 10 μM d'amiodarone pendant 24h. Les macrophages utilisés sont des macrophages humains issus de la différenciation de la lignée THP1 et de monocytes sanguins primaires. Ces macrophages ont ensuite été analysés par microscopie à fluorescence confocale. Deux marqueurs ont été utilisés, le BMP et le lysotracker. Ce marquage permet d'observer une augmentation des compartiments endolysosomaux ainsi que l'augmentation du BMP. En effet, le lysotracker permet de marquer les compartiments acides de la cellule. On constate une augmentation de la taille des endolysosomes dans les macrophages (figure 51). De plus, on observe une augmentation de l'intensité du marquage du BMP suggérant une augmentation de la quantité du BMP intracellulaire. Les deux marquages colocalisent en partie, montrant bien que l'amiodarone agit dans le compartiment endolysosomal en le perturbant. Cette perturbation est un engorgement du compartiment, observable par l'augmentation de la quantité de BMP et de l'augmentation de la taille des compartiments endolysosomaux. On note aussi un changement dans la distribution intracellulaire des organites qui montrent une localisation plutôt péri-nucléaire dans les contrôles alors qu'ils adoptent une localisation plus périphérique après traitement par l'amiodarone.

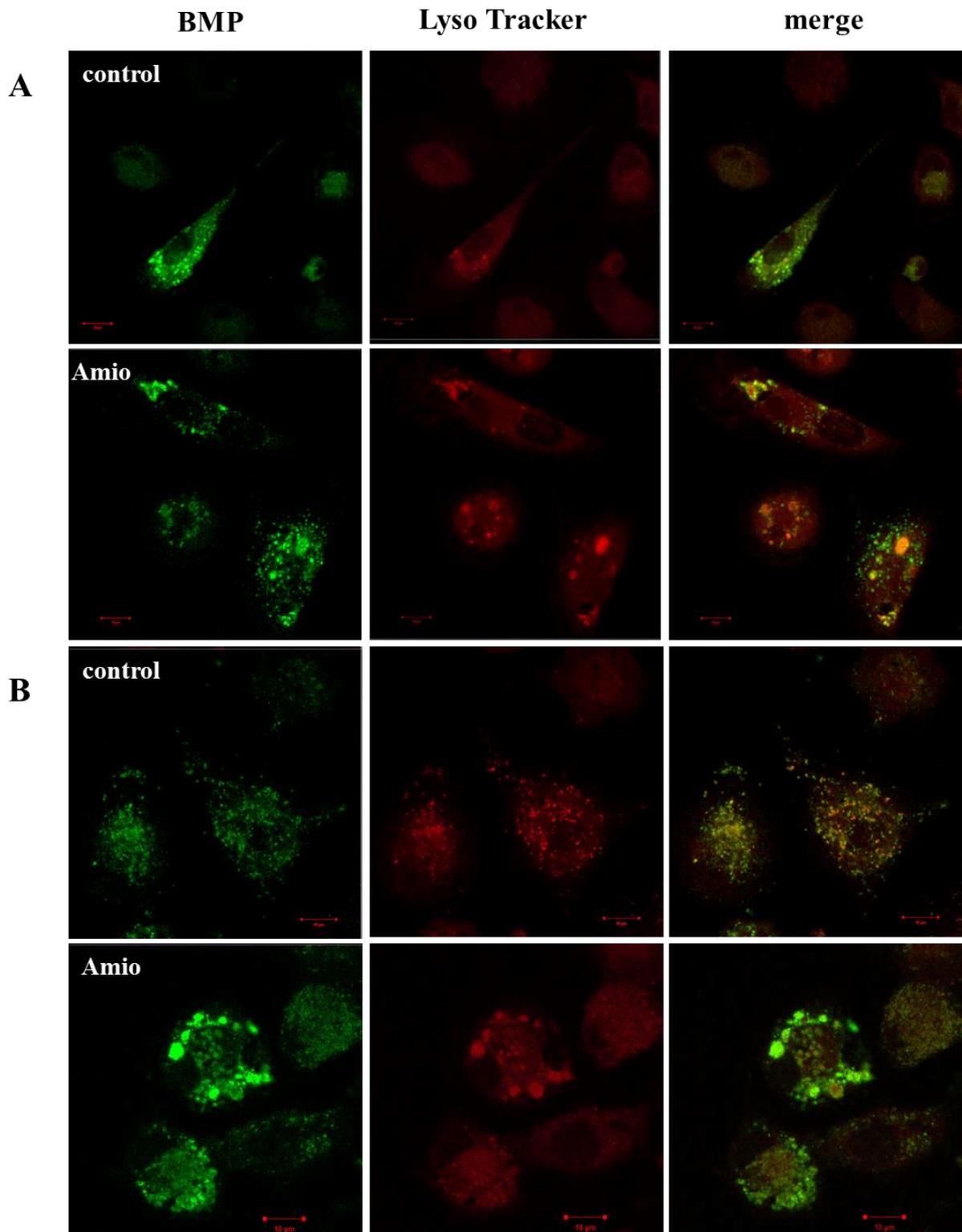


Figure 51: clichés de fluorescence avec anti- BMP (vert) et marquage des compartiments acides par le lysotracker (rouge); A : monocytes primaires humains différenciés en macrophages; B : THP1 différenciés en macrophages; traités avec ou sans 10 μ M d'amiodarone. (Rabia et al., 2020)

Conclusion

Ces résultats montrent qu'un traitement par l'amiodarone entraîne une augmentation du BMP urinaire chez l'homme, confirmant les résultats obtenus dans les études animales (Baronas et al., 2007; Tengstrand et al., 2010; K. L. Thompson et al., 2012). De plus, nous montrons pour la 1^{ère} fois que toutes les espèces à DHA du BMP augmentent significativement avec le traitement à l'amiodarone chez l'homme. Ceci pourrait suggérer un lien fonctionnel avec la sécrétion du BMP et son mode de transport dans les urines. Néanmoins, nous ne pouvons conclure quant à la présence de phospholipidose tissulaire chez les patients. En effet, aucune biopsie n'a pu être réalisée. Nous pouvons donc conclure que chez l'homme, le BMP est un biomarqueur urinaire de dysfonctionnement endolysosomal induit par l'amiodarone. Les résultats de fluorescence ont permis de confirmer l'hypothèse que l'augmentation du BMP urinaire est due plus particulièrement à un dysfonctionnement endolysosomal global. Le BMP se retrouve augmenté dans de nombreuses LSD (Meikle et al., 2008; Rabia et al., 2020; K. L. Thompson et al., 2012) au niveau cellulaire mais aussi au niveau extracellulaire. Il pourrait être utilisé comme marqueur permettant de classer les patients avec ou sans perturbation endosomale. Toutefois, le BMP semble être un marqueur de dysfonctionnement endolysosomal global et donc non spécifique d'un tissu.

L'amiodarone est connue pour provoquer des dysthyroïdies (Basaria & Cooper, 2005; Tsang & Houlden, 2009). L'analyse du BMP urinaire des sujets sous amiodarone avec ou sans dysthyroïdie (données non montrées) n'a montré aucune différence entre les 2 groupes. IL n'y aurait donc aucun lien entre la sécrétion de BMP urinaire et la dysthyroïdie induite par l'amiodarone. De plus, même si le BMP hépatique est enrichi en DHA (voir Tableau 21), la surcharge en lipides du foie au cours de la NASH n'augmente pas le BMP urinaire, suggérant donc l'absence de spécificité tissulaire. Enfin, L'analyse de la créatinine urinaire a permis d'éliminer la présence de dysfonctionnement rénal chez les sujets de l'étude. L'augmentation du BMP urinaire est donc due à une augmentation de la sécrétion de celui-ci, en absence de troubles rénaux, suggérant que l'augmentation de la quantité de BMP urinaire résulte de la perturbation endosomale induite par la consommation d'amiodarone (Rabia et al., 2020).

Il faut poursuivre les études humaines sur l'utilisation du BMP urinaire. Il pourrait ainsi devenir un marqueur non invasif de dysfonctionnement endosomal permettant ainsi d'éviter la réalisation de biopsie lors de suspicion de phospholipidose.

L'augmentation du BMP observée dans les macrophages lors d'un traitement par l'amiodarone, montre un lien entre l'augmentation du BMP urinaire et l'intoxication globale de l'organisme par l'amiodarone. Les cellules (macrophages, hépatocytes) secrèteraient le BMP dans la circulation sanguine comme suggéré par Meikle et al (Meikle et al., 2008), qui rejoindrait ultérieurement le rein pour être sécrété dans les urines.

Des études doivent être réalisées en recrutant des patients à différents temps de traitement avec l'amiodarone afin de rechercher une corrélation possible entre la quantité de BMP urinaire et la durée du traitement. Si la corrélation est présente, l'évolution de l'intoxication pourrait être surveillée afin de modifier le traitement des patients pour éviter de graves effets secondaires.

L'espèce di-DHA BMP est très intéressante d'un point de vue physico-chimique au niveau membranaire. Les nombreuses doubles liaisons (12 au total) des di-DHA forment des courbures importantes dans les chaînes aliphatiques du BMP ce qui conduit à une augmentation de la fluidité membranaire, permettant ainsi de jouer un rôle dans la dynamique des membranes, et peut être dans la sécrétion du BMP. Il faut poursuivre les études portant sur le rôle membranaire du BMP et plus particulièrement sur les espèces moléculaires polyinsaturées comme le di-DHA BMP, en lien avec les mécanismes de sécrétion du BMP.

La modification de la localisation des endolysosomes sous amiodarone (en périphérie de la cellule et non plus en périnucléaire), pourrait jouer un rôle dans la sécrétion du BMP par les cellules. En effet, elle permettrait de rapprocher les endolysosomes de la membrane plasmique et de favoriser la sécrétion du BMP dans le compartiment extracellulaire. Ce mode de sécrétion pourrait peut-être avoir un lien avec le mode de transport du BMP dans les urines.

Chapitre 15 : BMP : nouveau biomarqueur de vésicules extracellulaires issues des endosomes : les exosomes.

Introduction

La présence de BMP dans les urines nous a permis de nous interroger quant à son moyen de transport dans les urines, mais aussi dans les milieux aqueux en général. En effet, le BMP est un phospholipide, c'est-à-dire une molécule amphiphile : hydrophile par son groupement phosphate, mais aussi hydrophobe par ses chaînes acyles, ne lui permettant pas d'être transporté sous forme libre dans les milieux aqueux. Il peut se trouver sous la forme de micelle lipidique ou bien associé à des protéines comme la BSA par exemple. Des études ont démontré la présence de BMP dans le plasma humain associé aux lipoprotéines circulantes (Grabner et al., 2019; Meikle et al., 2008). Dans notre travail, nous avons exploré une autre voie de transport encore controversée pour le BMP via des vésicules extracellulaires comme les exosomes. En effet, le BMP n'est présent que dans les endolysosomes qui sont considérés comme le compartiment d'origine des exosomes. De plus, sa structure lui conférant des propriétés physico-chimiques fusogènes lui permettrait d'aider la sortie des exosomes de la cellule (Subra et al., 2007). Enfin, l'analyse des exosomes est à ce jour complexe en raison de leur hétérogénéité et d'un manque de marqueur spécifique (Pegtel & Gould, 2019). En effet, il faut utiliser plusieurs marqueurs pour prouver l'origine endosomale des exosomes. Le BMP se trouvant uniquement dans les endosomes, sa présence dans les exosomes en ferait un marqueur lipidique de choix. Cette partie des résultats va être articulée autour de 4 grandes parties :

-la première portera sur les différentes méthodes utilisées pour obtenir des vésicules extracellulaires.

- la deuxième partie portera sur la suite de l'étude clinique, c'est-à-dire le véhicule du BMP dans les urines.

-la troisième portera sur la caractérisation de la présence de BMP dans les exosomes à l'aide de différentes techniques dans des macrophages murins les RAW 264.7.

-la dernière partie portera sur l'isomérisation du BMP retrouvée en intracellulaire et en extracellulaire.

15.1 Avantages et limites des méthodes de purification des vésicules extracellulaires

Pour purifier les vésicules extracellulaires, plusieurs méthodes ont été utilisées. Toutes ces méthodes ont été présentées en détail dans la partie matériel et méthode. Dans cette partie, nous ne verrons ces techniques que sous forme d'un tableau avec les avantages et les inconvénients de chacune. Pour chaque figure, la technique d'isolement des EV utilisée sera indiquée par l'abréviation correspondante pour plus de simplicité. Pour l'analyse des urines, seule la technique utilisant le DTT avant l'étape d'ultracentrifugation a été utilisée ultérieurement. Pour les EV issues des surnageants de cultures cellulaires, voici les techniques utilisées et les abréviations qui seront retrouvées sur les figures :

-UC : ultracentrifugation

-UC-G : ultracentrifugation suivie d'un gradient de sucrose

-UF-UC : ultrafiltration suivie d'ultracentrifugation

-UF-SEC : ultrafiltration suivie par une chromatographie d'exclusion

Dans les tableaux ci-dessous (tableaux 35 et 36) se trouvent les avantages et inconvénients des différents techniques basés sur la littérature (Ayala-Mar et al., 2019; Jiang et al., 2020) et nos propres observations.

Tableau 35: avantages et inconvénients des techniques de purification de vésicules extracellulaires urinaires

Echantillons : Urines (Fernández-Llama et al., 2010; Merchant et al., 2017; Rabia et al., 2020)		
Technique	UC-DDT	UC-Sans DTT
Avantage	Rendement d'EV plus important Besoin de volume initial plus faible	Plus rapide car moins d'étapes
Inconvénient	Des étapes supplémentaires Possible modification de la structure des EV	Rendement d'EV moins important Besoin de volume initial plus important

Tableau 36: avantages et inconvénients des techniques de purification de vésicules extracellulaires secrétées par des cellules

Echantillons : Surnageants de culture cellulaire		
Technique	Avantages	Inconvénients /limites
UC (Ayala-Mar et al., 2019; Jiang et al., 2020)	Rapide Gold standard (reconnue par la communauté scientifique) (Ayala-Mar et al., 2019; Jiang et al., 2020; Li et al., 2017))	Rendement d'EV plus faible, contamination des échantillons par d'autre vésicules comme les lipoprotéines par exemple Besoin en milieu important > 200mL
UC-G (Ayala-Mar et al., 2019; Jiang et al., 2020)	Purification supplémentaire des EV-en fonction de leur densité Echantillons finaux très concentrés	Besoin en volume initial très important >800mL Volume faible d'échantillons et peu de rendement (Zeringer et al., 2013) Méthode longue et compliqué (réalisation du gradient) (Zeringer et al., 2013)
UF-UC	Rendement d'EV important Nécessite moins de volume que UC (200mL suffisant)	Méthode plus longue que UC seule
UF-SEC (Ayala-Mar et al., 2019; Jiang et al., 2020)	Purification supplémentaire en fonction de la taille des EV (Witwer et al., 2013)	Méthode longue Echantillon final dilué

15.2 BMP : nouveau biomarqueur d'exosomes urinaires ou secrétés par des cellules rénales

L'augmentation du BMP urinaire chez les patients traités à l'amiodarone est très intéressante (partie 7.1.1 étude pilote), mais le véhicule du BMP urinaire l'est tout autant. Dans ce but, des EV urinaires ont été purifiées permettant d'étudier la présence d'exosomes. 50 ml d'urine ont été utilisés pour purifier des EV de 3 sujets contrôles et de 3 patients sous amiodarone. Une fois les EV récupérées dans 50 µL de PBS, elles ont été analysées par HPLC-MS/MS pour quantifier le BMP, par Western blot pour déterminer la présence de marqueurs exosomaux, enfin la quantité de protéines totales a été quantifiée. Les résultats de ces analyses sont représentés dans la figure 52 pour la quantification du BMP et des protéines, et dans la figure 53 pour les marqueurs exosomaux. On constate la présence de BMP dans les EV purifiées. De plus, on observe une augmentation significative de la quantité de BMP pour les EV des sujets sous amiodarone, montrant bien un lien entre les EV et l'intoxication par

l'amiodarone. On peut aussi remarquer la présence d'exosomes par le biais des marqueurs exosomaux ALIX/CD81/CD63/ TSG101. Enfin, l'analyse des protéines montre une augmentation de la quantité de protéines totales pour les EV issues des patients sous amiodarone. La quantité de protéines étant corrélée à la quantité d'EV, on peut en conclure que l'amiodarone entraîne une augmentation de la sécrétion d'EV urinaires. Ces résultats tendent à montrer que :

- 1) le BMP est présent dans les exosomes,
- 2) l'amiodarone est un stimulateur de la sécrétion d'EV, probablement due à la perturbation endolysosomale induite par ce composé CAD (Partie 2.3.5).

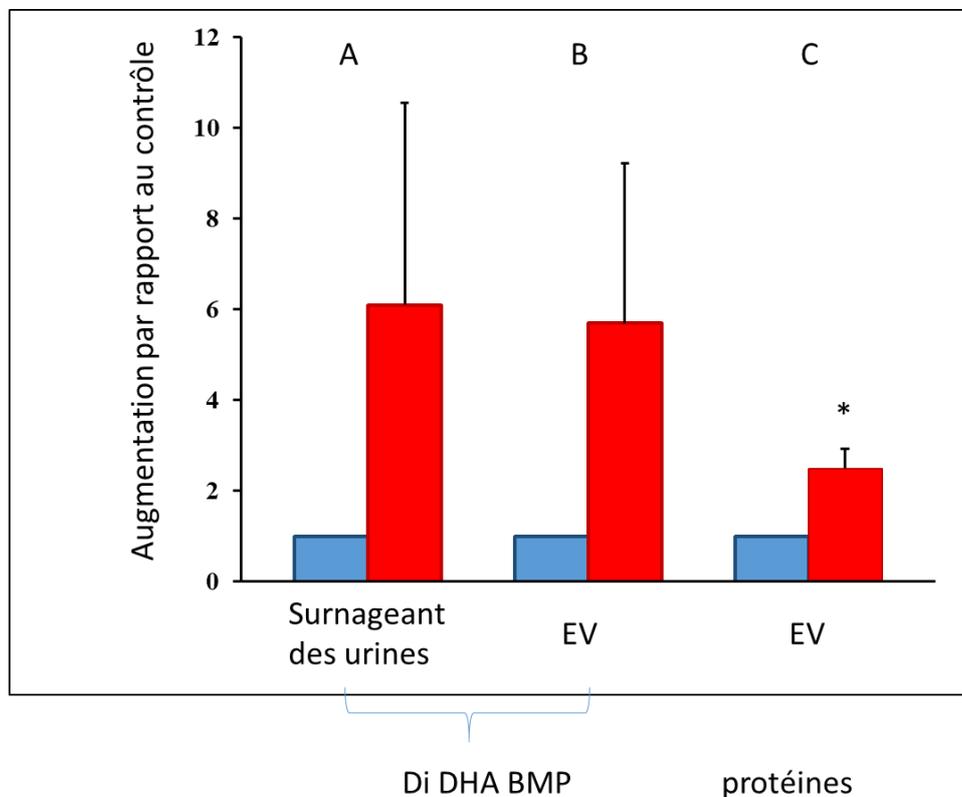


Figure 52: A : augmentation du di-DHA BMP des surnageants des urines du groupe amiodarone par rapport au groupe contrôle ; B : augmentation du di-DHA BMP des vésicules extracellulaires du groupe amiodarone par rapport au groupe contrôle ; C : augmentation des protéines totales des vésicules extracellulaires du groupe amiodarone par rapport au groupe contrôle ; valeur « fold d'augmentation par rapport au contrôle \pm sem, * $p < 0.05$, EV obtenu par UC-DTT (Rabia et al., 2020) (quantification du BMP par HPLC-MS/MS)

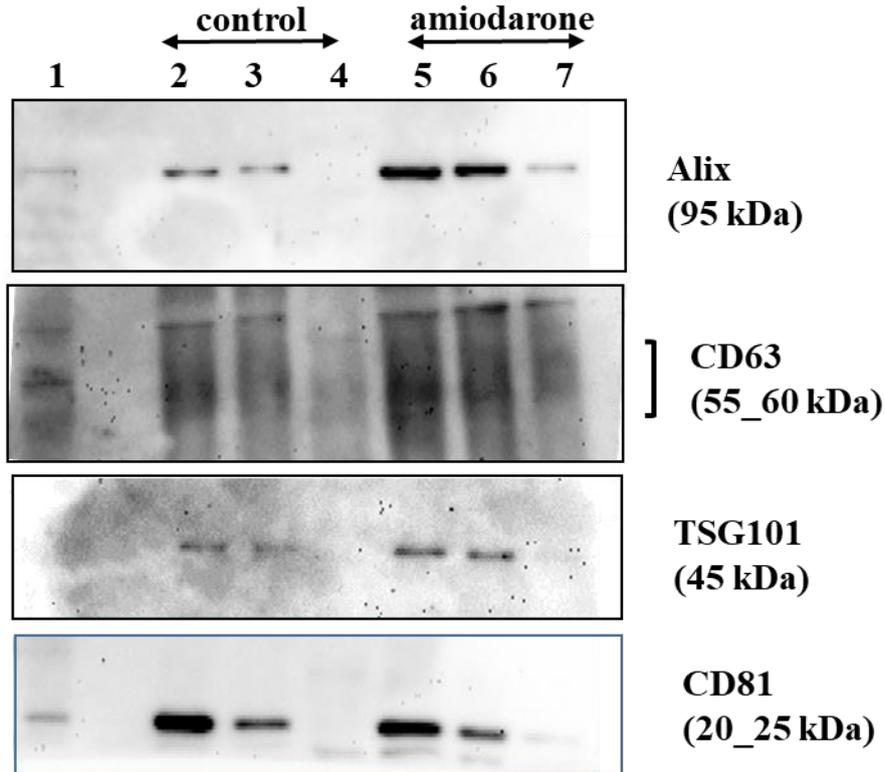


Figure 53: caractérisation par western blot des marqueurs exosomaux des EV urinaires obtenues par UC-DTT, 1 : marqueur de poids moléculaire ; 2,3,4 : EV de sujets contrôles ; 5,6,7 : EV de sujets sous amiodarone. Dépôts réalisés à volume égal : 15µL. marqueur utilisé : ALIX, CD63, TSG101, CD81(Rabia et al., 2020)

Pour aller plus loin, des comarquages par immunogold et observation en microscopie électronique ont été réalisés pour vérifier la présence de BMP dans des EV caractérisées comme des exosomes. Pour cela, des EV urinaires d'un volontaire sain ont été purifiées. Le marquage immunogold et l'analyse par microscopie électronique ont été réalisés au CIQLE. Les figures 54 et 55 montrent la présence de vésicules de taille compatible avec des EV (30-200 nm). Dans les figures 54 B et 55A, on observe aussi la présence d'EV positives pour le marquage avec l'anticorps anti-BMP, représenté par la présence d'une bille d'or de 10nm, à moins de 30 nm d'une vésicule. De plus, on note la présence d'EV contenant les marqueurs d'exosomes CD81 (figure 55 B) et CD63 (figure 54 A). Ces résultats montrent la présence d'EV contenant du BMP et des EV contenant des marqueurs d'exosomes dans une préparation d'EV urinaires. Dans les figures 54 C et 55C, on observe des EV co-marquées par le BMP et CD63 ou CD81, respectivement. Ces clichés montrent pour la 1^{ère} fois la présence de BMP dans les exosomes d'urines humaines.

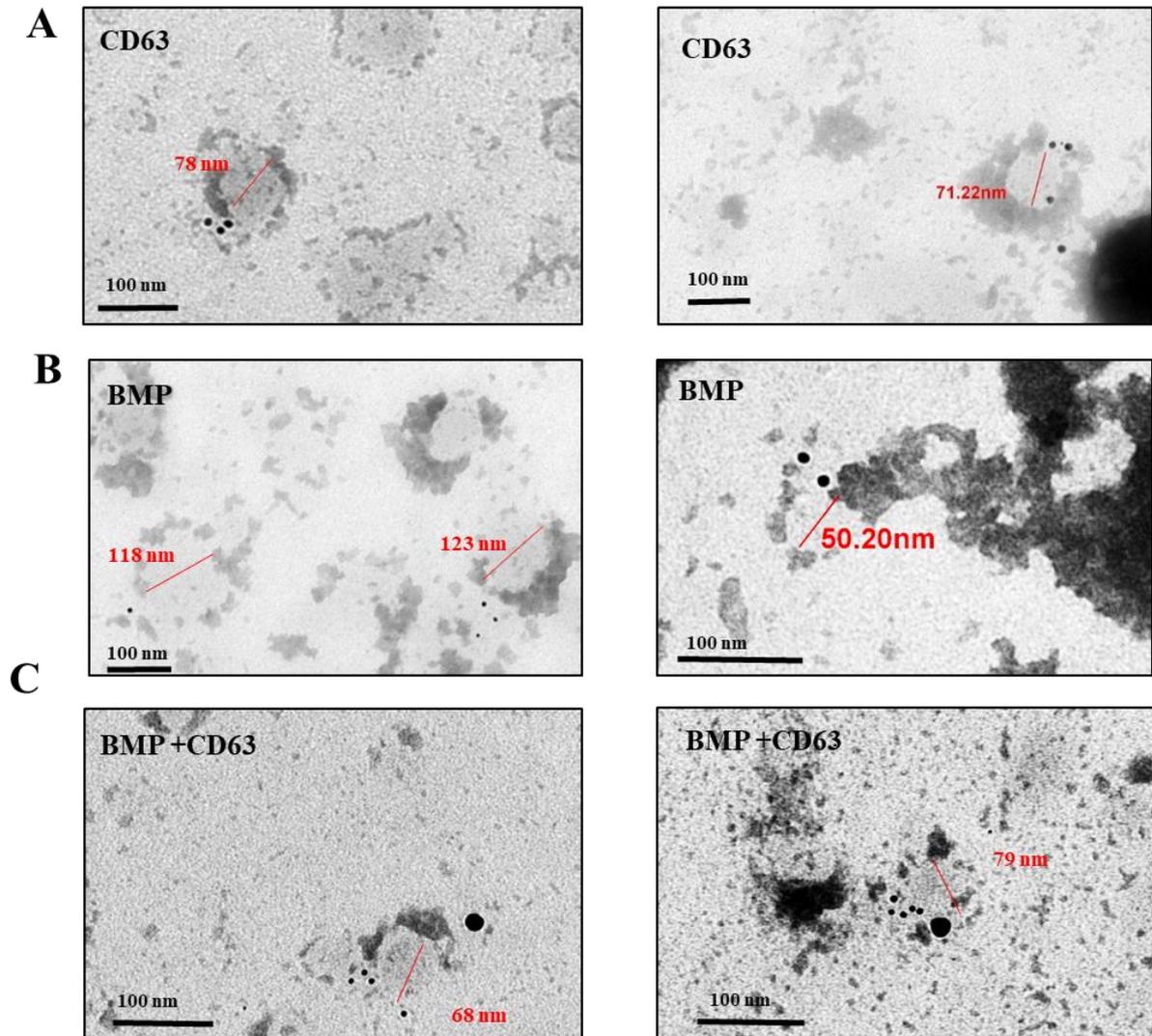


Figure 54: Marquage immunogold sur des vésicules extracellulaires urinaires obtenues par UC-DTT: A : immunogold avec anticorps anti- CD63, taille des billes d'or 10 nm, B : immunogold avec anticorps anti-BMP, taille des billes d'or 10 nm, C : comarquage immunogold avec anticorps anti-CD63, taille des billes d'or 5 nm, et anticorps anti-BMP, taille des billes d'or 15 nm (Rabia et al., 2020)

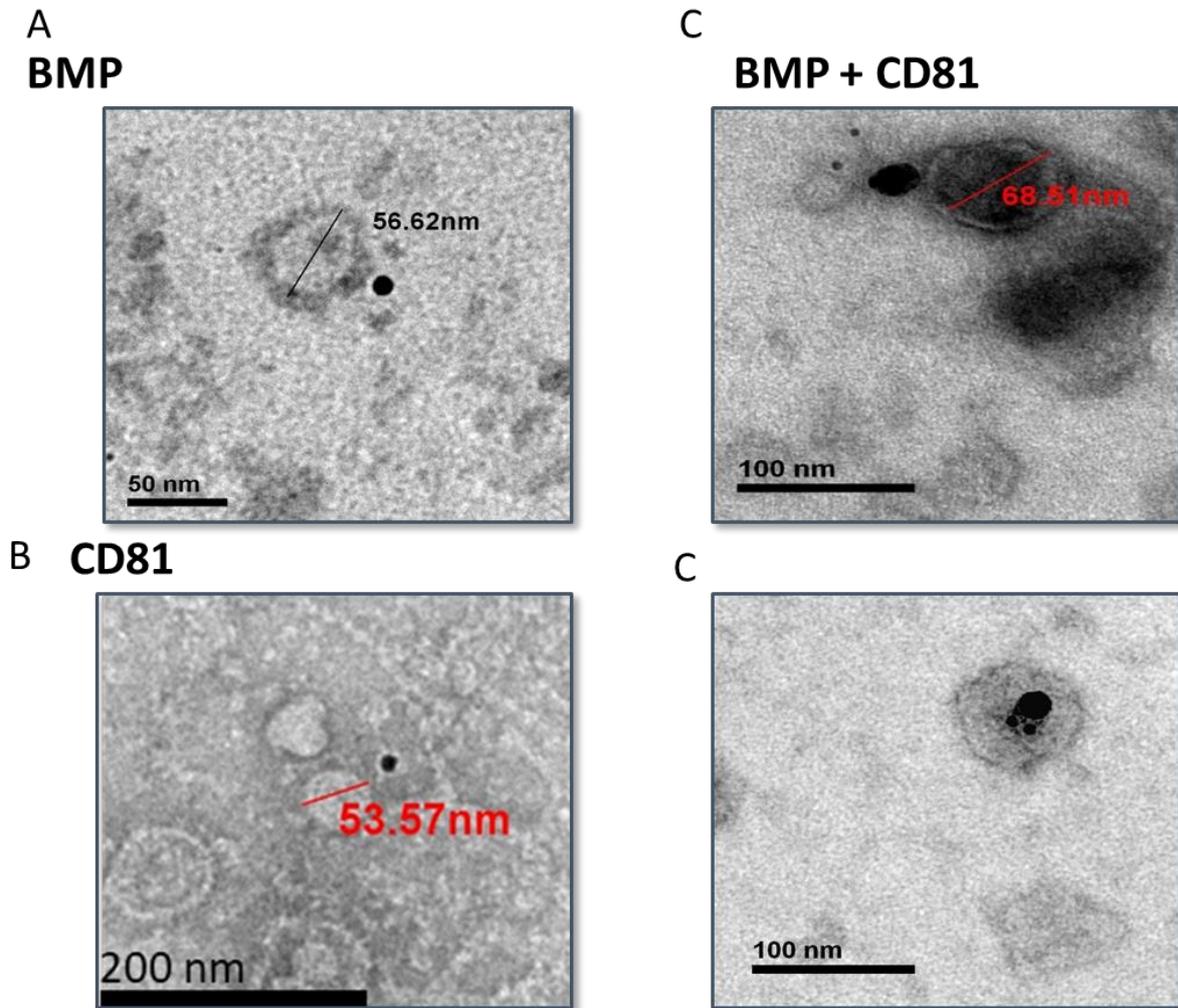


Figure 55: Marquage immunogold sur des vésicules extracellulaires urinaires obtenues par UC-DTT: **A** : immunogold avec anticorps anti-BMP, taille des billes d'or 10 nm, **B** : immunogold avec anticorps anti-CD81, taille des billes d'or 10 nm, **C** (images de droite): comarquage immunogold avec anticorps anti-CD81, taille des billes d'or 5 nm, et anticorps anti-BMP, taille des bille d'or 15 nm (Rabia et al., 2020)

Pour déterminer l'origine de ces exosomes, des EV issues de cellules rénales, les HEK 293, ont été purifiées puis analysées par microscopie électronique. Les EV ont été marquées par immunogold avec les anticorps contre le BMP et CD63. Dans la figure 56 B, on observe la présence d'EV marquées par le BMP. Des exosomes caractérisés par la présence de CD63 sont présents dans les EV secrétées par les cellules HEK 293 (Figure 56 A). La figure 56 C montre des exosomes caractérisés par la présence de CD63 et contenant aussi du BMP. Ces résultats permettent d'affirmer la présence de BMP dans des exosomes urinaires et issus de cellules rénales HEK 293. Le BMP pourrait donc être un nouveau marqueur lipidique des EV issues des endosomes, donc des exosomes.

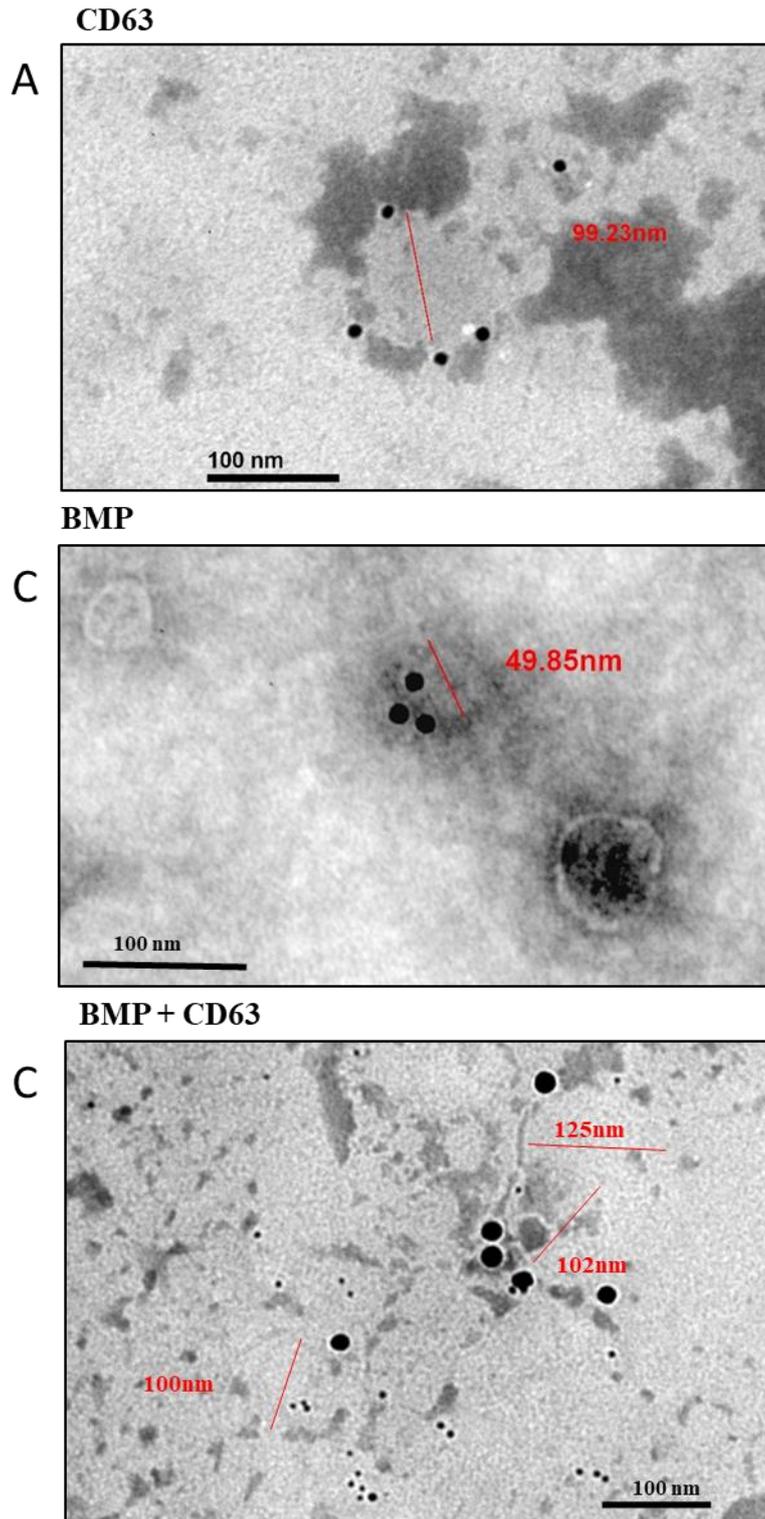


Figure 56 : Marquage immunogold sur des vésicules extracellulaires sécrétées par des cellules HEK 293et purifiées par UC : A : immunogold avec anticorps anti-CD63, taille des billes d'or 10 nm, B : immunogold avec anticorps anti-BMP, taille des billes d'or 10 nm, C : comarquage immunogold avec anticorps anti-CD63, taille des billes d'or 5 nm, et anticorps anti-BMP, taille des billes d'or 15 nm, (Rabia et al., 2020)

Conclusion

En effet, nous montrons pour la première fois directement la présence du BMP dans des EV caractérisées comme des exosomes et non plus par simple association de localisation à partir de préparations d'EV où le BMP était analysé par spectrométrie de masse, puis les EV caractérisées comme exosomes par western blot (Miranda et al., 2018; Miranda & Paolo, 2018). Pendant cette thèse, nous avons pu affirmer la présence de BMP dans des exosomes urinaires mais aussi sécrétés par des cellules rénales HEK 293. Néanmoins, nous n'avons pu établir quelle proportion précise du BMP urinaire total était retrouvée dans les exosomes. Enfin, la localisation spécifique du BMP dans les endosomes en fait un marqueur de choix dans la caractérisation des exosomes. Il faut poursuivre les études sur la présence de BMP dans les exosomes en multipliant les types cellulaires et les marqueurs protéiques exosomaux, pour permettre de confirmer le rôle du BMP comme nouveau marqueur exosomal (Rabia et al., 2020).

De par leur taille (30-200 nm), les exosomes ne peuvent passer le filtre rénal. Donc les exosomes et autres EV retrouvés dans l'urine proviendraient des cellules du tractus (Pisitkun et al. 2004; Merchant et al. 2017). Les macrophages et hépatocytes sont des cellules riches en BMP (Hullin-Matsuda et al., 2009). Il est possible que le BMP retrouvé dans les urines provienne de sa sécrétion par ces cellules dans la circulation sanguine (Grabner et al., 2019; Meikle et al., 2008). Puis il serait capté par les cellules rénales pour être sécrété dans les urines (Rabia et al., 2020). Des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre les modes et mécanismes de sécrétion du BMP dans les biofluides et par quel(s) type(s) cellulaire(s) il est sécrété.

15.3 BMP : nouveau biomarqueur d'exosomes sécrétés par des macrophages RAW 264.7

Nous avons donc recherché la présence de BMP dans les exosomes sécrétés par un autre modèle cellulaire : les macrophages murins en culture de la lignée RAW 264.7 en utilisant différentes techniques de purification (voir Chapitre 8 : Isolement des vésicules extracellulaires) afin de séparer les sous-populations d'EV.

15.3.1 Purification des EV par ultracentrifugation

Dans un premier temps, nous avons utilisé la technique de référence UC pour isoler les EV qui ont ensuite été analysées par Western blot pour déterminer la présence des marqueurs protéiques d'exosomes et par HPLC-MS/MS pour déterminer la présence de BMP.

Pour déterminer les meilleures conditions de sécrétion des cellule RAW, plusieurs temps de sécrétion ont été réalisés (sans changement de milieu) : 48h, 72h et jusqu'à 6 jours. Toutefois, les résultats après 6 jours de sécrétion ne seront pas présentés, la plupart des cellules étant mortes, vraisemblablement en raison de l'appauvrissement en nutriments du milieu « EV free » utilisé pour la sécrétion (8.1.2).

La figure 57 A et B regroupe les résultats de viabilité cellulaire pour 48h et 72h de sécrétion. On constate qu'il n'y a aucune variation de la mortalité cellulaire entre 48h ou 72h de sécrétion (Figure 57 B), indiquant donc que les cellules maintiennent une croissance normale dans le milieu « EV free », néanmoins on constate une tendance à la diminution du nombre de cellules après 72h de sécrétion (Figure 58 A).

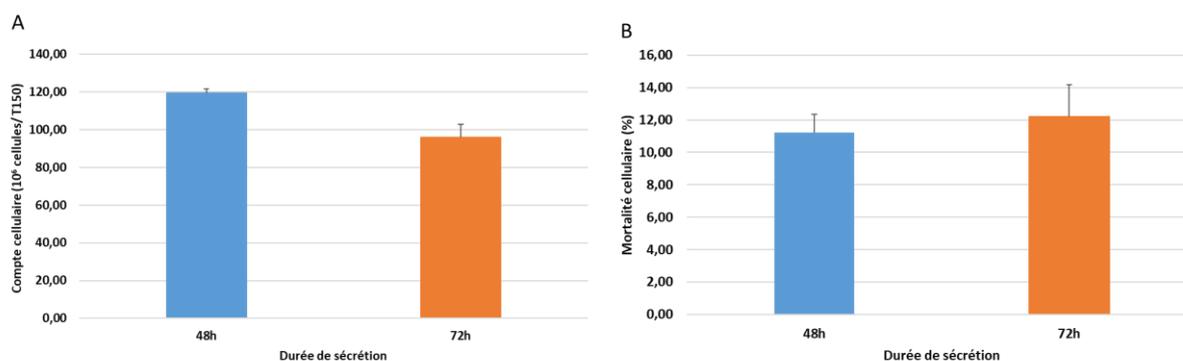


Figure 57: viabilité cellulaire : A :compte cellulaire (10⁶ cellules/ T150) moyenne +/- sem, n=3 ; B : mortalité cellulaire (% de cellules mortes) moyenne +/- sem, n=3 (RAW 264.7)

La quantité de di-oléate BMP, l'espèce majoritaire du BMP dans les cellules RAW (Bouvier et al., 2009) a été analysée au niveau intracellulaire mais aussi dans les vésicules extracellulaires secrétées par les cellules RAW 264.7 après 48h et 72h de sécrétion (figure 58).

La figure 58 A montre l'augmentation du di-oléate BMP intracellulaire à 72h par rapport à 48h de sécrétion. En parallèle, on constate une diminution du di-oléate BMP contenu dans les EV après 72h par rapport à 48h de sécrétion (figure 58 B). Cette augmentation intracellulaire du di-oléate BMP après 72h de culture en milieu EV free pourrait être due à une modification du métabolisme des cellules en lien avec le manque de nutriments du milieu. L'augmentation du BMP intracellulaire dans des conditions de privation a déjà été observée (Grabner et al., 2020; Luquain et al., 2000) ou bien lors de stimulation de l'autophagie (Ilnytska, Lai, et al., 2021).

La diminution de la sécrétion de BMP extracellulaire à 72h peut être soit une conséquence du manque de nutriment nécessitant une redistribution des ressources intracellulaires (par modification des flux lipidiques), soit due à la recapture des EV par les cellules.

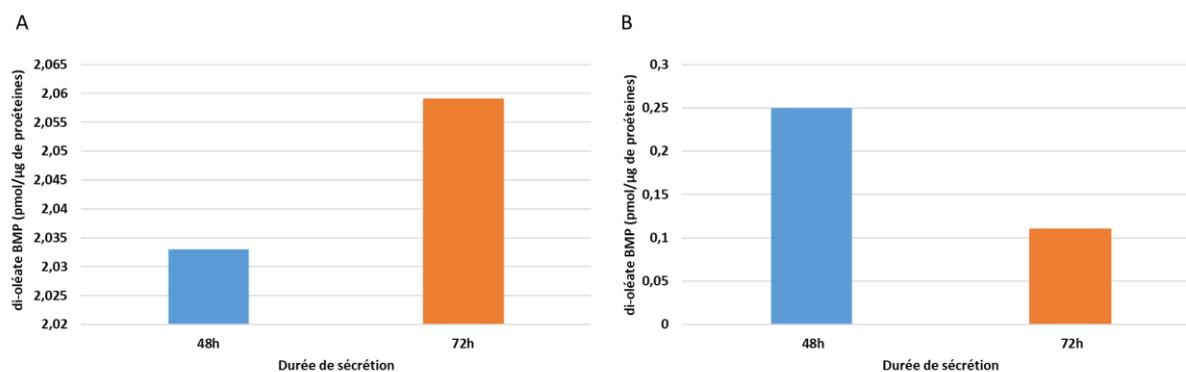


Figure 58 : A : quantité de di-oléate BMP intracellulaire en fonction du temps de sécrétion des cellules RAW 264.7; B : quantité de di-oléate BMP contenu dans les EV obtenues par UC en fonction du temps de sécrétion des cellules RAW 264.7 (analyse du BMP par HPLC-MS/MS, expérience représentative)

Enfin la caractérisation de la présence d'exosomes a été réalisée sur les EV après 48h et 72h de sécrétion (figure 59). Les marqueurs exosomaux utilisés sont ALIX et TSG101. On constate bien un enrichissement de ces marqueurs endosomaux/exosomaux dans les échantillons EV comparativement au faible marquage cellulaire. De plus, on peut observer un marquage plus fort pour ALIX et TSG101 à 48h par rapport au temps 72h, confirmant donc une diminution de la sécrétion exosomale.

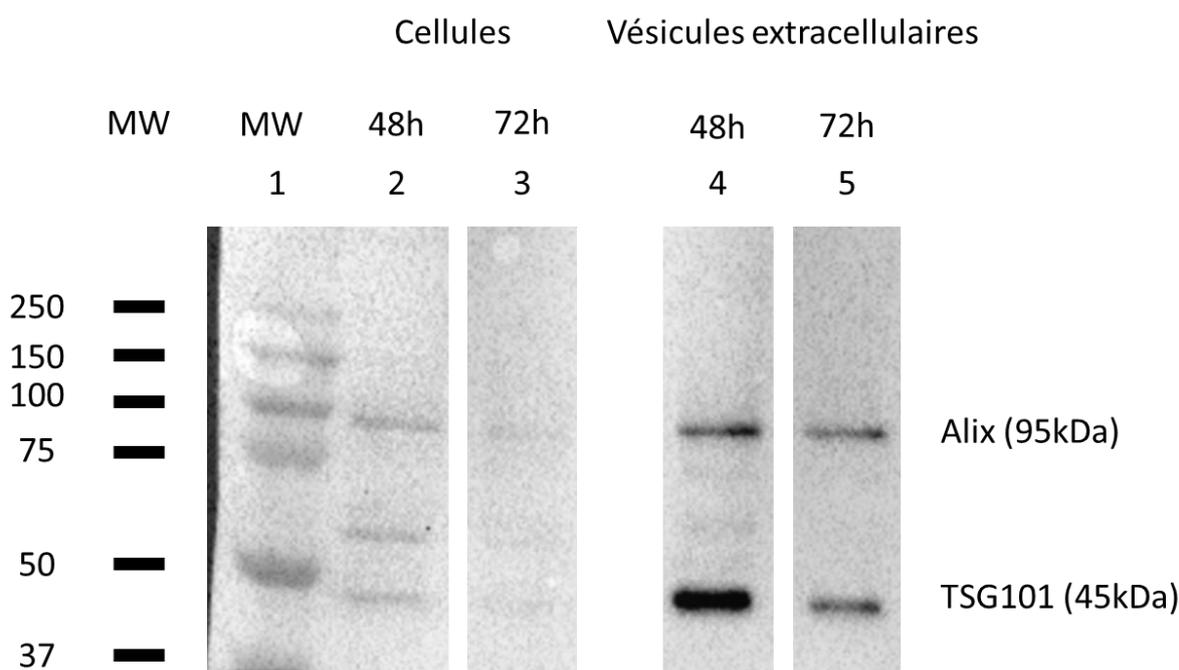


Figure 59 : caractérisation par western blot de la présence des marqueurs exosomaux ALIX et TSG101, dans des EV sécrétées par les cellules RAW 264.7 et purifiées par UC ; dépôt réalisé à protéine égale pour les cellules(48h : 31µg, 72h : 24,4µg), et pour les EV (48h : 8,1µg, 72h : 7,2 µg)

Enfin, le nombre total et la distribution de la taille des vésicules ont été obtenus par analyse du suivi individuel des particules (NTA=*nanoparticle tracking analysis*) avec le NanoSight NS300. Le nombre total d'EV sécrétées par 10^6 cellules a été estimé dans nos conditions de sécrétion à 12.2×10^6 (moyenne de 2 expériences). L'analyse de la distribution de taille montre que 90% des vésicules ont un diamètre inférieur à 210,9 nm, alors que 50% et 10% ont un diamètre inférieur à 117,2 et 75,9 nm, respectivement. Ceci confirme que les EV isolées par UC ont donc des tailles correspondantes aux valeurs attendues (Pegtel & Gould, 2019; Théry et al., 2018).

Pour la suite des expériences, nous avons donc utilisé 48h de sécrétion en cohérence avec les conditions reportées pour différents modèles cellulaires (Forterre et al., 2014, 2014).

15.3.2 Purification des EV par ultracentrifugation et gradient de sucrose (UC-G)

L'UC-G est une technique qui permet de purifier les EV isolées en fonction de leur densité, grâce à un gradient de sucrose (dans notre cas). Pour cela, entre 800 et 900mL de surnageant de culture ont été utilisés. Les EV isolées après UC ont été déposées sur un gradient de sucrose. 12 fractions sont récoltées. Sur ces fractions, le BMP, la quantité totale de protéines et les marqueurs exosomaux ont été analysés. La figure 60 regroupe les résultats d'un gradient représentatif de 3 expériences (n=3). Lors de nos analyses, nous avons constaté une certaine variation dans l'ordre d'éluion des fractions vraisemblablement liée à la température de réalisation des gradients (hiver et été), Mais aucune différence n'a été observée sur le profil général des gradients qui montre 2 sous-populations d'EV de faible (fraction 3) et haute (fraction 7) densité contenant des marqueurs exosomaux. Ces 2 sous-populations ont déjà été observées dans la littérature (Willms et al., 2016). On observe aussi que le BMP co-élué avec les marqueurs exosomaux, suggérant donc que le BMP est bien associé aux exosomes.

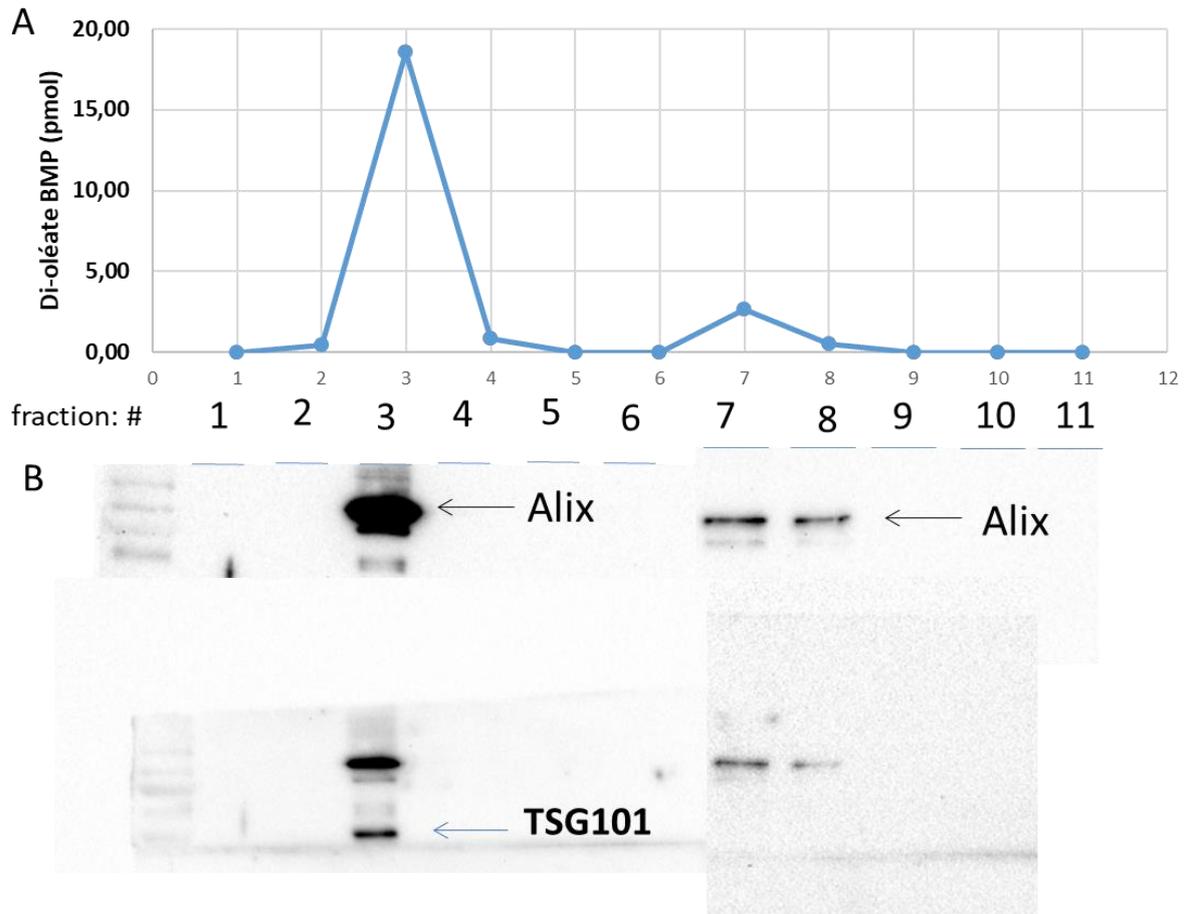


Figure 60: A: quantité de di-oléate BMP dans les différentes fractions obtenues à la suite du gradient de sucrose des EV sécrétées pendant 48 h par les cellules RAW 264.7 (analyse par HPLC-MS/MS); B : caractérisation de la présence d'exosomes par western blot, dans les différentes fractions du gradient de sucrose à l'aide des marqueurs exosomaux ALIX (95kDa) et TSG101(45kDa) ; dépôts réalisés à protéines équivalentes : fraction : 1, 2, 3, 4, 5, 9, 10, 11 =0 μ g, fraction 3 =19,3 μ g, fraction 6=1,35 μ g, fraction 7=20,3 μ g, fraction 8=20,4 μ g

Les EV avant et après gradient ont été observées par MET (microscopie électronique à transmission) (figures 61 et 62). On constate que le gradient permet bien d'enrichir en vésicules et d'augmenter la pureté de l'échantillon. De plus, on peut observer la présence de BMP dans des EV grâce à un marquage dirigé contre le BMP (figure 62). Ces résultats montrent donc la présence de BMP dans des EV caractérisés comme des exosomes. On remarque aussi sur les clichés de MET la distribution de taille de vésicules de 30 à 150nm correspondant bien aux valeurs attendues pour des exosomes (Gardiner et al., 2016; Théry et al., 2018).

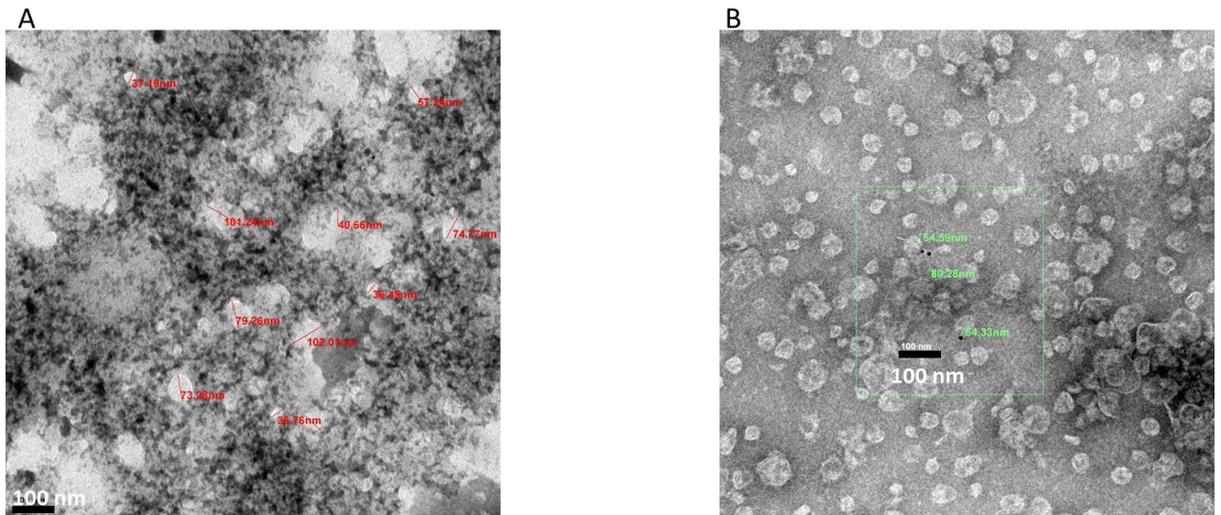


Figure 61: comparaison de la pureté et de l'enrichissement en EV avant et après gradient de sucrose des EV sécrétées pendant 48h par les cellules RAW 264.7; A : échantillon d'EV avant gradient de sucrose ; B : fraction d'un gradient de sucrose enrichie en marqueurs exosomaux et BMP. Voir ci-dessous la partie agrandie (cadre vert)

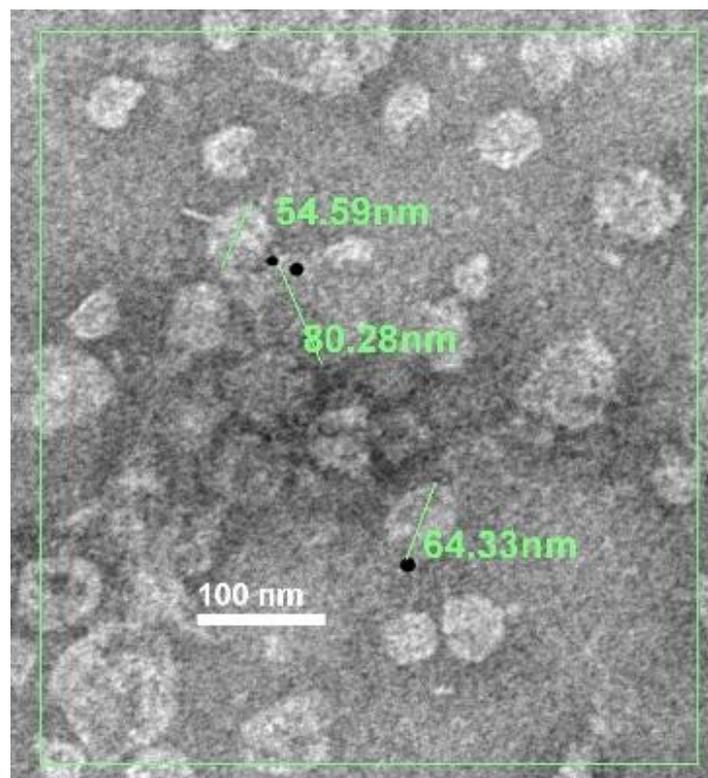


Figure 62: immunogold dirigé contre le BMP sur une fraction riche en BMP après gradient de sucrose des EV sécrétées pendant 48h par les cellules RAW 264.7, (cf figure 60 fraction n°3), taille des billes 10nm

15.3.3 Purification des EV par ultrafiltration-chromatographie d'exclusion (UF-SEC)

Dans un premier temps, le surnageant de culture est concentré par ultrafiltration (Amicon 100kDa, Partie 8.1.6), permettant de passer de 200mL à moins de 1mL. Ce concentrat de surnageant est ensuite déposé sur une colonne de chromatographie d'exclusion IZON qEV. Cette colonne permet de séparer les EV en fonction de leur taille et d'éliminer les contaminants (Partie 8.1.6). On observe après analyse par Western blot la présence des marqueurs d'exosomes : ALIX, mais aussi plus faiblement CD63 (figure 63). Ces marquages permettent d'affirmer la présence d'exosomes dans l'échantillon d'EV purifiées. L'analyse du BMP par LC-MS/MS permet de montrer une co-élution du BMP et des marqueurs d'exosomes dans les fractions analysées (figure 64).

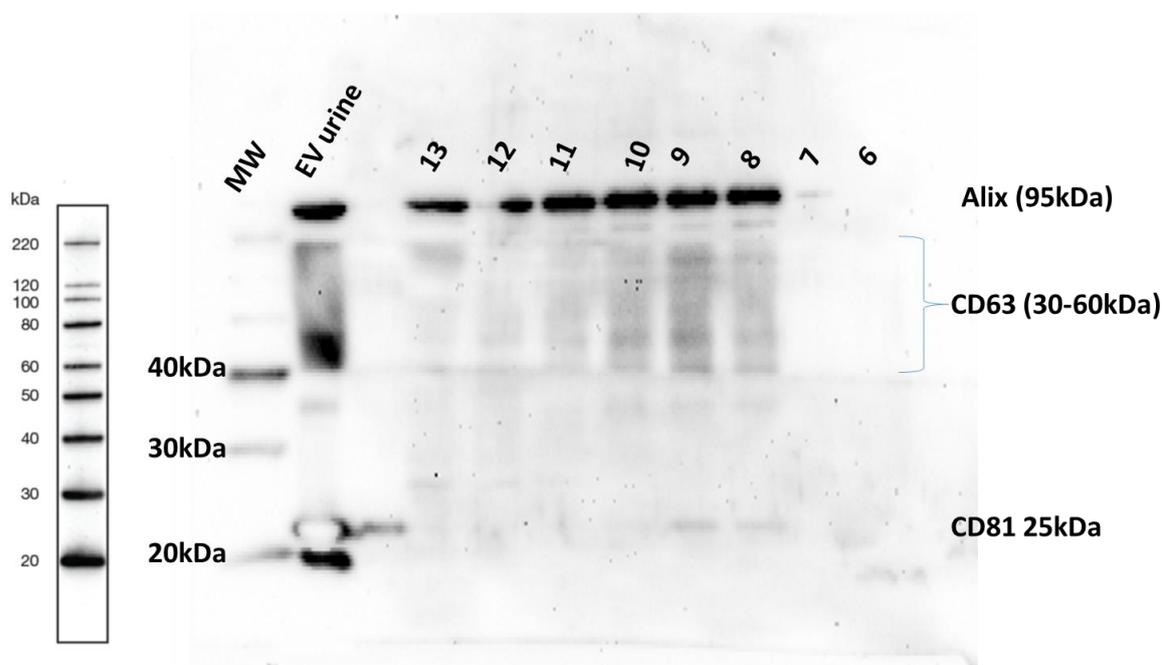


Figure 63: caractérisation de la présence d'exosomes par western blot dans les fractions de la SEC obtenu à partir d'EV sécrétées pendant 48h par les cellules RAW 264.7, marqueurs exosomaux utilisés ALIX, CD63 et CD81. (Western blot ; représentatif de 3 expériences), EV urines = EV urinaires purifiées (contrôle positif), dépôts réalisés à volume équivalent : 15µL

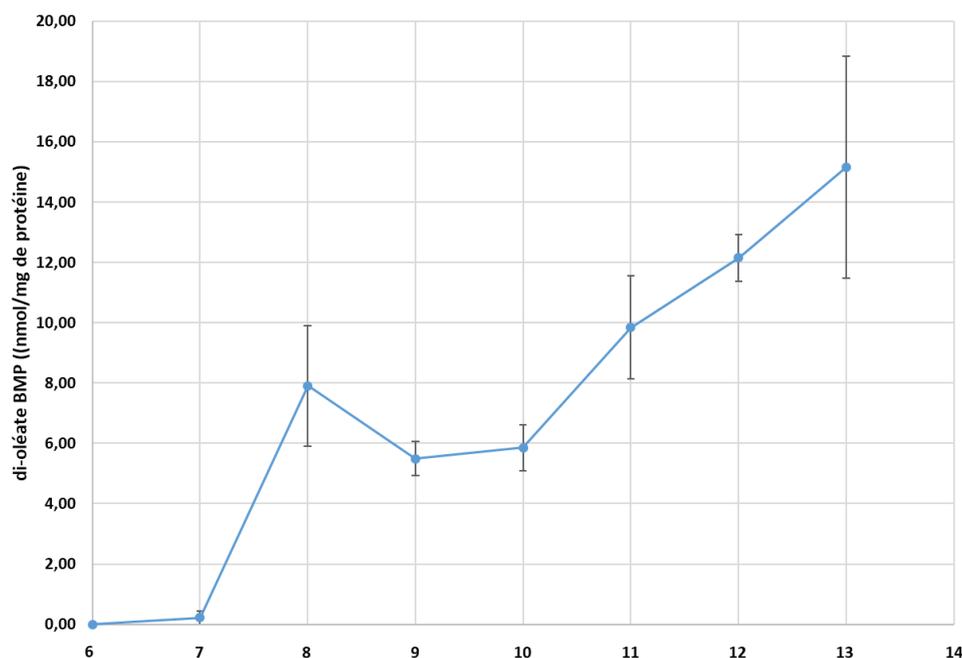


Figure 64 : quantité de di-oléate BMP (nmol/mg de protéines) quantifié par HPLC-MS/MS des différentes fractions d'éluion de la SEC (n=3), moyenne +/- sem, EV obtenues par UF-SEC (RAW 264.7)

Cette combinaison de technique UF+ SEC est très intéressante car elle permet de concentrer le volume de notre échantillon initial d'au moins 200 fois, et donc de réduire les volumes initiaux de surnageant de culture nécessaires à l'analyse ultérieure. Néanmoins dans nos conditions opératoires, les marqueurs exosomaux sont répartis sur plusieurs fractions diluant au final l'échantillon purifié d'EV. Ainsi au lieu d'avoir un échantillon d'environ 1mL avant purification, 6 fractions de 500µL sont obtenues, soit 3mL final, diluant donc trois fois l'échantillon et nécessitant de concentrer ultérieurement ces fractions purifiées (partie 8.1.6). Toutefois, la co-élution du BMP et des protéines ALIX et CD63 confirme bien la présence de BMP dans les exosomes sécrétés par les cellules RAW 264.7.

15.3.4 Purification des EV par ultrafiltration-ultracentrifugation (UF-UC)

Cette combinaison de technique UF + UC permet de concentrer l'échantillon comme précédemment mais au lieu de faire une séparation par la taille des EV, des ultracentrifugations successives sont réalisées comme pour la méthode standard. Ceci permet de ne pas diluer l'échantillon contrairement à la SEC mais avec une moindre pureté des EV obtenues (Ayala-Mar et al., 2019; Jiang et al., 2020).

La Figure 65 compare les quantités de di-oléate BMP analysé par LC-MS/MS dans les cellules RAW264.7 mais aussi au niveau des vésicules extracellulaires après 48h de sécrétion.

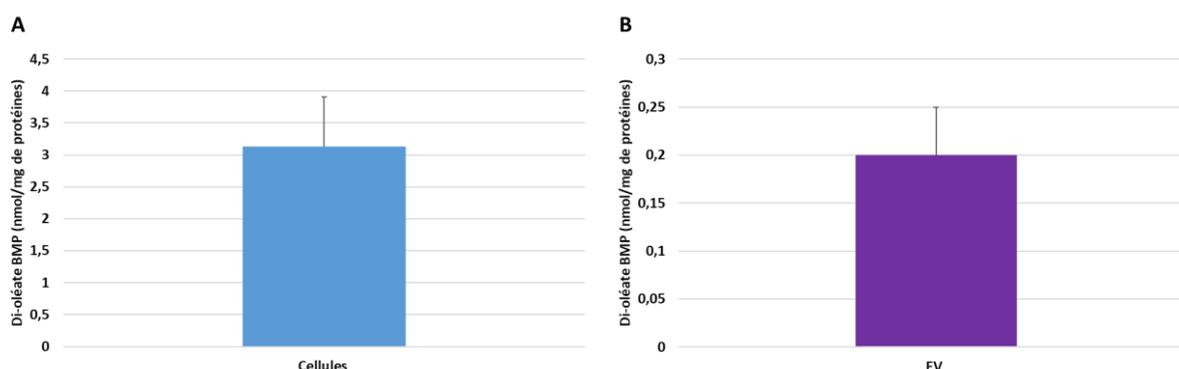


Figure 65 : comparaison de la quantité de di-oléate BMP exprimé en nmol/mg de protéines (A) dans les cellules RAW 264.7 et (B) dans les EV sécrétées après 48h et purifiées par UF-UC. Moyenne +/- sem, n=3, valeur protéines : cellules : 66,430 +/- 22,543 μ g; EV : 138,56 +/- 16,58 μ g.

La figure 66 permet d'observer la présence des marqueur exosomaux ALIX et TSG101 dans des EV sécrétées par des cellules RAW264.7. Cette technique permet de confirmer la présence de BMP dans les exosomes sécrétés par des macrophages RAW264.7.

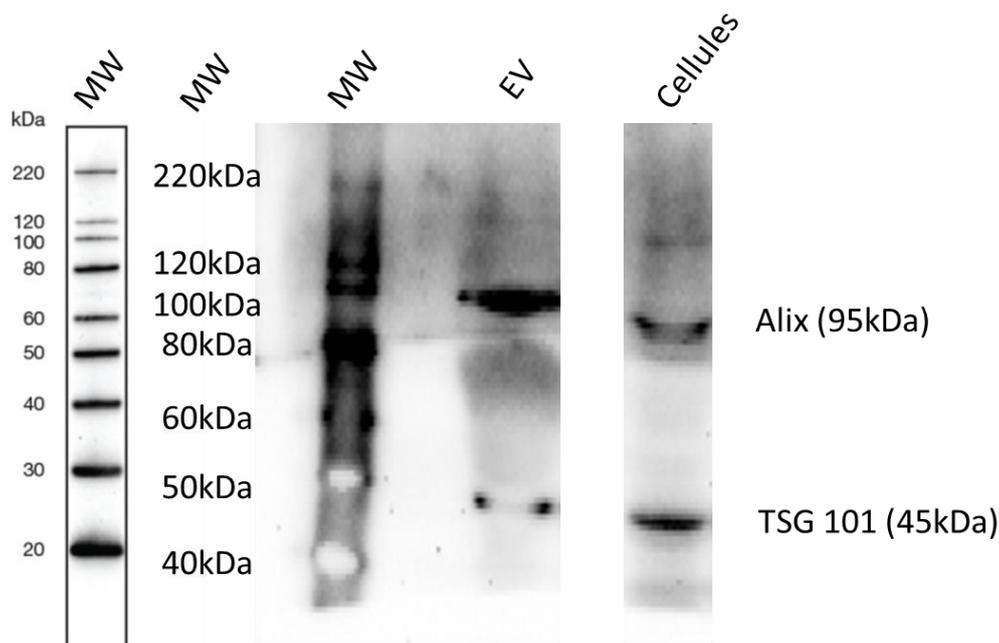


Figure 66 : caractérisation par western blot de la présence des marqueurs exosomaux ALIX et TSG101 dans des EV sécrétées par les cellules RAW 264.7 et purifiées par UF-UC, dépôts réalisés à volume équivalent : 15 μ L

Pour aller plus loin, cette technique a été utilisée pour réaliser des marquages par immunogold et observation par microscopie électronique pour visualiser la colocalisation du BMP avec des marqueurs exosomaux. Les marqueurs exosomaux utilisés sont les protéines ALIX et CD63, ceci permettant de prouver physiquement la présence de BMP dans les exosomes.

Dans la figure 67, se trouvent les résultats de l'immunogold dirigé contre le BMP et CD63. Dans la figure 67 A, il est observé la présence d'EV contenant le BMP. Dans cette préparation d'EV, la présence d'exosomes est caractérisée par CD63 (figure 67 B). Les résultats du double immunogold sont présentés dans la figure 67 C. On observe une vésicule marquée par plusieurs billes de 5nm représentant CD63, et des billes de 15 nm représentant le BMP.

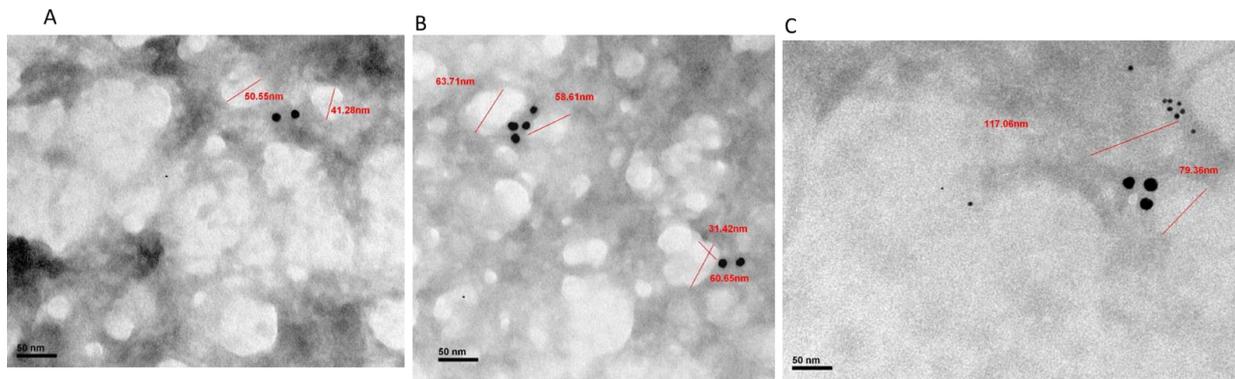


Figure 67 : A : immunogold avec l'anticorps anti-BMP (bille de 10nm) ; B : immunogold avec l'anticorps anti-CD63 (bille de 10nm) ; C : comarquage immunogold avec l'anticorps anti-BMP (bille de 15nm) et avec l'anticorps anti-CD36 (bille de 5nm), EV sécrétées par les cellules RAW 264.7 et purifiées par UF-UC

La figure 68 A permet la visualisation d'EV contenant le BMP. Dans la figure 68 B, le marquage est dirigé contre ALIX, permettant d'observer la présence d'exosomes. Les résultats du double immunogold sont présentés dans la figure 68 C. On observe une vésicule marquée par plusieurs billes de 5nm représentant ALIX, et des billes de 15 nm représentant le BMP.

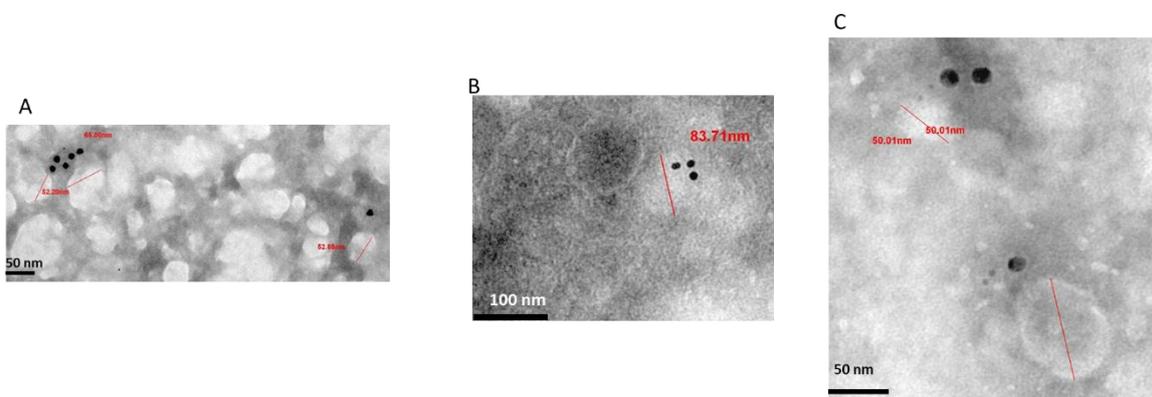


Figure 68 : A : immunogold avec l'anticorps anti-BMP (bille de 10nm) ; B : immunogold avec l'anticorps anti-ALIX (bille de 10nm) ; C : comarquage immunogold avec l'anticorps anti-BMP (bille de 15nm) et avec l'anticorps anti-ALIX (bille de 5nm), EV sécrétées par les cellules RAW 264.7 et purifiées par UF-UC

Enfin le nombre total et la distribution de taille des vésicules ont été analysés par NTA avec le NanoSight NS300. Le nombre total d'EV sécrétées par 10^6 cellules a été estimé dans nos conditions de sécrétion à 42.9×10^6 (moyenne de 2 expériences différentes). L'analyse de la distribution de taille montre que 90% des vésicules ont un diamètre inférieur à 217,9 nm alors que 50% et 10% ont un diamètre inférieur à 131,8 et 96,3 nm, respectivement. Ceci indique que la taille des EV isolées par UF+UC correspond bien aux valeurs attendues pour des EV (Pegtel

& Gould, 2019; Théry et al., 2018) et est assez similaire à celle obtenue par UC (voir plus haut).

Tous ces résultats permettent d'affirmer la présence de BMP dans les exosomes secrétés par les cellules RAW 264.7.

Conclusion

Le BMP est bien présent dans des exosomes secrétés par des cellules RAW 264.7. En effet, l'utilisation de différentes techniques d'isolement des EV a permis d'observer par association la présence de BMP dans des préparations d'EV contenant des exosomes. La microscopie électronique a permis de confirmer la colocalisation de BMP avec des marqueurs d'exosomes dans des EV secrétées par les RAW 264.7.

Lors d'études préliminaires, nous avons observé une diminution de la quantité de BMP secrétée après 72h de sécrétion. Cette diminution était associée à une quantité 10 fois plus importante de protéines secrétées à 72 h par rapport à 48h (données non montrées). De plus, le marquage immunologique (western blot) des marqueurs exosomaux ALIX et TSG101 était lui aussi diminué après 72h de sécrétion par rapport à 48h (pour des quantités de protéines analysées similaires). Ceci suggèrerait donc la possible diminution de sécrétion des exosomes enrichis en BMP au cours du temps.

Le tableau 37 compare les quantités de di-oléate BMP retrouvé dans les EV purifiées à la suite des différentes techniques pour un même volume théorique (200 ml) de surnageant de culture des RAW 264.7. L'UC seule n'est pas présentée car elle a été utilisée principalement pour les études préliminaires et en nombre limité (voir Figure 48). L'UF-SEC permet le meilleur rendement en récupérant environ 140 pmol de di-oléate BMP alors que l'UF-UC ne permet de récupérer qu'environ 18% (25 pmol) et l'UC-G que 5% (7,45 pmol). Néanmoins, ces rendements totaux sont à relativiser si on considère les concentrations nécessaires pour les analyses ultérieures et la pureté des vésicules extracellulaires. En effet, l'UF-UC permet d'obtenir des EV issues d'un seul culot final et en concentration suffisante pour les analyses protéiques et lipidiques ultérieures. Par contre pour l'UF-SEC, l'élution du BMP est répartie dans 6 fractions nécessitant leur concentration ultérieure pour analyser leur composition et leur

pureté. Enfin on constate que l'UC-G est la technique avec le plus faible rendement mais permettant de récupérer des EV plus pures que par UF-UC.

Au vu de ces résultats et des critères d'analyse, nous avons décidé d'utiliser l'UF-UC, méthode la plus rapide et la moins coûteuse tout en ayant un rendement plutôt satisfaisant.

Tableau 37 : tableau comparatif de la quantité de di-oléate BMP récolté en fonction du volume de surnageant de culture, moyenne +/- sem ; UF-UC : n=6, UF-SEC : n=3, UC-G : n=3

techniques utilisées	UF-UC			UF-SEC			UC-G		
di-oléate BMP en pmol (EV)	24,62	±	4,87	141,59	±	13,76	7,45	±	1,36
volume de surnageant de culture de départ (mL)	200			200			200		
BMP en pmol/mL de surnageant	0,12	±	0,024	0,71	±	0,07	0,04	±	0,01

15.4 Isomérisie du BMP intracellulaire et extracellulaire

Le BMP dans les conditions physiologiques, c'est-à-dire au pH acide des endolysosomes, a ses acides gras estérifiés en position *sn*-2 et *sn*-2' (ou $\beta\beta'$) (figure 69 A).

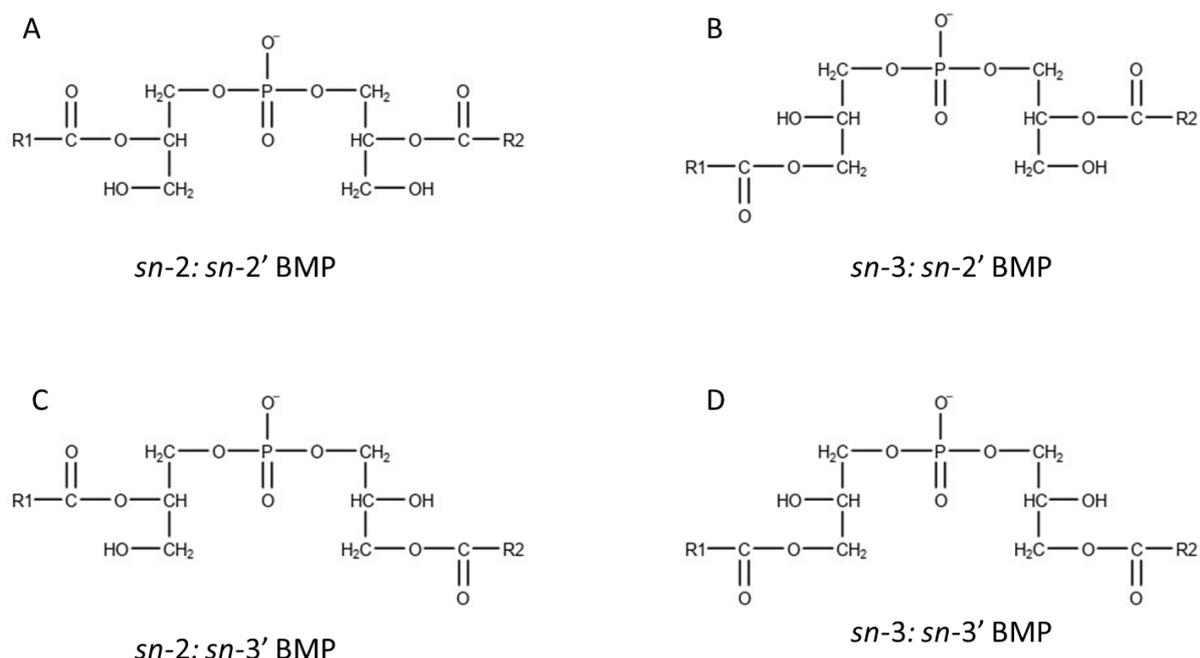


Figure 69 : structure des différents isomères du BMP ; A: *sn*-2:*sn*-2' BMP, B: *sn*-3:*sn*-2' BMP, C: *sn*-2:*sn*-3' BMP; D: *sn*-3:*sn*-3' BMP

Néanmoins, les chromatogrammes après analyse par HPLC-MS/MS montrent 3 pics correspondant aux 3 isoformes de BMP (figures 70 et 71). Grâce à l'utilisation d'un standard commercial ayant principalement ses acides gras en position *sn*-3, *sn*-3' (ou $\alpha\alpha'$), avec toutefois

30% d'isomères de position (référence *Avanti Polar Lipids* 857131P), nous pouvons repérer les 3 isomères de BMP éluant successivement de la colonne en phase inverse C18 (partie 9.3.1) : *sn-2:sn-2'*, puis les isomères *sn-2:sn-3'* / *sn-3:sn-2'* qui co-éluent et *sn-3:sn-3'* (Figure 70 et 71).

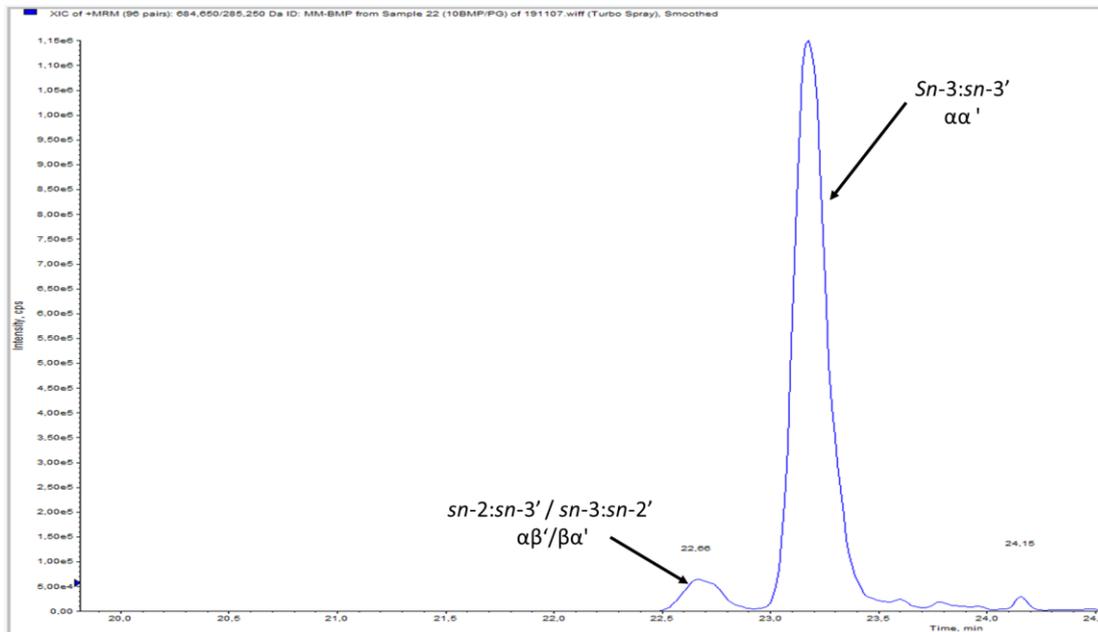


Figure 70: chromatogramme de l'espèce di-myristate BMP (étalon interne dans l'analyse du BMP)(HPLC-MS/MS)

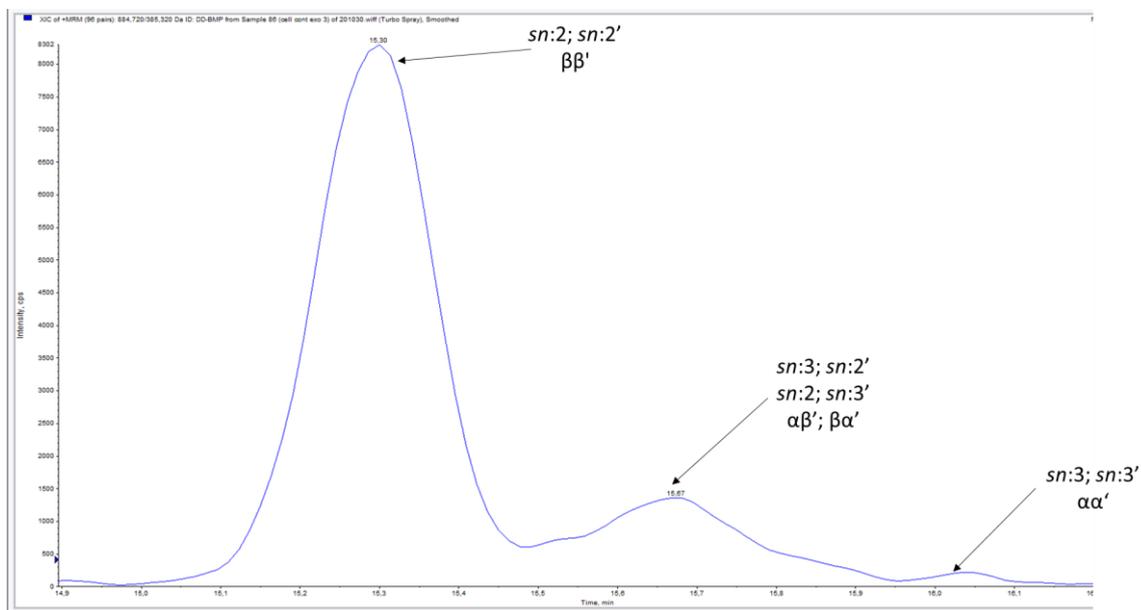


Figure 71 : chromatogramme de l'espèce di-DHA BMP dans les cellules RAW 264.7(HPLC-MS/MS)

Lors de l'analyse du BMP intracellulaire (macrophages RAW 264.7, fibroblastes) et dans les EV de macrophages RAW et d'urine, on observe une modification de l'isomérisation du BMP (figure 72). Dans les cellules, le BMP est majoritairement en position *sn-2:sn-2'*. Par

contre dans les EV sécrétées par les cellules RAW, il est principalement en position $sn-3 :sn-3'$. De plus dans les urines, le BMP est majoritairement en position $sn-2:sn-2'$, $sn-2 :sn-3' / sn-3 :sn-2'$. Cette différence d'isomérisation pourrait être due à une modification du pH de l'environnement du BMP. En effet, les travaux non publiés du Dr Peter Greimel (institut RIKEN, communication personnelle) montrent le réarrangement spontané des acides gras du BMP en fonction du pH dans un milieu méthanolique. A un pH acide, le BMP garde ses acides gras en position $sn-2:sn-2'$, mais à un pH neutre, il y a un réarrangement spontané des acides gras en position $sn-3:sn-3'$ qui est thermodynamiquement plus stable.

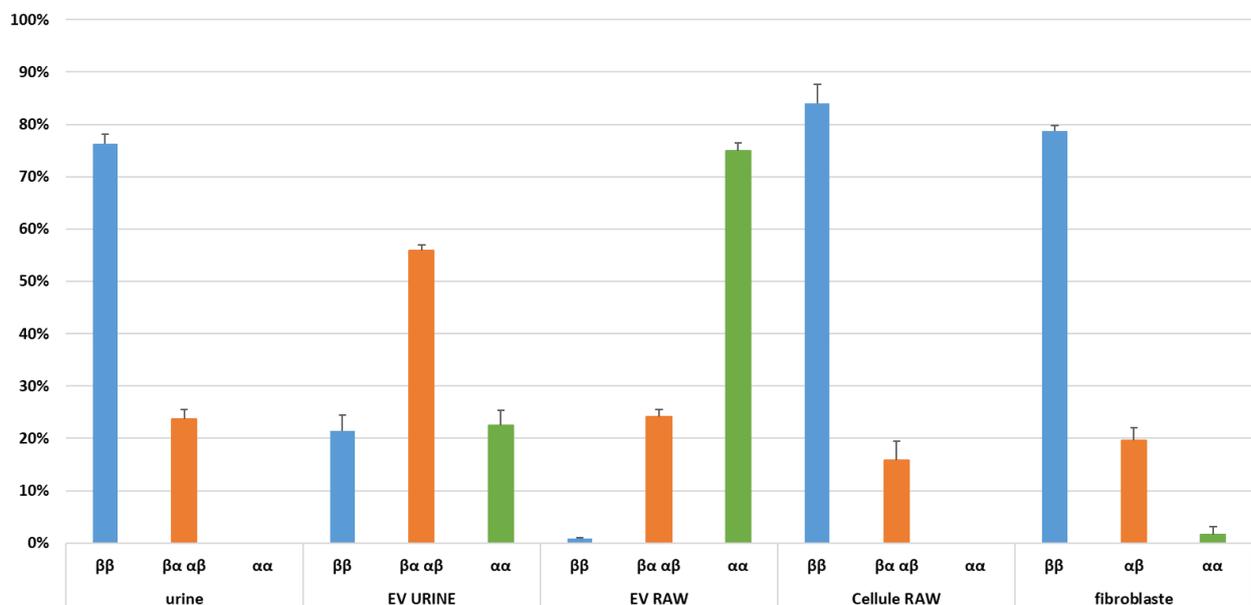


Figure 72 : % isomérisation du BMP en fonction de l'échantillon ; urine : isomérisation du di-DHA BMP n=42 ; EV urine : isomérisation du di-DHA BMP n = 6. EV RAW 264.7 : isomérisation du di-oléate BMP n= 6 ; cellule RAW 264.7 : isomérisation du di-oléate BMP n=6 ; Fibroblaste : isomérisation du di-DHA BMP n=6., EV RAW 264.7 obtenu par UF-UC, EV urine obtenu par UC-DTT, analyse du BMP par HPLC-MS/MS

Ce changement d'isomérisation en fonction du pH permettrait donc d'indiquer la position du BMP dans les feuillets des membranes biologiques des EV, des ILV mais aussi des endolysosomes. Le lumen des endolysosomes a un pH acide alors que le pH du lumen des ILV lors de leur formation est neutre car elles contiennent du cytosol (Gruenberg, 2020). Le BMP intracellulaire étant en $sn-2:sn-2'$, il se trouverait au niveau du feuillet interne de la membrane limitante des endolysosomes et au niveau des feuillets externes des ILV comme suggéré par les travaux de Kobayashi *et al* (Gruenberg, 2020; Kobayashi et al., 1999). De plus, lors du processus de *back fusion* dans les endolysosomes (Falguières et al., 2009; Gruenberg, 2020; Le Blanc et al., 2005), le BMP se retrouverait au niveau du feuillet externe de la membrane limitante des endolysosomes, permettant ainsi de comprendre la présence des isomères de BMP $sn-2:sn-3' / sn-3:sn-2'$ et $sn-3:sn-3'$ dans les chromatogrammes (figures 70 et 71) . Toutefois,

nous ne pouvons ignorer la possibilité de migration des chaînes acyles lors de l'extraction et/ou l'analyse du BMP comme démontré par Kobayashi *et al* (Kobayashi et al., 2002), ainsi que la perméabilité des membranes aux protons qui pourrait donc modifier en fonction du temps le pH interne des ILV et des exosomes (Bebelman et al. 2020).

Dans les EV, on constate une différence d'isomérisation du BMP en fonction du type d'échantillon et vraisemblablement en lien avec le pH de l'échantillon. Dans les EV isolées des surnageants de culture cellulaire qui ont un pH neutre, on observe majoritairement l'isomère *sn-3:sn-3'* du BMP ce qui est attendu pour un milieu neutre. Par contre, les EV isolées des urines qui ont un pH plutôt acide compris entre 4,5 et 6,5, présentent une isomérisation du BMP différente : *sn-2:sn-2'*, *sn-2:sn-3'* / *sn-3:sn-2'*.

Ces données suggèrent donc que dans les EV/ exosomes, le BMP serait plutôt sur le feuillet externe de leur membrane puisque sensible aux variations du pH du milieu (figure 73).

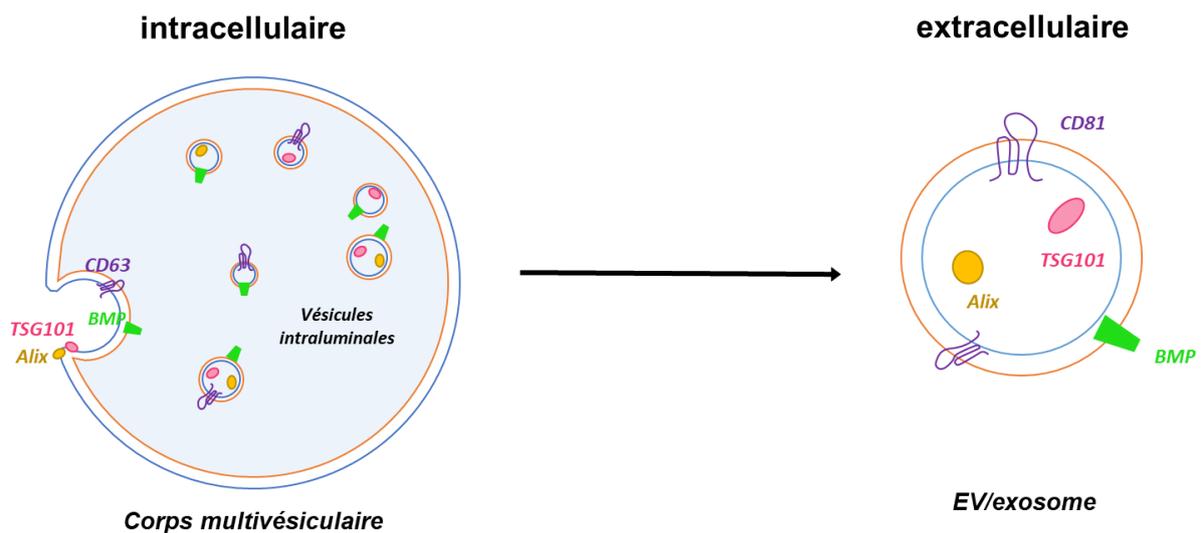


Figure 73 : localisation membranaire du BMP au niveau des vésicules intraluminales (intracellulaire) et des EV (extracellulaire)

Conclusion générale

Nous avons pu montrer pour la première fois la présence physique de BMP dans les exosomes de différents modèles :

- dans des exosomes isolés d'urine humaine (Rabia et al., 2020)
- dans des exosomes sécrétés par les cellules rénales HEK 293 (Rabia et al., 2020)
- dans des exosomes sécrétés par les macrophages RAW 264.7

Nous ne pouvons néanmoins pas conclure quant à la proportion d'exosomes contenant du BMP et si le BMP sécrété est présent exclusivement dans les exosomes. En effet, il pourrait être véhiculé par d'autres modes de transport (Grabner et al., 2019; Meikle et al., 2008). Toutefois, le BMP étant localisé uniquement dans les endolysosomes, il serait un très bon marqueur lipidique pour la caractérisation des exosomes. En effet, les marqueurs protéiques utilisés actuellement se retrouvent dans d'autres compartiments que dans les endosomes (Pegtel & Gould, 2019), le BMP serait donc un choix plus pertinent. Pour finaliser la caractérisation du BMP comme marqueur lipidique des exosomes, il faut donc poursuivre sa détection dans des exosomes sécrétés par d'autres types cellulaires.

Lors des études préliminaires des vésicules extracellulaires sécrétées par les RAW 264.7, la diminution de la quantité de BMP sécrété et des marqueurs exosomaux ALIX et TSG101 était observée après 72h par rapport à 48h de sécrétion suggérant donc une diminution de la sécrétion d'exosomes contenant du BMP. Néanmoins, la quantité totale de protéines sécrétées pendant 72h était beaucoup plus importante que celle à 48h (données non montrées). Si la quantité de protéines de préparations d'EV purifiées reflète bien la quantité de vésicules présentes, il y aurait en fonction du temps une augmentation de la sécrétion de vésicules extracellulaires de composition différente, avec en particulier des exosomes sans le BMP, ALIX et TSG101. Les exosomes sont des vésicules hétérogènes (Pegtel & Gould, 2019; Théry et al., 2018; van Niel et al., 2018). La diminution du BMP, ALIX et TSG101 suggèrerait la mise en jeu de mécanismes différents en fonction du temps de sécrétion des exosomes. En effet, ils sont tous les 3 partenaires avec le complexe ESCRT dans la vésiculisation des endolysosomes pour la formation des ILV (Gruenberg, 2020; Huotari & Helenius, 2011; Scott et al., 2014). De plus, la diminution de sécrétion du BMP est parallèle d'une augmentation de la quantité de son

contenu intracellulaire après 72h de sécrétion qui pourrait être liée à une modification des flux métaboliques au niveau de ls endolysosomes. En effet, l'augmentation du BMP intracellulaire serait associée dans ce cas à l'augmentation de l'autophagie lié au manque de nutriments en milieu conditionné (Grabner et al., 2020; Ilnytska, Lai, et al., 2021; Miranda et al., 2018). Il est possible que la diminution du BMP, ALIX et TSG101 dans les exosomes soit due à une diminution de la voie de sécrétion de cette population d'exosomes dépendante du complexe ESCRT au profit d'une augmentation du flux autophagique et de la fusion autophagosome/lysosome. Il faut donc poursuivre les études sur le manque de nutriment, l'augmentation du BMP intracellulaire et la sécrétion du BMP pour mieux comprendre les mécanismes mis en jeu.

Enfin, grâce à la HPLC-MS/MS, nous avons pu étudier les différentes isoméries du BMP. L'isomère *sn-2:sn-2'* est l'isomère qui permet la fusion membranaire (Matsuo et al., 2004). Nous avons pu confirmer que dans les cellules de macrophages et de fibroblastes, le BMP est en majorité sous la forme *sn-2:sn-2'*. Cette forme est conservée grâce au pH acide des compartiments endolysosomaux. Lors de l'analyse du BMP extracellulaire, on observe une modification de l'isomérie du BMP qui semble dépendante du pH du milieu extracellulaire. Dans les urines qui ont un pH faiblement acide, le BMP conserve sa forme *sn-2:sn-2'*. Mais dans les EV purifiées de ces urines, le BMP est majoritairement sous forme *sn-2:sn-3'*, *sn-3:sn-2'*. Ce changement d'isomérie pourrait être dû à la technique d'isolement des vésicules qui sont stockées après purification dans du PBS à pH neutre. Dans les EV sécrétées par les macrophages RAW, le BMP est majoritairement sous forme *sn-3:sn-3'* car les vésicules se trouvent dès le départ dans le surnageant de culture qui est à un pH neutre. Cette différence d'isomérie dépendante du pH donnerait des indications sur la localisation du BMP dans les feuillet membranaires des ILV et EV qui est encore largement inconnue. En effet en contact avec un milieu acide, le BMP sera sous forme *sn-2:sn-2'*, alors qu'à un pH neutre ou basique, il sera sous forme *sn-3:sn-3'*. Dans les endolysosomes, le BMP se trouve majoritairement au niveau des feuillet externes des ILV (Kobayashi et al., 1998). Donc il est normal de le trouver en position *sn-2:sn-2'* puisqu'en contact avec un pH acide. Pour les vésicules extracellulaires du moins au temps précoce de leur formation (Gruenberg, 2020; Falguières et al., 2009), il se trouverait aussi sur le feuillet externe. Le BMP étant présent uniquement dans les endolysosomes, il permettrait donc de prouver l'origine endosomale des vésicules extracellulaires et donc de les caractériser en tant qu'exosomes. Il faut néanmoins poursuivre

des études sur la localisation exacte du BMP dans les feuillettes membranaires des endolysosomes, ILV et EV. En effet, il permettrait peut-être aussi la sortie des vésicules extracellulaires (Subra et al., 2007).

Chapitre 16 : Implication du BMP dans la régulation du trafic endosomal des lipides

Introduction

Le BMP est impliqué dans l'homéostasie lipidique cellulaire. D'une part, il participe au catabolisme lipidique en stimulant l'activité de certaines hydrolases (voir partie 5.5.3) (Abe & Shayman, 2009; Hullin-Matsuda et al., 2009; Linke, Wilkening, Lansmann, et al., 2001; Linke, Wilkening, Sadeghlar, et al., 2001). De plus, il participe au trafic lipidique cellulaire. Il participe à la sortie du cholestérol des endosomes tardifs via l'association avec différents partenaires protéiques, comme les protéines NPC2 (McCauliff et al., 2019) et ORP11 (Arnal-Levron et al., 2019) par exemple. Il jouerait aussi un rôle dans la sécrétion exosomale (Subra et al., 2007). Enfin, il jouerait aussi un rôle d'antioxydant. La coopération avec la protéine ORP11 permettrait de limiter l'apoptose liée à un excès d'oxystérols (Arnal-Levron et al., 2019). Son enrichissement en acides gras polyinsaturés dont le DHA, participerait aussi à ce rôle d'antioxydant (Bouvier et al., 2009).

Le BMP joue un rôle dans la perméabilité endolysosomale. En condition physiologique, le BMP se trouve dans un milieu acide (endolysosomes), sous la forme *sn-2:sn-2'* (Tan et al., 2012). Cette forme lui permet de jouer son rôle de fluidifiant des membranes et d'aider à la formation de vésicules (Matsuo et al., 2004), et donc d'augmenter la perméabilité endolysosomale (Carrière et al., 2020; Matsuo et al., 2004). Lors d'une alcalinisation du pH endolysosomal, le BMP se retrouve sous la forme *sn-3:sn-3'* (Carrière et al., 2020), qui ne lui permet plus de jouer son rôle de fluidifiant des membranes (Matsuo et al., 2004). Dans beaucoup de LSD (génétiques ou médicamenteuses) le BMP se retrouve augmenté (Hullin-Matsuda et al., 2009; Meikle et al., 2008). Cette augmentation peut être bénéfique comme délétère. En effet si la LSD n'entraîne pas une modification du pH endosomal, le BMP se trouve

sous la forme *sn-2:sn-2'*, il jouera donc son rôle de fluidifiant des membranes. Dans ce cas-ci l'augmentation du BMP cellulaire, pourrait être bénéfique en participant au dégorgeement des endolysosomes. Mais si la LSD entraîne une alcalinisation du pH endolysosomal, l'augmentation du BMP serait délétère. En effet il se trouverait sous la forme *sn-3:sn-3'*, et perdrait ses propriétés fusogéniques. Ceci entraînerait une diminution de la perméabilité endolysosomale, dans ce cas le BMP pourrait participer à l'engorgement des endolysosomes. Néanmoins dans le cas des infections virales la forme *sn-3:sn-3'* serait bénéfique, car elle limiterait la propagation virale, en séquestrant les virus dans les compartiments endolysosomaux (Carrière et al., 2020; Luquain-Costaz et al., 2020).

Au vu de ces données nous avons étudié le rôle du BMP dans le dégorgeement endosomal via les exosomes. Pour cela, nous avons utilisé différents modèles cellulaires et méthodes de stimulation : les macrophages RAW 264.7, comme modèles cellulaires de surcharge en cholestérol en lien avec les dyslipidémies d'origine alimentaire et des perturbations endosomales médicamenteuses ou phospholipidoses; des fibroblastes de sujet sains ou de patients atteints de NPC, comme modèles cellulaires de surcharge lysosomale en cholestérol d'origine génétique.

16.1 Etudes préliminaires des conditions de sécrétion des EV par les macrophages

Dans un premier temps, nous avons étudié le lien entre le BMP, le cholestérol et les exosomes sécrétés par les macrophages RAW 264.7 (voir Chapitre 15.4). Ces cellules ont été très utilisées au laboratoire pour préciser le rôle du BMP dans le trafic intracellulaire du cholestérol (Arnal-Levron et al., 2013, 2019; Bouvier et al., 2009; Delton-Vandenbroucke et al., 2007; Luquain-Costaz et al., 2013)

16.1.1 Taux de BMP et cinétique de sécrétion des EV contenant du BMP

Les cellules RAW ont été mises à sécréter pendant 48 ou 72h comme indiqué dans le Chapitre 15.4 et dans le matériel et Méthodes. Au préalable, 1 groupe pour chaque temps de sécrétion a été traité pendant 24h avec 30 μ M di-oléate PG, permettant ainsi d'augmenter la quantité de BMP intracellulaire (Arnal-Levron et al., 2013, 2019; Bouvier et al., 2009; Luquain-Costaz et al., 2013). L'étude de la mortalité cellulaire ne montre aucune différence entre les contrôles quelque soit le temps de sécrétion (figure 74). On observe néanmoins une mortalité légèrement plus forte pour les cellules traitées par le PG.

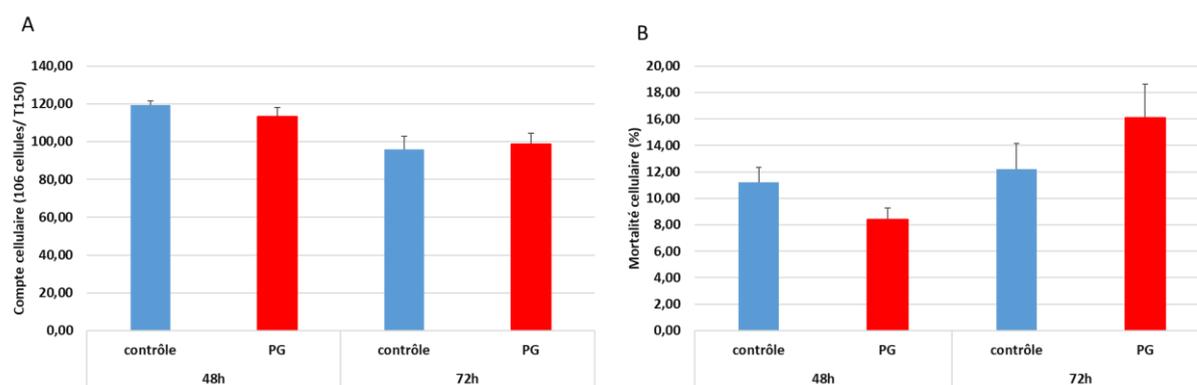


Figure 74 : viabilité cellulaire (RAW 264.7) : A :compte cellulaire (10⁶ cellules/ t150) moyenne +/- sem, n=3 ; B : mortalité cellulaire (% de cellules mortes) moyenne +/- sem, n=3

Le contenu en di-oléate BMP l'espèce majoritaire des cellules RAW 264.7, a été analysé par LC-MS/MS dans les cellules et dans les vésicules sécrétées isolées par UC (partie 8.1.3). Comme attendu, on constate au niveau cellulaire une augmentation de la quantité de di-oléate BMP pour les cellules traitées par le di-oléate PG après 48h et 72h de sécrétion (figure 75 A). Cette augmentation plus faible par rapport aux résultats antérieures de l'équipe (i.e, doublement de la quantité de BMP) pourrait s'expliquer par le fait que la concentration intracellulaire du BMP a été analysée après 48h et 72h de sécrétion, en milieu conditionné sans EV, différent du milieu de croissance standard contenant 10% de sérum de veau fœtal (partie 7.2). Dans la figure 75 B, on observe un doublement de la quantité de di-oléate BMP dans les EV sécrétées par les cellules traitées par le PG par rapport aux EV des cellules contrôles aux 2 temps de sécrétion. De plus, la quantité de di-oléate BMP est plus importante dans les EV sécrétées au bout de 48h par rapport à 72h de sécrétion. Donc l'utilisation du di-oléate PG permet bien d'augmenter la

quantité de di-oléate BMP intracellulaire mais aussi la quantité de di-oléate BMP présente dans les EV.

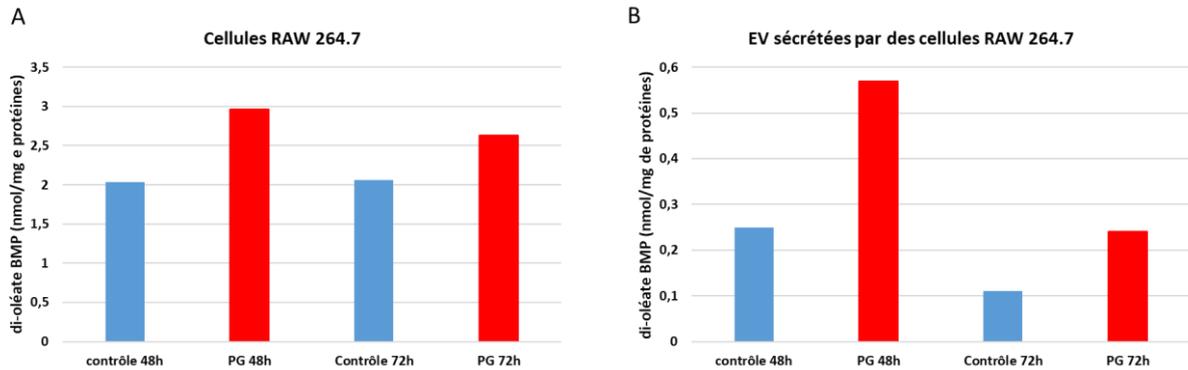


Figure 75 : A : quantité de di-oléate BMP intracellulaire (HPLC-MS/MS) ; B : quantité de di-oléate BMP dans les EV (HPLC-MS/MS) ; en nmol/mg de protéines moyenne, n=1, EV obtenu par UC,

La caractérisation des EV comme des exosomes a été faite par Western blot en analysant leur contenu en marqueurs exosomaux ALIX et TSG101 (Figure 76). L'enrichissement des 2 marqueurs est bien observé pour les EV par rapport aux cellules, en particulier après 48h de sécrétion.

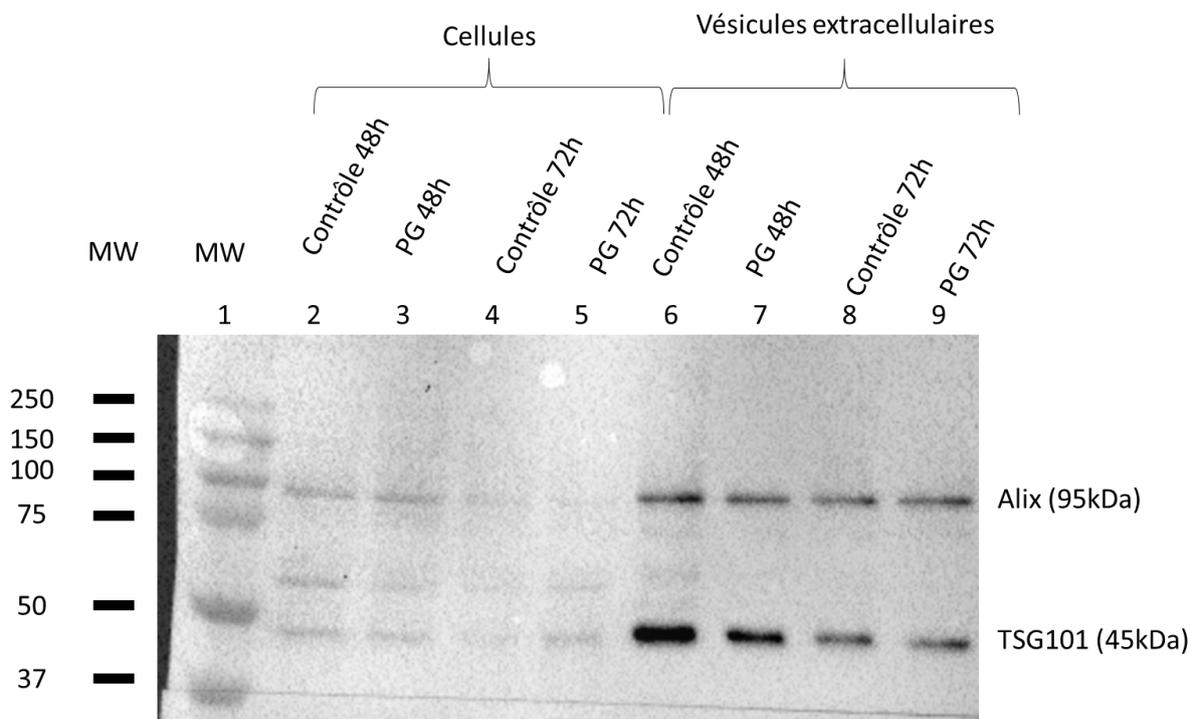


Figure 76 : caractérisation de la présence d'exosome par western blot, marqueur utilisés ALIX et TSG101, dépôts réalisés à protéine égale, EV obtenu par UC sécrétées par des cellules RAW 264.7

Ces premiers résultats montrent donc une augmentation du BMP dans les exosomes sécrétés par les cellules RAW suite à l'augmentation du BMP intracellulaire après 24h d'incubation des cellules avec son précurseur PG.

16.1.2 Taux de BMP et sécrétion du cholestérol associé aux EV

Le cholestérol a été analysé par GC-MS au niveau intra- et extracellulaire après 48h et 72h de sécrétion des cellules RAW incubées ou non avec 30 μ M de di-oléate PG. Après 48h de sécrétion, une diminution (environ 28%) du cholestérol intracellulaire est observée dans les cellules incubées avec le PG par rapport aux cellules contrôles (figure 77 A), alors qu'en parallèle, on constate une augmentation (environ 28%) du cholestérol dans les EV sécrétés par les cellules incubées avec le PG, par rapport aux EV sécrétés par les cellules contrôles (figure 77 B). Par contre, la diminution du cholestérol intracellulaire n'est pas observée après 72h de sécrétion dans les cellules traitées avec le PG, par rapport aux cellules contrôles (figure 77 A), alors qu'on constate une augmentation plus faible de la quantité de cholestérol dans les EV sécrétés par les cellules traitées par le PG (figure 77 B). Ces résultats suggèrent donc qu'il y aurait un lien entre la sécrétion du cholestérol associé aux EV et l'augmentation de la quantité de BMP intracellulaire.

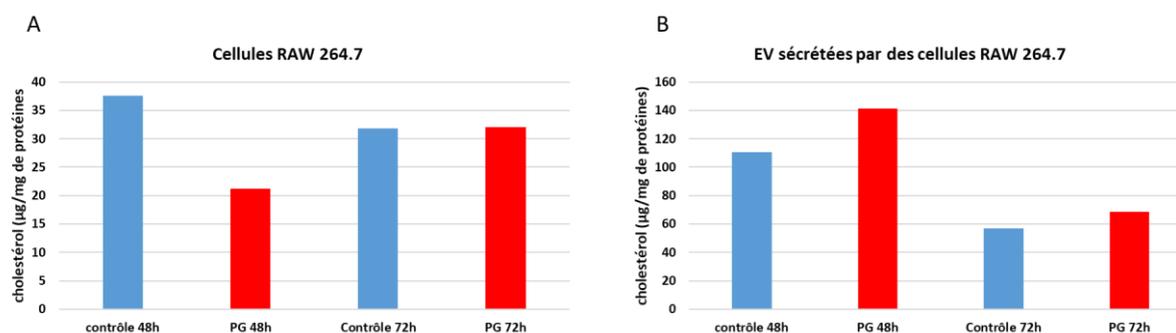


Figure 77 : A : quantité de cholestérol intracellulaire ; B : quantité de cholestérol dans les EV ; en μ g/mg de protéines valeur moyenne, $n=1$, EV obtenu par UC sécrétés par les cellules RAW 264.7, analyse par HPLC-MS/MS

Pour vérifier si le BMP et le cholestérol sont présents dans les mêmes exosomes, un gradient de sucrose a été réalisé sur les EV isolées par UC après 48h de sécrétion des macrophages RAW contrôles. Le gradient de sucrose permet de séparer les EV en fonction de leur densité. Le contenu en BMP et cholestérol de chaque fraction a été analysé après extraction lipidique par MS (chapitre 9). Le cholestérol et le BMP co-éluent majoritairement dans la

fraction 5 (moins dense, correspondant à la densité attendue pour des exosomes 1,12-1,19 g/mL ; (Colombo et al., 2014)) et en moins grande quantité dans la fraction 8 (plus dense). L'hétérogénéité des sous-populations d'EV et leur séparation en fonction de leur densité a déjà été décrite (Willms et al., 2016) (figure 78 A).

L'analyse par Western blot des marqueurs exosomaux confirme la présence d'ALIX et TSG101 dans la fraction 5 du gradient (figure 78 B), alors que la fraction 8 n'est positive que pour ALIX. Ces résultats suggèrent donc que les 2 sous populations d'EV pourraient être des exosomes de densité différente en fonction de leur taille, de leur composition lipidique et protéique nécessitant d'autres analyses comme nous le verrons dans les parties suivantes. Toutefois, l'ensemble de ces résultats montre bien la présence du BMP et du cholestérol dans les exosomes sécrétés par les macrophages RAW 264.7.

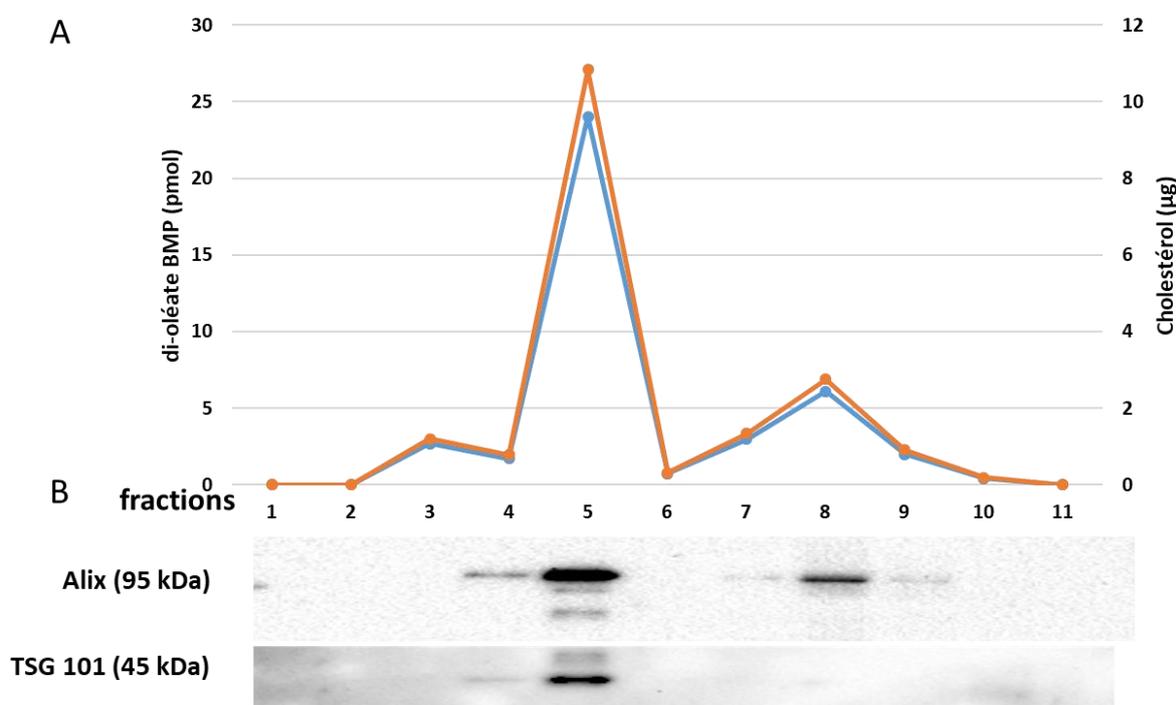
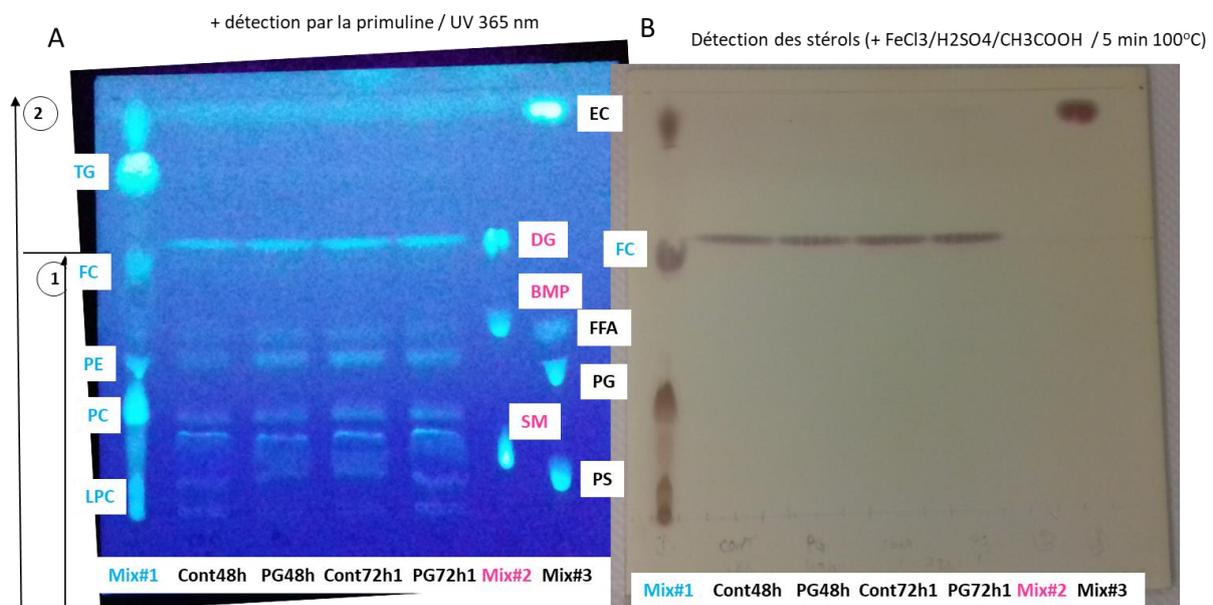


Figure 78: A : quantité de di-oléate BMP (pmol) (HPLC-MS/MS) et cholestérol (µg) (GC-FID) lors de la purification d'EV par gradient de sucrose; B : caractérisation de la présence d'exosomes par western blot, marqueurs utilisés ALIX et TSG101 n=1, dépôts réalisés à protéines équivalentes : 15µg, EV obtenu par UC-G sécrétées par des cellules RAW 264.7

Afin de compléter leur caractérisation, la composition lipidique globale des EV isolées par UC a été analysée par HPTLC après extraction lipidique (partie 9.2). Les lipides des EV ont été séparés par migration sur HPTLC en utilisant 2 systèmes successifs de solvants (partie 9.2). La figure 79 montre que les EV sécrétées pendant 48h et 72h par les cellules RAW contiennent

bien du cholestérol libre, mais pas d'ester de cholestérol, ni de triglycéride. L'absence d'ester de cholestérol et de triglycéride dans les EV isolées des milieux de culture conditionnés est d'ailleurs considérée comme un critère de pureté et d'absence de contamination par des lipoprotéines ou des gouttelettes lipidiques (Skotland et al., 2017). De plus, on note aussi principalement la présence de PC, PE et SM. Toutefois, la limite de détection et/ou de séparation de cette technique ne nous a pas permis de visualiser les spots correspondant aux BMP et PG. De plus, cette analyse qualitative ne permet pas une évaluation quantitative de ces différents lipides qui sera faite ultérieurement par MS (voir chapitres suivants).



Mix#1 = 25µg:Di-oléate PC / 10µg:Di-oléatePE/xµg:TG/ 5µg: cholesterol libre (FC)

Mix#2 = 10µg : 1,2 DG/20µg : SM/10µg : di-oléate-BMP

Mix#3 = 20 µg : di-oléate PS/ 10 µg : di-oléate PG / 10 µg : acides grass libres (C18:1)/8 µg : ester de cholestérol (C18:1) (EC)

Figure 79: Analyse par HPTLC des lipides des EV sécrétées pendant 48h et 72h par les macrophages RAW contrôles (Cont) ou incubés pendant 24h avec 30µM de PG (PG). A : détection des lipides par la primuline à 365nm ; B : détection des stérols par un mélange de FeCl₃ :H₂SO₄:CH₃COOH, chauffé pendant 5min à 100°C

Tous ces résultats montrent donc pour la 1^{ère} fois dans les macrophages RAW qu'il y aurait un lien entre leur contenu intracellulaire en BMP et la sécrétion du cholestérol via les exosomes contenant du BMP. Grâce au gradient de sucrose, nous montrons aussi la co-élution du BMP et du cholestérol, principalement dans une sous-population d'EV ayant une densité compatible avec celle classiquement décrite pour les exosomes (*i.e* d= 1.12-1.19g/ml), mais aussi dans une sous-population d'exosomes plus denses. La co-élution du BMP et du cholestérol suggère qu'ils sont présents dans les mêmes vésicules. Néanmoins, la visualisation de leur co-localisation dans les mêmes vésicules nécessiterait d'effectuer un comarquage

immunogold avec l'anticorps anti-BMP et la sonde domaine D4 de la perfringolysin O qui reconnaît spécifiquement le cholestérol (Möbius et al., 2002).

16.2 Effet du dysfonctionnement endo-lysosomal induit par des médicaments lysomotropiques (CAD) sur la sécrétion des EV par les macrophages RAW 264.7

Nous avons vu dans le chapitre 13 et la partie 14.4.1, que le traitement par l'anti-arythmique Amiodarone, un médicament cationique amphiphile ou CAD, entraînait une modification du compartiment endo-lysosomal avec une augmentation du BMP intracellulaire et une sécrétion accrue du BMP extracellulaire associé ou non aux exosomes *in vivo* (Baronas et al., 2007; Mesens et al., 2012; Rabia et al., 2020; K. L. Thompson et al., 2012) ou *in vitro* dans des cellules en culture (Piccoli et al., 2011; Rabia et al., 2020). Afin de préciser le rôle du BMP dans la sécrétion des exosomes au cours des phospholipidoses médicamenteuses, nous avons utilisé 2 types de CAD : l'amiodarone et la chloroquine connues pour induire des surcharges lysosomales, en particulier dans les macrophages riches en endo-lysosomes (Morissette et al., 2009; Stadler et al., 2008; Tengstrand et al., 2010). Des cellules RAW264.7 ont été mises à sécréter pendant 48h en présence d'amiodarone ou de chloroquine (5 μ M) après avoir été pré-incubées 24h avec ces composés (voir Matériel et Méthodes pour les protocoles expérimentaux). Les EV ont ensuite été purifiées par UF-UC, puis caractérisées par la présence des marqueurs protéiques exosomaux analysés par Western blot et par leur taille et nombre analysés par NTA. Les différents lipides des cellules et des EV (BMP, cholestérol et autres phospholipides) ont été analysés par MS.

Pour plus de clarté, les résultats portant sur les espèces moléculaires du BMP et des différents phospholipides sont représentés de deux façons :

- sous forme de tableau, où sont regroupés tous les résultats détaillés de chaque espèce moléculaire d'un lipide en fonction des différents traitements.

- sous forme d'histogramme, où sont schématisées uniquement les espèces moléculaires d'un lipide qui varient de façon significative en fonction des différents traitements.

Enfin, un code représentatif du traitement est utilisé pour représenter la significativité des analyses statistiques pour une valeur de $p < 0.05$ en comparant 2 moyennes par test T de Student :

-a : la valeur de l'espèce moléculaire est significativement différente entre le groupe contrôle et le groupe amiodarone.

-b: la valeur de l'espèce moléculaire est significativement différente entre le groupe contrôle et le groupe chloroquine.

-c: la valeur de l'espèce moléculaire est significativement différente entre le groupe chloroquine et le groupe amiodarone.

16.2.1 Caractérisation des exosomes sécrétés par les macrophages RAW 264.7 traités par des CAD

La figure 80 est un western blot représentatif de 3 expériences indépendantes. Les marqueurs exosomaux ALIX et TSG101 sont présents dans les 3 préparations d'EV quel que soit le traitement, confirmant donc la sécrétion d'exosomes dans nos conditions expérimentales et leur purification par notre méthode d'isolement.

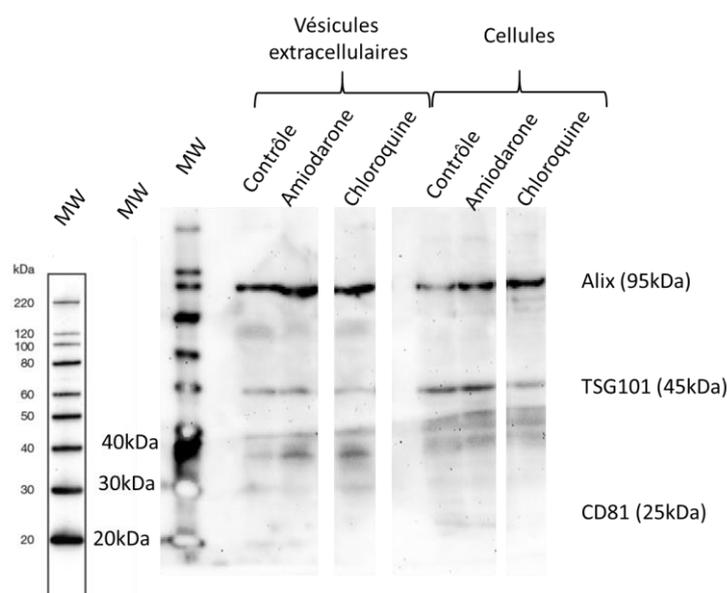


Figure 80 : caractérisation de la présence d'exosomes par western blot, marqueurs utilisés ALIX , TSG101 et CD81 . n=3, 1 western blot représentative, dépôts réalisés à volume égaux $v=15\mu\text{L}$, EV obtenu par UF-UC sécrétées par des cellules RAW 264.7.

Le nombre total d'EV secrétées par 10^6 cellules est plus fortement augmenté pour les cellules traitées par l'amiodarone (263.5×10^6) que pour celles traitées par la chloroquine (72.2×10^6) par rapport aux cellules contrôles (44.3×10^6) (tableau 38). En parallèle, nous notons une augmentation significative des protéines des EV secrétées par 10^6 cellules après traitement par l'amiodarone, qui n'est pas observée avec la chloroquine (tableau 38). De façon intéressante, le diamètre moyen des vésicules est assez similaire quel que soit le traitement (de 123 à 145 nm) et compatible avec le diamètre attendu pour des exosomes. De plus, l'analyse de la distribution de taille montre que 50% des EV isolées ont un diamètre inférieur à 134 nm quel que soit le traitement. Toutefois, on note que la sub-population des vésicules les plus grosses ont un diamètre légèrement plus élevé pour les cellules traitées par les CAD (211~215 nm) par rapport aux contrôles (166 nm). L'ensemble de ces résultats suggère donc que les CAD stimulent la sécrétion des EV (en nombre de vésicules pour les 2 CAD et aussi en protéines pour l'amiodarone) sans modifier drastiquement leur taille.

Tableau 38 : Caractéristiques des EV secrétées par les macrophages RAW 264.7 traités par l'amiodarone (Amio) et la chloroquine (CQ) (5 μ M, 48h de sécrétion) – les protéines des EV ont été dosées par la méthode de Bradford. Le nombre, diamètre et distribution de taille des vésicules ont été analysés par NTA et représentent les moyennes \pm sem de 3 expériences ou \pm écart moyen de 2 expériences (#), * $p < 0,05$. D10, D50 et D90 indiquent que 10%, 50% et 90% des EV ont un diamètre (nm) inférieur à la moyenne indiquée.

A: étude de la sécrétion des vésicules			
nombre de vésicules ($\times 10^6/10^6$ cellules)	contrôles (n=3)	amiodarone (n=2)	chloroquine (n=3)
		44,3 \pm 5,5	263,5 \pm 157 #
protéines des vésicules (μ g/ 10^6 cellules)	contrôles (n=3)	amiodarone (n=3)	chloroquine (n=3)
	0,22 \pm 0,02	0,6* \pm 0,1	0,24 \pm 0,02
B : caractérisation des vésicules			
	contrôles (n=3)	amiodarone (n=2)	chloroquine (n=3)
protéines des vésicules (μ g/ 10^9 vésicules)	5,01 \pm 0,21	2,69 \pm 1,07#	3,48 \pm 0,52
diamètre des vésicules (nm)	123,5 \pm 7,9	142,5 \pm 11,6#	145,3 \pm 12
D10 (10% des EV diamètre <nm)	84,6 \pm 4,8	85,8 \pm 5,6#	93,1 \pm 6,7
D50 (50% des EV diamètre <nm)	113,9 \pm 7,6	130,4 \pm 11,4#	134,2 \pm 11,2
D90 (90% des EV diamètre <nm)	166,4 \pm 5,1	245,3 \pm 16,2#	211,6 \pm 20,8

16.2.2 Variation de la composition lipidique des macrophages RAW 264.7 et des EV sécrétées après traitement par les CAD

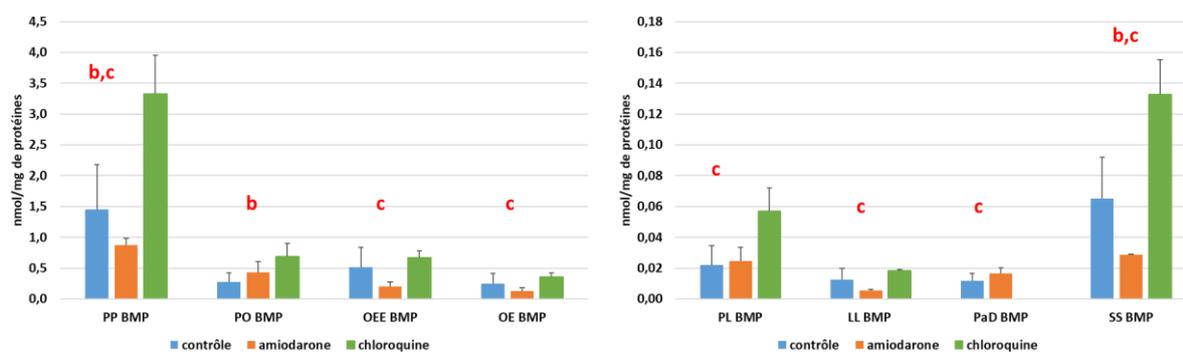
Nous avons ensuite analysé les modifications lipidiques induites par les CAD dans les cellules RAW et leur effet sur la sécrétion des exosomes afin de corrélérer les taux de chaque lipide dans les exosomes et dans les cellules après 48h de sécrétion. Toutefois, la quantification par MS de la plupart des lipides (hormis le BMP) n'utilisant pas des standards internes deutérés pour chaque espèce moléculaire de lipide ne nous permet pas de comparer les quantités de lipides entre elles (chapitres 9.3.1, 9.3.2, 9.3.3). Les résultats sont donc exprimés en unités arbitraires (AU) corrigés par le standard interne et la quantité de protéines ou le nombre de cellules de l'échantillon. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux lipides dont le métabolisme est modifié par les surcharges endolysosomales et /ou semblent impliqués dans la sécrétion exosomale (BMP, cholestérol, céramides).

16.2.2.1 Effet sur le contenu et la composition du BMP

Dans le tableau ci-dessous (tableau 39) sont regroupées les espèces moléculaires du BMP quantifiées par LC-MS /MS dans les cellules RAW. Cette étude détaillée permet d'observer que les 2 types de CAD n'ont pas le même effet sur la quantité et la composition en BMP. En effet, la quantité totale de BMP est augmentée (avec une valeur de p proche de la significativité =0.054) dans les cellules traitées par la chloroquine par rapport aux cellules contrôles, alors qu'elle est diminuée dans les cellules traitées par l'amiodarone. Ainsi, la plupart des espèces du BMP sont augmentées significativement pour les cellules traitées à la chloroquine par rapport aux cellules contrôles alors qu'elles sont diminuées dans les cellules sous amiodarone. En particulier, les espèces saturées di-palmitique et di-stéarique PP- et SS-BMP sont augmentées significativement pour les cellules sous chloroquine par rapport aux cellules contrôles (Figure 81). De plus, Les espèces PL-, LL-, SS-, OEE-, OE-BMP sont augmentées significativement pour les cellules traitées à la chloroquine par rapport aux cellules sous amiodarone

Tableau 39 : quantification des espèces moléculaires du BMP en nmol/mg de protéines, moyenne +/- sem (un tableau se trouve en annexe pour la correspondance des acide gras), cellule RAW 264.7, analyse par HPLC-MS/MS

BMP (Bis(monoacylglycéro)phosphate : espèces moléculaires (nmol/mg de protéines)		Cellules contrôle (n=3)	Cellules amiodarone (n=3)	Cellules chloroquine (n=3)
PP BMP	C16:0,C16:0	1,46 ± 0,72	0,88 ± 0,11	3,33 ± 0,62
PL BMP	C16:0,C18:2n-6	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,009	0,06 ± 0,02
LL BMP	C18:2n-6,C18:2n-6	0,01 ± 0,007	0,006 ± 0,001	0,02 ± 0,001
SS BMP	C18:0,C18:0	0,07 ± 0,03	0,03 ± 0,000	0,13 ± 0,02
PO BMP	C16:0,C18:1n-9	0,28 ± 0,14	0,43 ± 0,18	0,69 ± 0,21
OL BMP	C18:1n-9,C18:2n-6	0,74 ± 0,47	0,45 ± 0,14	1,12 ± 0,31
OO BMP	C18:1n-9,C18:1n-9	4,27 ± 2,70	2,84 ± 1,09	7,12 ± 2,10
SO BMP	C18:0,C18:1n-9	0,15 ± 0,08	0,20 ± 0,11	0,34 ± 0,08
ODPA BMP	C18:1n-9,C22:5n-3/6	0,28 ± 0,19	0,14 ± 0,05	0,32 ± 0,08
OA BMP	C18:1n-9,C20:4n-6	0,12 ± 0,06	0,10 ± 0,02	0,15 ± 0,03
OETA BMP	C18:1n-9,C20:3n-6/9	0,48 ± 0,30	0,26 ± 0,10	0,61 ± 0,14
OEE BMP	C18:1n-9,C20:2n-6	0,52 ± 0,32	0,20 ± 0,08	0,67 ± 0,11
OE BMP	C18:1,C20:1n-9	0,25 ± 0,16	0,13 ± 0,05	0,36 ± 0,06
OD BMP	C18:1n-9,C22:6n-3	0,92 ± 0,60	0,48 ± 0,21	0,88 ± 0,48
AD BMP	C20:4n-6,C22:6n-3	0 ± 0	0,001 ± 0,001	0,004 ± 0,004
PaD BMP	C16:1n-9,C22:6n-3	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,004	0 ± 0
PD BMP	C16:0,C22:6n-3	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,01
DD BMP	C22:6n-3,C22:6n-3	0,009 ± 0,004	0,009 ± 0,003	0,007 ± 0,002
di-DPA BMP	C22:5n-3/6,C22:5n-3/6	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Total BMP		8,14 ± 5,79	6,20 ± 2,15	15,85 ± 4,17



Le di-oléate-BMP, l'espèce majoritaire des macrophages RAW, varie aussi différemment selon le type de CAD: diminuant avec l'amiodarone et augmentant avec la chloroquine, mais ces variations ne sont pas statistiquement significatives. Toutefois, il est intéressant de noter qu'avec les 2 CAD, la proportion de di-oléate-BMP diminue légèrement représentant en moyenne 44 mole% des espèces moléculaires du BMP alors qu'il représente 47 mole% de celles des cellules contrôles.

De plus, on observe une diminution significative de la proportion des espèces polyinsaturées (contenant plus de 2 doubles liaisons) représentant en moyenne 27.7 et 24.1

mole% des espèces moléculaires du BMP dans les cellules traitées par l'amiodarone et la chloroquine, respectivement par rapport aux cellules contrôles dans lesquelles elles représentent 33,9 mole%. Parmi celles-ci, l'espèce oléate, docosahexaenoate OD-BMP qui représente 11,4 mole% des espèces du BMP dans les cellules contrôles, diminue significativement à 7,2 et 4,7 mole% dans les cellules traitées par l'amiodarone et la chloroquine, respectivement.

L'ensemble de ces variations de la quantité et composition du BMP des cellules RAW montre que les 2 CAD ne perturbent pas de façon identique le métabolisme intracellulaire du BMP malgré leur tropisme pour le compartiment endolysosomal.

Comme observé précédemment (Partie 15.4), seule l'espèce di-oléate BMP est détectée lors de l'analyse lipidique des EV sécrétées par les macrophages RAW 264.7 et ceci quelles que soient les conditions de stimulation par les CAD. La quantité de di-oléate BMP retrouvée dans les EV (exprimée relative aux protéines exosomales) est plus élevée après traitement par les 2 CAD par rapport aux contrôles avec une augmentation plus importante pour la chloroquine par rapport à l'amiodarone (figure 82). Bien que cette tendance ne soit pas statistiquement significative, elle montre que les 2 CAD ont augmenté le contenu en BMP des EV suggérant une modification de leur composition lipidique.

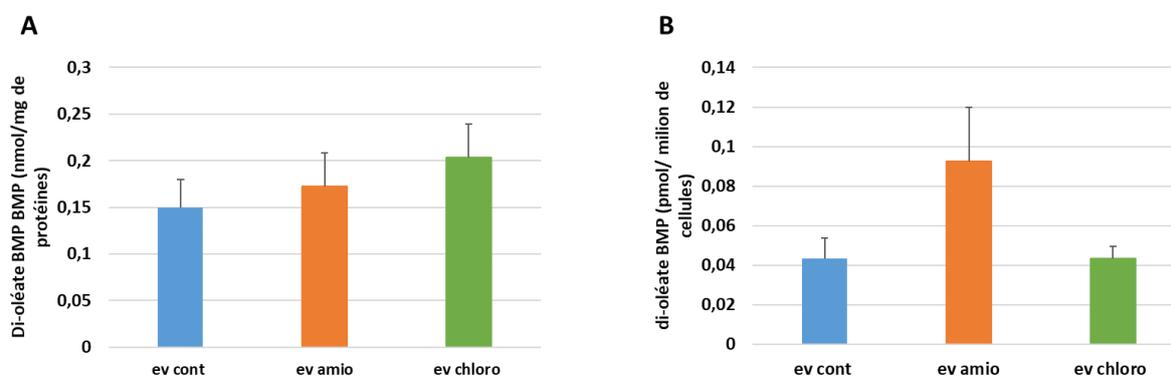


Figure 82 : A : quantité de BMP dans les exosomes en nmol/mg de protéines, moyenne +/- sem, n=3 ; B : quantité de BMP dans les exosomes en nmol/million de cellules, moyenne +/- sem, n=3, EV obtenu par UF-UC sécrétées par les cellule RAW 264.7, analyse par GC-FID

Nous avons vu que le traitement des macrophages par l'amiodarone et la chloroquine augmentait la sécrétion des EV (figure 82). De façon à évaluer plus précisément l'effet des CAD sur la sécrétion du BMP par les cellules, la quantité de BMP associé aux EV a été exprimée par million de cellules RAW 264.7 (Figure 82 B). Nous observons que le traitement par l'amiodarone entraîne un doublement de la sécrétion de BMP exosomal qui n'est pas retrouvé avec la chloroquine. Ces résultats suggèrent à nouveau des différences de mécanisme

d'action des 2 CAD. L'amiodarone stimule fortement la sécrétion d'EV enrichies en di-oléate BMP entraînant une diminution du contenu intracellulaire en BMP après 48h de sécrétion (tableau 39). Par contre, la chloroquine ne stimule pas aussi efficacement la sécrétion d'EV qui sont toutefois enrichies en di-oléate BMP résultant en une augmentation du contenu intracellulaire en BMP et une modification de sa composition après 48h de sécrétion (tableau 39).

16.2.2.2 Effet sur le contenu intracellulaire et la sécrétion en cholestérol

L'analyse du contenu intracellulaire en cholestérol libre après traitement par les CAD et 48h de sécrétion ne montre pas de différence significative par rapport aux cellules contrôles malgré une légère augmentation induite par l'amiodarone (Figure 83). De plus, aucune variation dans le contenu intracellulaire en cholestérol estérifié n'est observée entre les cellules RAW traitées par les 2 CAD et les cellules contrôles après 48h de sécrétion (résultats non présentés).

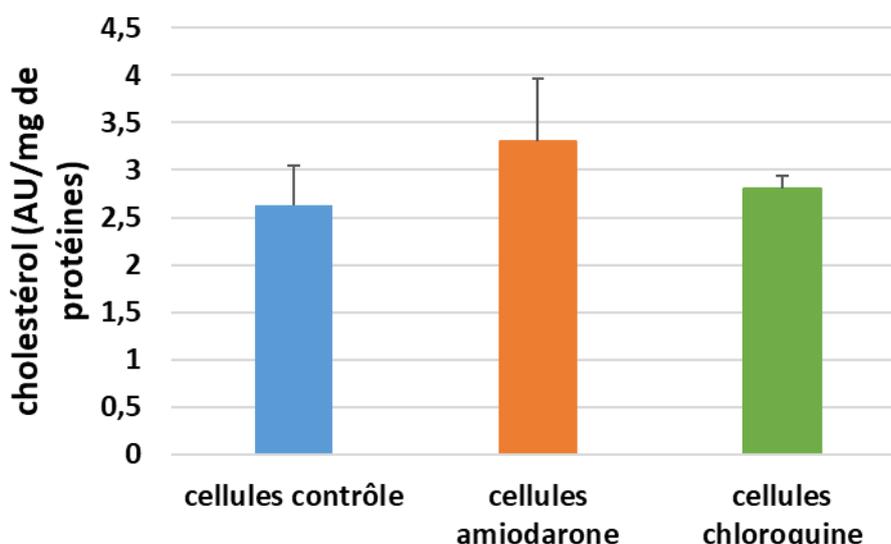


Figure 83 : quantité de cholestérol cellulaire en AU/mg de protéines, moyenne +/- sem, n=3, Cellule RAW 264.7, analyse par GC-FID

La quantité de cholestérol libre retrouvée dans les EV (exprimée relative aux protéines exosomales) augmente après traitement par la chloroquine et diminue sous amiodarone (Figure 84 A). Toutefois ces variations ne sont pas statistiquement significatives. De façon à évaluer l'effet des CAD sur la sécrétion du cholestérol par les cellules, la quantité de cholestérol libre

associé aux EV a été exprimée par million de cellules RAW 264.7. Aucune variation de la quantité de cholestérol sécrété par les cellules n'est observée dans les conditions de sécrétion utilisées (figure 84 B).

Comme noté précédemment pour le contenu en BMP des EV, ces résultats suggèrent que les 2 CAD modifient différemment le contenu en cholestérol des EV. Mais l'aspect quantitatif de cette sécrétion ne peut pas être clairement évalué. Toutefois pour l'amiodarone, il semblerait que la diminution de la sécrétion du cholestérol libre via les exosomes induirait une augmentation du cholestérol intracellulaire (Figure 83) en accord avec la perturbation du compartiment endolysosomal induite par cette CAD (Palmeri et al., 1995; Piccoli et al., 2011)

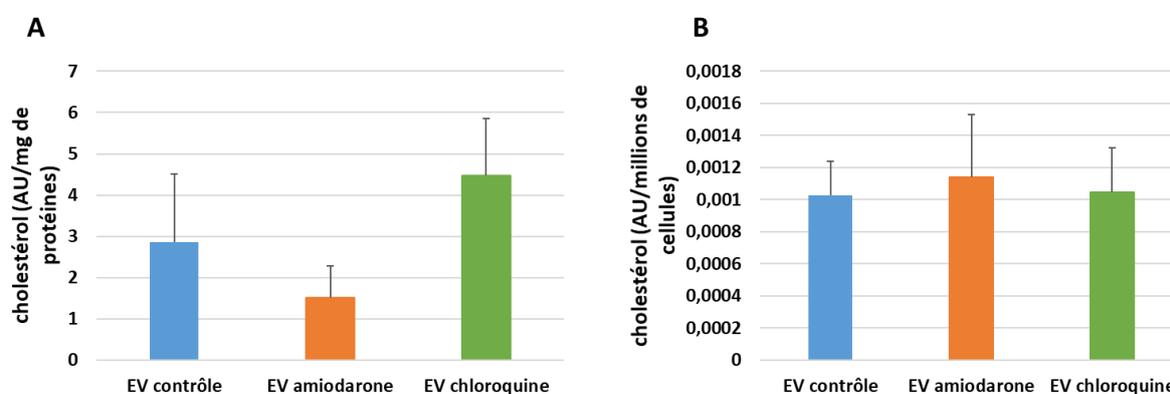


Figure 84 : A : quantité de cholestérol dans les exosomes en AU/mg de protéines, moyenne +/- sem, n=3 ; B : quantité de cholestérol dans les exosomes en AU/millions de cellules, moyenne +/- sem, n=3, EV obtenu par UF-UC (RAW 264.7) (GC-FID)

16.2.2.3 Effet des CAD sur la composition en sphingolipides (SM et Cer) et glycérophospholipides (PC, PI, PE, PS) des cellules RAW et des exosomes sécrétés

16.2.2.3.1 Effet sur les sphingolipides :

- Les céramides

Les céramides sont des composés centraux dans le métabolisme des sphingolipides pouvant provenir de la biosynthèse « de novo », de la dégradation de sphingolipides plus complexes comme les sphingomyélines ou du recyclage de la sphingosine. L'analyse des

céramides cellulaires permet d'évaluer le dysfonctionnement endolysosomal induit par les CAD puisque les céramides sont hydrolysées dans ce compartiment sous l'action de la céramidase acide (Hannun & Obeid, 2018). Le tableau 40 regroupe les résultats de toutes les espèces moléculaires des céramides analysées au niveau cellulaire et la figure 85 montre les espèces moléculaires ayant une différence significative par rapport aux cellules contrôles ou entre les 2 traitements. L'amiodarone et la chloroquine dans de moindres proportions, entraînent une augmentation significative de la quantité totale de céramides dans les cellules ainsi que de toutes leurs espèces moléculaires. De plus, les CAD modifient significativement les proportions relatives des céramides à chaîne longue LC (C16 –C18), à très longue chaîne VLC (C20-C24) ainsi qu'à ultra-longue chaîne ULC (C26). Les LC-céramides augmentent avec l'amiodarone et la chloroquine représentant respectivement, 37,8% et 31.9% des espèces de céramides alors qu'elles ne représentent que 26,5% des espèces dans les cellules contrôles ; à l'inverse les VLC-céramides diminuent avec l'amiodarone et la chloroquine représentant respectivement 61,7% et 67.6% des espèces alors qu'elles représentent 72,8% dans les contrôles. Une augmentation du ratio des céramides LC/VLC a été aussi observée dans le foie après traitement des rats par la chloroquine (Lecommandeur et al., 2017).

Tableau 40 : quantification des espèces moléculaires de céramides cellulaires en AU/mg de protéines, moyenne +/- sem, n=3

Céramides : espèces moléculaires (AU/mg de protéines)	Cellules contrôle (n=3)	Cellules amiodarone (n=3)	Cellules chloroquine (n=3)
Cerd18_1.16_0	0,91 ± 0,20	17,21 ± 1,43	9,20 ± 1,31
Cerd18_1.16_1	0,02 ± 0,005	0,13 ± 0,015	0,09 ± 0,012
Cerd18_1.18_0	0,09 ± 0,02	1,48 ± 0,11	0,64 ± 0,11
Cerd18_1.18_1	0,02 ± 0,005	0,10 ± 0,02	0,06 ± 0,004
Cerd18_1.20_0	0,04 ± 0,009	0,64 ± 0,09	0,28 ± 0,05
Cerd18_1.22_0	0,28 ± 0,06	5,08 ± 0,74	2,28 ± 0,43
Cerd18_1.24_0	1,28 ± 0,27	13,52 ± 1,68	9,54 ± 1,19
Cerd18_1.24_1	1,29 ± 0,33	12,15 ± 2,18	8,96 ± 0,97
Cerd18_1.26_0	0,014 ± 0,003	0,14 ± 0,017	0,08 ± 0,013
Cerd18_1.26_1	0,013 ± 0,002	0,13 ± 0,010	0,08 ± 0,013
Total Cer	3,96 ± 0,90	50,58 ± 6,03	31,21 ± 4,05

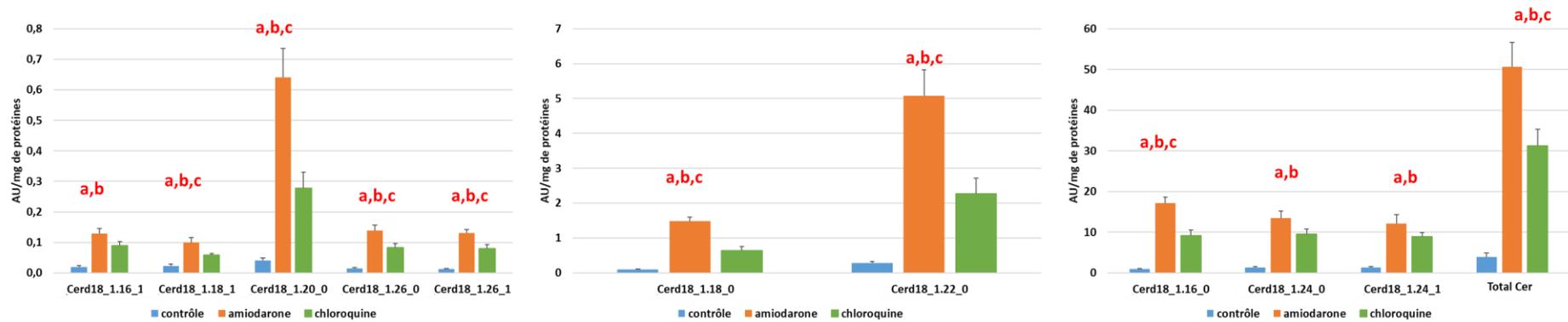


Figure 85 : Différence significative des espèces moléculaire des céramides cellulaires analysées entre les différents traitements $p < 0.05$, moyenne \pm sem, $n=3$

Le tableau 41 regroupe l'ensemble des résultats pour l'analyse des céramides exosomales, et la figure 86 présente uniquement les espèces moléculaires significativement différentes. Les CAD entraînent l'augmentation, bien que non significative, de la quantité totale de céramides exosomales ainsi que de toutes les espèces moléculaires des céramides. La chloroquine augmente légèrement plus la sécrétion de céramides que l'amiodarone. A la différence des céramides intracellulaires, la proportion relative des LC- et VLC-céramides ne varient pas dans les exosomes après incubation avec les 2 CAD par rapport aux contrôles.

Ainsi dans les macrophages RAW 264.7, la perturbation du métabolisme des céramides induites par les CAD au niveau endosomal semble avoir favorisé la sécrétion de céramides associés aux exosomes.

Tableau 41 : quantification des espèces moléculaires de céramides exosomales en AU/mg de prot, moyenne +/- sem, n=3, EV obtenu par UF-UC

Céramides : espèces moléculaires (AU/mg de protéines)	EV contrôle (n=3)	EV amiodarone (n=3)	EV chloroquine (n=3)
Cerd18_1.16_0	0,33 ± 0,11	0,68 ± 0,17	0,80 ± 0,19
Cerd18_1.16_1	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,008	0,05 ± 0,009
Cerd18_1.18_0	0,07 ± 0,02	0,12 ± 0,03	0,14 ± 0,03
Cerd18_1.18_1	0,01 ± 0,004	0,01 ± 0,002	0,02 ± 0,005
Cerd18_1.20_0	0,05 ± 0,014	0,08 ± 0,02	0,09 ± 0,02
Cerd18_1.22_0	0,13 ± 0,04	0,38 ± 0,08	0,32 ± 0,08
Cerd18_1.24_0	0,37 ± 0,10	0,76 ± 0,16	0,84 ± 0,16
Cerd18_1.24_1	0,30 ± 0,08	0,48 ± 0,11	0,67 ± 0,14
Cerd18_1.26_0	0,01 ± 0,003	0,01 ± 0,002	0,02 ± 0,002
Cerd18_1.26_1	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,009	0,05 ± 0,004
Total Cer	1,34 ± 0,39	2,59 ± 0,56	3,01 ± 0,63

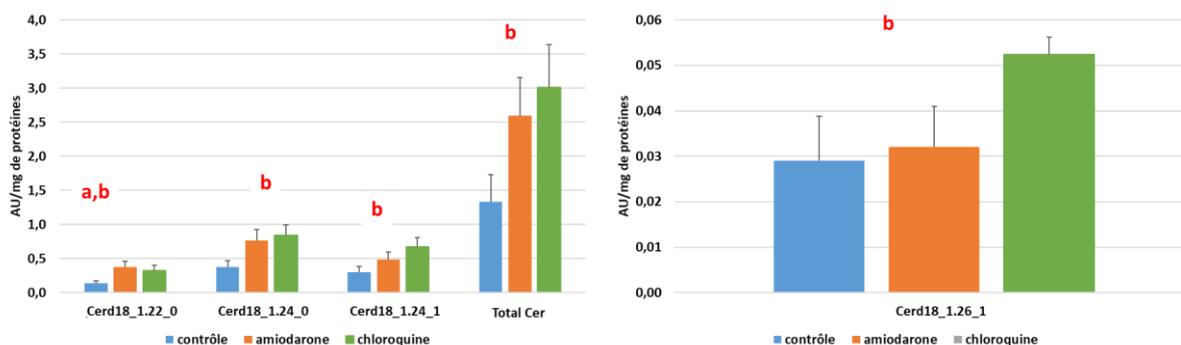


Figure 86 : Différence significative des espèces moléculaire des céramides exosomales analysées entre les différents traitements p<0.05, moyenne +/- sem, n=3, EV obtenu par UF-UC (RAW 264.7) (GC-FID)

- Les sphingomyélines

L'analyse des sphingomyélines (SM) cellulaires permet d'évaluer le dysfonctionnement endolysosomal induit par les CAD puisque les SM sont hydrolysées dans ce compartiment pour produire des céramides sous l'action de la sphingomyélinase acide (aSMase). Le tableau 42 regroupe l'ensemble des résultats pour l'analyse des SM cellulaires, et la figure 87 uniquement les espèces moléculaires significativement différentes par rapport aux cellules contrôles ou entre les 2 traitements. Comme pour les céramides, l'amiodarone induit une augmentation significative de la quantité totale des SM dans les cellules ainsi que de toutes leurs espèces moléculaires. La chloroquine entraîne aussi une augmentation mais plus faible. De plus, les CAD modifient significativement les proportions relatives des LC-SM (C16–C18) et des VLC-SM (C20-C24) dans les cellules. Les LC-SM augmentent avec l'amiodarone et la chloroquine, représentant respectivement 42,7% et 39,1% des espèces de SM, alors qu'elles ne représentent que 37% dans les cellules contrôles. A l'inverse, les VLC-SM diminuent avec l'amiodarone et la chloroquine, représentant respectivement 57,3% et 60,9% des espèces alors qu'elles représentent 63% dans les contrôles.

Tableau 42 : espèces moléculaires des SM cellulaires en AU/mg de protéines, moyenne +/- sem, n=3 (RAW 264.7 ; HPLC-MS/MS)

Sphingomyélines : espèces moléculaires (AU/mg de protéines)	Cellules contrôle (n=3)	Cellules amiodarone (n=3)	Cellules chloroquine (n=3)
SM18_1.14_0	3,41 ± 0,23	7,91 ± 0,50	4,70 ± 0,61
SM18_1.16_0	108,01 ± 1,90	171,68 ± 15,94	121,23 ± 18,89
SM18_1.16_1	1,71 ± 0,09	5,29 ± 0,31	2,53 ± 0,25
SM18_1.18_0	9,33 ± 0,56	23,45 ± 3,59	11,07 ± 2,09
SM18_1.18_1	0,97 ± 0,10	2,77 ± 0,14	1,12 ± 0,08
SM18_1.20_0	4,02 ± 0,26	8,44 ± 1,42	4,83 ± 1,03
SM18_1.20_1	0,57 ± 0,06	1,43 ± 0,06	0,61 ± 0,06
SM18_1.22_0	22,16 ± 1,97	41,29 ± 7,31	25,41 ± 5,74
SM18_1.22_1	6,62 ± 0,68	14,00 ± 0,66	7,24 ± 0,76
SM18_1.24_0	66,68 ± 3,07	84,76 ± 13,61	68,04 ± 12,93
SM18_1.24_1	110,29 ± 5,22	132,70 ± 4,66	112,09 ± 10,81
Total SM	333,77 ± 7,42	493,74 ± 39,57	358,88 ± 52,84

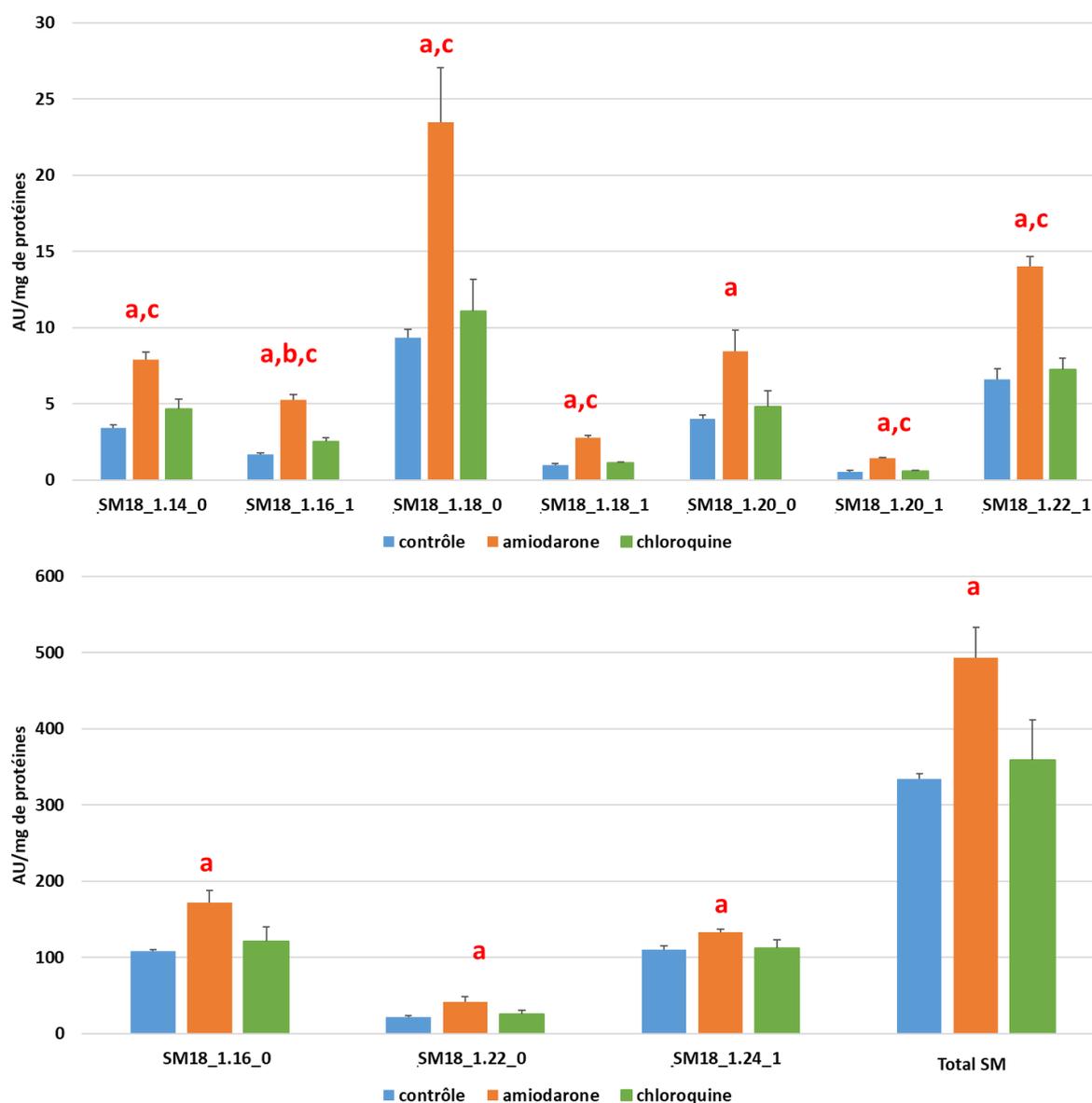


Figure 87 : Différence significative des espèces moléculaire des SM cellulaires analysées entre les différents traitements $p < 0.05$, moyenne \pm sem, $n=3$ (RAW 264.7 ; HPLC-MS/MS)

Le tableau 43 regroupe l'ensemble des résultats pour l'analyse des SM exosomales, et la figure 88 uniquement les espèces moléculaires significativement différentes entre les 2 traitements. Les 2 CAD induisent des variations différentes : l'amiodarone entraîne la diminution des SM exosomales alors que la chloroquine augmente la quantité de SM sécrétées dans les exosomes. A la différence des variations observées pour les SM cellulaires, la proportion relative des LC- et VLC-SM ne varie pas significativement dans les exosomes après incubation avec les 2 CAD par rapport aux contrôles. Toutefois, on observe que les LC-

et VLC-SM sont augmentées de façon significative pour le traitement à la chloroquine par rapport à celui à l'amiodarone.

Ainsi, les 2 CAD en perturbant le métabolisme des sphingolipides au niveau endosomal semblent modifier de façon différente la composition en sphingolipides des exosomes sécrétés par les macrophages RAW 264.7. L'amiodarone favorise la sécrétion d'exosomes enrichis en céramides mais contenant moins de SM, alors que la chloroquine induit une plus faible sécrétion d'exosomes enrichis en céramides mais aussi en SM, en particulier en VLC-SM qui ont diminué au niveau cellulaire (Figure 88).

L'ensemble des résultats sur les variations des sphingolipides confirme que les deux CAD en perturbant le compartiment endosomal et en interférant avec les mécanismes de dégradation des sphingolipides, ont bien modifié la production de céramides qui sont connus pour favoriser la sécrétion des exosomes (Trajkovic et al., 2008; Verderio et al., 2018).

Tableau 43 : quantification des espèces moléculaires des SM exosomales en AU/mg de prot, moyenne +/- sem, n=3, EV obtenu par UF-UC (RAW 264.7 ; HPLC-MS/MS)

Sphingomyélines : espèces moléculaires (AU/mg de protéines)	EV contrôle (n=3)	EV amiodarone (n=3)	EV chloroquine (n=3)
SM18_1.14_0	5,20 ± 1,90	3,46 ± 0,64	7,87 ± 2,45
SM18_1.16_0	120,89 ± 45,65	80,69 ± 13,71	175,59 ± 45,92
SM18_1.16_1	7,14 ± 3,27	5,82 ± 1,38	12,44 ± 4,22
SM18_1.18_0	10,53 ± 4,10	9,20 ± 1,46	16,84 ± 4,10
SM18_1.18_1	3,01 ± 1,32	2,98 ± 0,39	4,93 ± 1,49
SM18_1.20_0	5,35 ± 2,51	3,99 ± 0,84	7,27 ± 1,05
SM18_1.20_1	0 ± 0	0,46 ± 0,46	0 ± 0
SM18_1.22_0	27,01 ± 11,06	19,34 ± 2,33	43,68 ± 9,72
SM18_1.22_1	8,99 ± 4,24	8,27 ± 1,28	15,28 ± 3,35
SM18_1.24_0	54,47 ± 25,06	29,18 ± 3,71	79,85 ± 20,58
SM18_1.24_1	121,16 ± 60,63	63,20 ± 14,75	182,95 ± 51,49
Total SM	363,74 ± 159,55	226,60 ± 39,01	546,70 ± 143,76

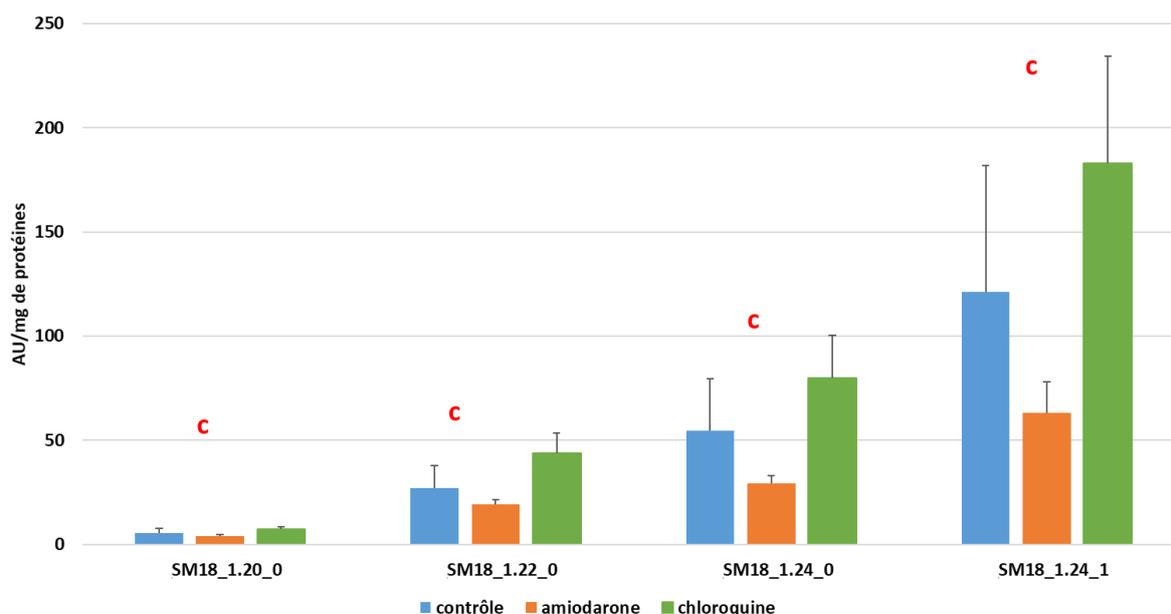


Figure 88 : Différence significative des espèces moléculaire des SM exosomales analysées entre les différents traitements $p < 0.05$, moyenne \pm sem, $n=3$, EV obtenu par UF-UC (RAW 264.7 ; HPLC-MS/MS)

16.2.2.3.2 Effet sur les glycérophospholipides :

L'analyse des formes diacyles des principaux glycérophospholipides dans les macrophages RAW et les exosomes sécrétés a été faite par LC-MS/MS. Nous n'avons pas analysé les autres sous-classes alkyles et alkényles (chapitre 1.2.1). Les différents résultats pour les 2 phospholipides neutres PC et PE et les 2 phospholipides anioniques PI et PS sont présentés comme précédemment d'abord sous forme de tableaux regroupant toutes les espèces moléculaires pour chaque phospholipide, puis sous forme d'histogrammes, les espèces moléculaires présentant des différences significatives par rapport aux cellules contrôles ou entre les 2 traitements.

- Les phosphatidylcholines

Comme attendu, les 2 CAD entraînent l'augmentation de la quantité totale des PC dans les cellules ainsi que de toutes leurs espèces moléculaires par rapport aux cellules contrôles (tableau 44, figure 89). Toutefois après traitement par l'amiodarone ou la chloroquine, nous n'observons pas de différence significative dans les proportions relatives des espèces saturées (respectivement en moyenne, 17,9% et 20,1%), monoinsaturées (respectivement en moyenne, 47,3% et 45,7%) et polyinsaturées (respectivement en moyenne, 34,8% et 34,2%) par rapport aux cellules contrôles où elles représentent pour les saturées 19,4%, monoinsaturées 47,2% et polyinsaturées 33,4%.

Ceci suggère que l'effet inhibiteur des CAD sur la (ou les) activité(s) phospholipase(s) ne semble pas sélectif pour une activité spécifique.

Tableau 44 : quantification des espèces moléculaires des PC cellulaires en AU/mg de prot, moyenne +/- sem, n=3 (RAW 264.7 ; HPLC-MS/MS)

Phosphatidylcholine : espèces moléculaires (AU/mg de protéines)	Cellules contrôle (n=3)	Cellules amiodarone (n=3)	Cellules chloroquine (n=3)
PC28_0	3,33 ± 0,32	4,56 ± 0,33	3,53 ± 0,17
PC30_0	23,20 ± 1,57	26,42 ± 0,35	25,24 ± 2,06
PC30_1	4,08 ± 0,41	4,97 ± 0,55	4,20 ± 0,38
PC32_0	15,61 ± 1,24	17,10 ± 0,56	17,94 ± 1,87
PC32_1	30,61 ± 2,15	36,72 ± 1,81	30,22 ± 1,93
PC32_2	5,30 ± 0,41	6,41 ± 0,31	5,54 ± 0,34
PC34_0	4,11 ± 0,21	5,66 ± 0,12	4,54 ± 0,36
PC34_1	35,72 ± 2,36	45,87 ± 1,58	38,15 ± 2,31
PC34_2	15,41 ± 1,02	19,63 ± 1,69	16,75 ± 1,41
PC34_3	1,47 ± 0,16	1,78 ± 0,22	1,56 ± 0,19
PC36_1	6,49 ± 0,65	7,57 ± 0,43	5,88 ± 0,31
PC36_2	12,45 ± 0,42	16,76 ± 1,78	12,51 ± 0,74
PC36_3	35,39 ± 2,90	45,83 ± 1,76	39,21 ± 2,31
PC36_4	10,18 ± 1,12	13,14 ± 0,63	10,66 ± 1,00
PC38_2	2,73 ± 0,27	4,09 ± 0,20	2,78 ± 0,15
PC38_3	9,25 ± 0,94	10,60 ± 0,77	9,89 ± 1,04
PC38_4	4,54 ± 0,52	6,58 ± 0,17	4,93 ± 0,22
PC38_5	1,11 ± 0,10	1,68 ± 0,05	1,21 ± 0,04
PC38_6	2,64 ± 0,29	3,60 ± 0,30	2,84 ± 0,24
PC40_3	13,39 ± 1,94	18,89 ± 1,55	14,49 ± 1,32
PC40_6	2,37 ± 0,27	2,65 ± 0,08	2,34 ± 0,16
Total PC	239,40 ± 17,51	300,51 ± 8,11	254,42 ± 17,95

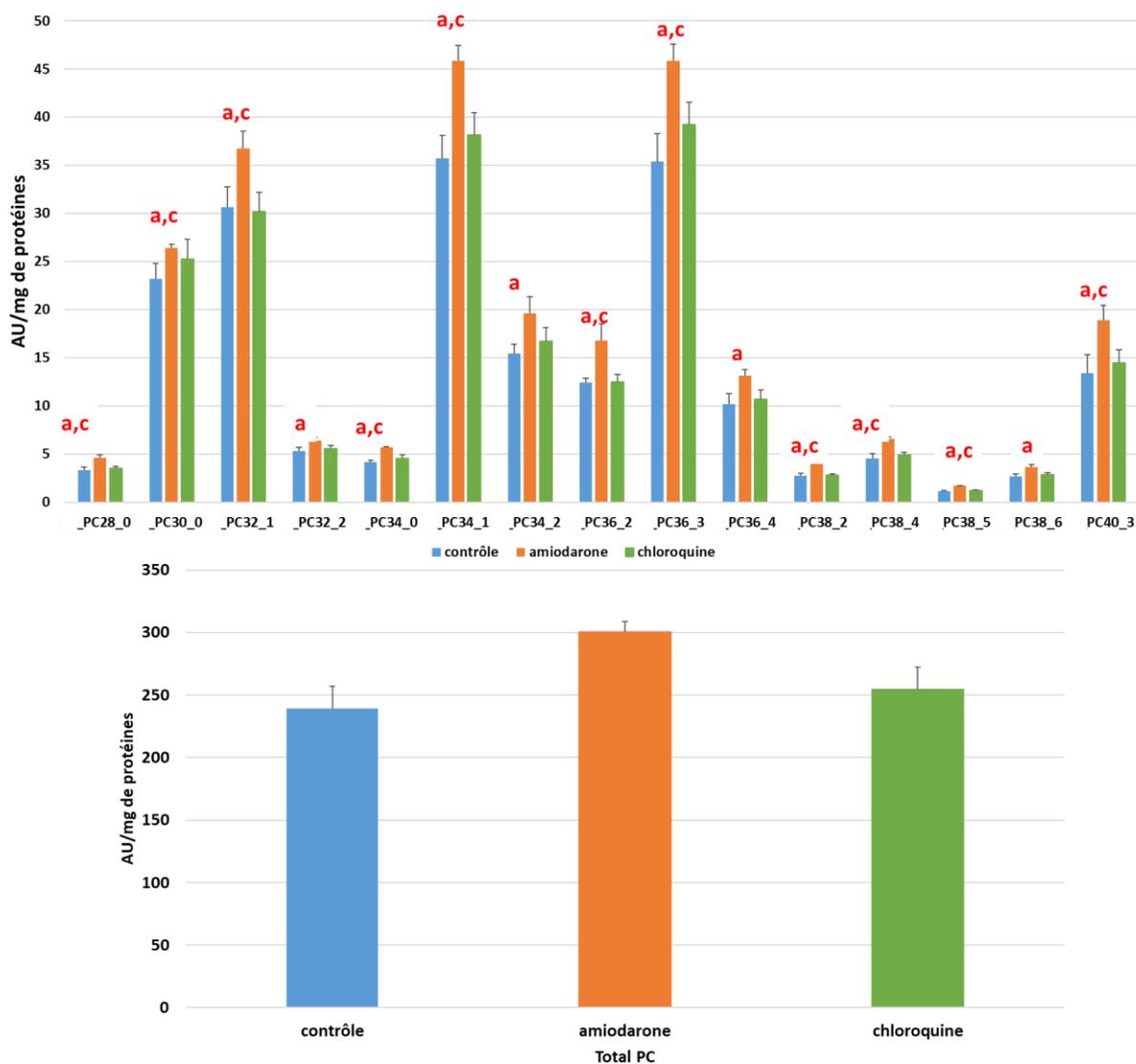


Figure 89 : Différence significative des espèces moléculaires de PC cellulaires analysées entre les différents traitements $p < 0.05$, moyenne \pm sem, $n=3$ (RAW 264.7 ; HPLC-MS/MS)

Contrairement aux PC cellulaires, l'analyse des PC exosomales montre une différence entre les 2 CAD. L'amiodarone diminue globalement le contenu total et les espèces moléculaires des PC sécrétées dans les exosomes, alors que la chloroquine les augmente (tableau 45, figure 90). Toutefois comme observé pour les PC cellulaires, nous n'observons pas de différence significative dans les proportions relatives des espèces saturées, monoinsaturées et polyinsaturées après traitement par l'amiodarone ou la chloroquine par rapport aux contrôles. Seule l'espèce PC 40 :6 qui est l'espèce la plus insaturée analysée, se trouve augmentée avec les 2 CAD. Ces résultats indiquent à nouveau que les 2 CAD modifient de façon différente le métabolisme lipidique intra-endosomal peut être en lien avec la perturbation du pH endosomal

(voir discussion plus loin) et donc modulerait différemment la sécrétion des exosomes. En effet, la diminution de la sécrétion des PC associés aux exosomes est corrélée à leur accumulation au niveau cellulaire pour les cellules traitées avec l'amiodarone.

Tableau 45 : quantification des espèces moléculaires des PC exosomales en AU/mg de prot, moyenne +/- sem, n=3, EV obtenu par UF-UC (RAW 264.7 ; HPLC-MS/MS)

Phosphatidylcholine : espèces moléculaires (AU/mg de protéines)	EV contrôle (n=3)		EV amiodarone (n=3)		EV chloroquine (n=3)	
PC28_0	1,58	± 0,47	0,90	± 0,16	1,95	± 0,73
PC30_0	15,39	± 5,62	8,58	± 3,38	22,74	± 6,34
PC30_1	2,64	± 1,11	2,11	± 0,59	4,22	± 1,10
PC32_0	32,09	± 12,87	26,44	± 3,94	53,12	± 14,03
PC32_1	30,04	± 12,32	23,52	± 6,46	47,09	± 15,45
PC32_2	3,37	± 1,58	2,97	± 0,61	4,96	± 1,49
PC34_0	15,45	± 6,99	15,58	± 1,99	26,01	± 7,27
PC34_1	90,53	± 41,25	79,35	± 16,17	153,78	± 43,54
PC34_2	38,13	± 17,36	26,62	± 4,95	72,16	± 15,01
PC34_3	2,41	± 1,19	1,79	± 0,38	4,41	± 0,87
PC36_1	3,37	± 1,11	2,27	± 0,67	4,91	± 1,39
PC36_2	28,53	± 12,41	28,47	± 4,13	43,93	± 11,94
PC36_3	31,59	± 13,40	28,85	± 4,64	59,94	± 14,80
PC36_4	6,66	± 2,84	7,27	± 1,20	10,22	± 1,96
PC38_2	6,98	± 2,93	7,06	± 1,07	11,22	± 2,09
PC38_3	9,86	± 4,60	7,74	± 1,04	16,96	± 3,62
PC38_4	7,94	± 3,37	8,01	± 1,36	13,64	± 3,10
PC38_5	9,06	± 4,47	6,89	± 0,94	16,46	± 3,69
PC38_6	9,45	± 4,29	7,57	± 1,13	17,25	± 3,40
PC40_3	11,68	± 4,89	12,02	± 2,13	19,13	± 3,99
PC40_6	0,19	± 0,10	0,54	± 0,07	0,75	± 0,43
Total PC	356,94	± 154,83	304,54	± 49,77	604,86	± 152,45

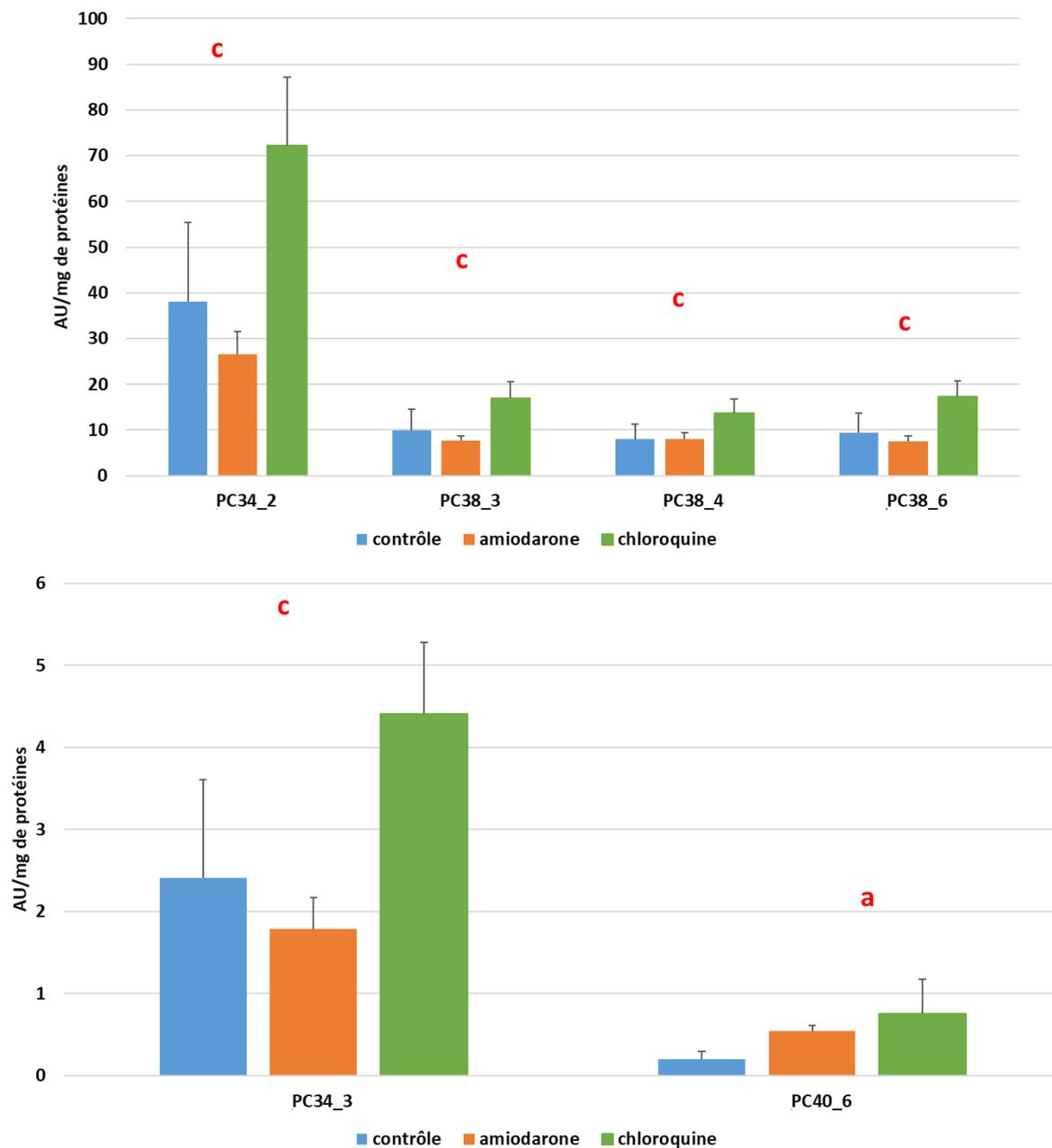


Figure 90 : Différence significative des espèces moléculaires des PC exosomales analysées entre les différents traitements $p < 0.05$, moyenne \pm sem, $n=3$, EV obtenu par UF-UC (RAW 264.7 ; HPLC-MS/MS)

- Les phosphatidyléthanolamines

Comme pour l'effet sur les PC cellulaires, les 2 CAD entraînent une augmentation globale du contenu total et des espèces moléculaires des PE qui est plus importante pour les cellules traitées par l'amiodarone (tableau 46, figure 91). De plus, le traitement par l'amiodarone induit une différence significative dans les proportions relatives des espèces saturées, 14,5%, monoinsaturées, 52,4% et polyinsaturées, 33,2% par rapport aux cellules contrôles où elles représentent respectivement 13,2%, 51,3% et 35,5%.

Tableau 46 : quantification des espèces moléculaires des PE cellulaires en AU/mg de prot, moyenne +/- sem, n=3 (RAW 264.7 ; HPLC-MS/MS)

Phosphatidyléthanolamine : espèces moléculaires (AU/mg de protéines)	Cellules contrôle (n=3)	Cellules amiodarone (n=3)	Cellules chloroquine (n=3)
PE32_0	0,45 ± 0,07	0,72 ± 0,04	0,62 ± 0,03
PE32_1	0,61 ± 0,09	1,07 ± 0,06	0,85 ± 0,04
PE32_2	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,07 ± 0,02
PE34_0	2,83 ± 0,43	4,20 ± 0,31	3,83 ± 0,09
PE34_1	1,09 ± 0,18	1,91 ± 0,18	1,75 ± 0,14
PE36_1	6,47 ± 0,99	8,13 ± 0,56	8,14 ± 0,45
PE36_2	4,54 ± 0,68	6,65 ± 0,57	6,55 ± 0,34
PE36_3	0,78 ± 0,14	1,18 ± 0,13	1,21 ± 0,12
PE36_4	0,25 ± 0,04	0,41 ± 0,04	0,37 ± 0,03
PE38_2	1,32 ± 0,22	1,43 ± 0,12	1,47 ± 0,11
PE38_3	2,08 ± 0,40	2,38 ± 0,15	2,41 ± 0,20
PE38_4	1,60 ± 0,28	2,10 ± 0,15	2,05 ± 0,13
PE38_5	0,17 ± 0,03	0,26 ± 0,03	0,24 ± 0,01
PE38_6	0,64 ± 0,11	0,95 ± 0,08	0,85 ± 0,04
PE40_3	0,48 ± 0,08	0,48 ± 0,03	0,51 ± 0,05
PE40_5	0,73 ± 0,12	0,90 ± 0,07	0,81 ± 0,02
PE40_6	0,62 ± 0,09	0,84 ± 0,05	0,73 ± 0,03
PE40_7	0,24 ± 0,04	0,36 ± 0,02	0,33 ± 0,02
Total PE	24,94 ± 3,94	34,01 ± 2,51	32,81 ± 1,73

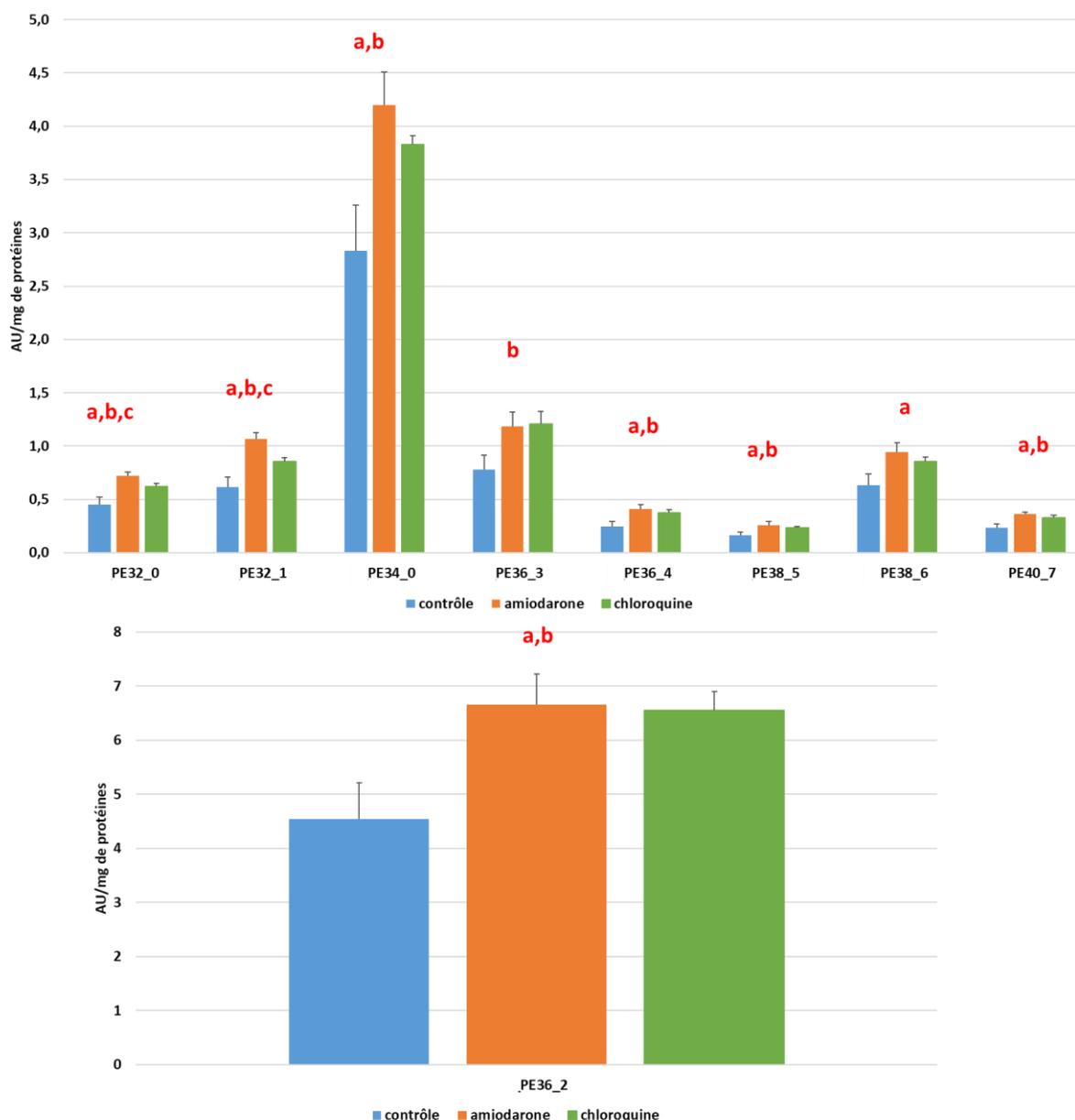


Figure 91 : Différence significative des espèces moléculaire des PE cellulaires analysées entre les différents traitements $p < 0.05$, moyenne \pm sem, $n=3$ (RAW 264.7 ; HPLC-MS/MS)

Bien que statistiquement non significative l'analyse des PE exosomales montre la diminution globale du contenu et des espèces moléculaires des PE après traitement par l'amiodarone. De plus, l'amiodarone induit une différence significative dans les proportions relatives des espèces saturées, 4,4%, et polyinsaturées, 80,3% par rapport aux cellules contrôles où elles représentent respectivement 3,3% et 83,3%. La chloroquine quant à elle, ne modifie pas le contenu et les espèces moléculaires de PE des exosomes (tableau 47), ni leurs proportions relatives.

Comme précédemment pour les PC exosomaux, les 2 CAD modifient de façon différente la sécrétion des PE exosomales. En effet, la diminution de la sécrétion des PE associées aux exosomes, en particulier les espèces polyinsaturées, est corrélée à leur accumulation au niveau cellulaire pour les cellules traitées avec l'amiodarone par rapport aux cellules contrôles.

Tableau 47 : quantification des espèces moléculaires des PE exosomales en AU/mg de prot, moyenne +/- sem, n=3, EV obtenu par UF-UC (RAW 264.7 ; HPLC-MS/MS)

Phosphatidyléthanolamine : espèces moléculaires (AU/mg de protéines)	EV contrôle (n=3)	EV amiodarone (n=3)	EV chloroquine (n=3)
PE32_0	1,13 ± 0,47	0,91 ± 0,37	1,43 ± 0,30
PE32_1	0,95 ± 0,41	0,87 ± 0,38	1,19 ± 0,22
PE32_2	0,08 ± 0,02	0,12 ± 0,04	0,24 ± 0,11
PE34_0	17,60 ± 7,66	12,41 ± 5,01	18,98 ± 5,27
PE34_1	6,82 ± 2,94	4,80 ± 2,02	7,19 ± 2,16
PE36_1	35,59 ± 15,99	19,79 ± 6,85	35,92 ± 11,80
PE36_2	34,06 ± 15,28	19,41 ± 7,22	33,96 ± 12,51
PE36_3	24,44 ± 11,21	13,31 ± 5,47	23,88 ± 10,06
PE36_4	27,23 ± 12,52	14,78 ± 6,22	26,52 ± 12,03
PE38_2	12,61 ± 5,81	6,70 ± 2,65	12,85 ± 4,73
PE38_3	104,94 ± 47,71	52,18 ± 20,76	102,86 ± 43,03
PE38_4	165,47 ± 75,91	81,86 ± 32,47	159,88 ± 70,60
PE38_5	18,02 ± 8,27	8,42 ± 3,22	16,69 ± 8,08
PE38_6	81,94 ± 37,83	39,62 ± 15,54	77,09 ± 37,27
PE40_3	2,41 ± 1,12	1,07 ± 0,39	2,36 ± 0,92
PE40_5	25,01 ± 11,66	10,97 ± 3,99	24,23 ± 10,54
PE40_6	20,55 ± 9,39	9,77 ± 3,51	19,82 ± 8,45
PE40_7	4,93 ± 2,21	2,54 ± 0,91	4,67 ± 1,95
Total PE	583,78 ± 266,18	299,51 ± 116,96	569,76 ± 239,16

- Les phosphatidylinositols

Globalement, on observe l'augmentation du contenu total et des espèces moléculaires des PI intracellulaires avec le traitement par les 2 CAD par rapport aux cellules contrôles (tableau 48, figure 92). L'amiodarone entraîne à nouveau une plus forte augmentation que la chloroquine. De plus après traitement par l'amiodarone ou la chloroquine, nous observons des différences significatives dans les proportions relatives des espèces saturées (respectivement en moyenne, 3,6% et 2,6%), monoinsaturées (respectivement en moyenne, 49,6% et 47,8%) et polyinsaturées (respectivement en moyenne, 46,8% et 49,6%) par rapport aux cellules contrôles où elles représentent pour les saturées 2,2%, monoinsaturées 44,1% et polyinsaturées 53,7%.

Tableau 48 : quantification des espèces moléculaires des PI cellulaires en AU/mg de prot, moyenne +/- sem, n=3 (RAW 264.7 ; HPLC-MS/MS)

Phosphatidylinositol : espèces moléculaires (AU/mg de protéines)	Cellules contrôle (n=3)	Cellules amiodarone (n=3)	Cellules chloroquine (n=3)
PI32_1	0,53 ± 0,10	2,17 ± 1,26	1,01 ± 0,58
PI34_1	4,53 ± 0,55	18,90 ± 10,91	8,54 ± 4,93
PI34_2	2,93 ± 0,45	12,18 ± 7,03	6,37 ± 3,68
PI36_0	6,73 ± 0,71	22,74 ± 13,13	10,99 ± 6,35
PI36_1	29,65 ± 3,40	91,26 ± 52,69	49,25 ± 28,43
PI36_2	40,79 ± 5,64	104,95 ± 60,59	69,08 ± 39,88
PI36_3	10,44 ± 1,70	24,53 ± 14,16	17,30 ± 9,99
PI38_1	7,70 ± 1,08	12,40 ± 7,16	9,82 ± 5,67
PI38_2	46,45 ± 8,50	65,63 ± 37,89	53,76 ± 31,04
PI38_3	94,99 ± 20,22	137,33 ± 79,29	108,95 ± 62,90
PI38_4	38,82 ± 7,50	82,96 ± 47,90	53,09 ± 30,65
PI38_5	7,51 ± 1,42	20,56 ± 11,87	11,20 ± 6,47
PI40_2	2,64 ± 0,36	4,61 ± 2,66	3,56 ± 2,05
PI40_3	5,12 ± 0,65	7,44 ± 4,29	5,98 ± 3,45
PI40_4	4,11 ± 0,52	7,21 ± 4,16	5,23 ± 3,02
PI40_5	3,74 ± 0,45	6,95 ± 4,01	4,50 ± 2,60
PI40_6	2,65 ± 0,33	5,59 ± 3,23	3,56 ± 2,05
Total PI	309,31 ± 53,03	627,42 ± 362,24	422,18 ± 243,74

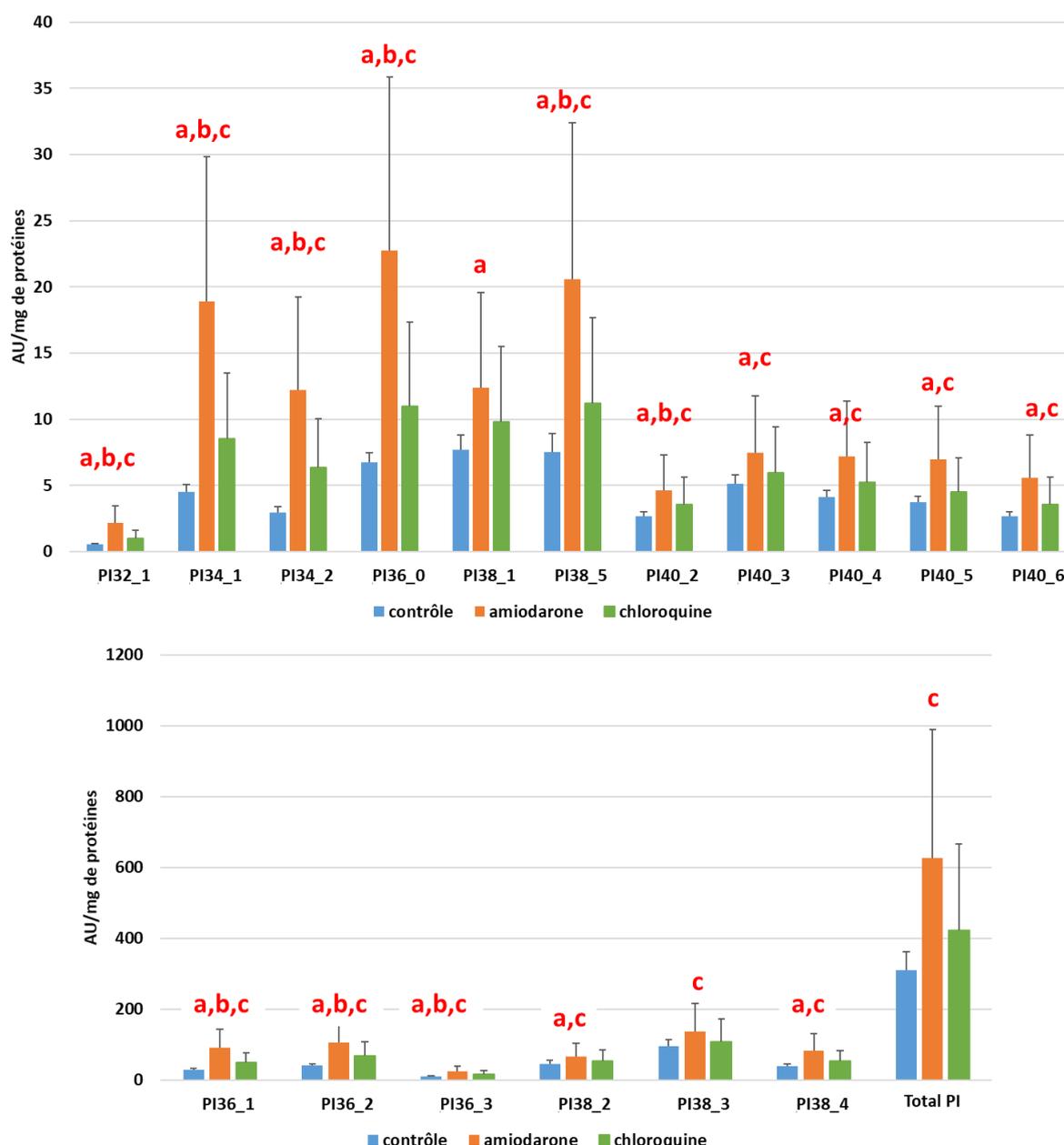


Figure 92 : Différence significative des espèces moléculaires des PI cellulaires analysées entre les différents traitements $p < 0.05$, moyenne \pm sem, $n=3$ (RAW 264.7 ; HPLC-MS/MS)

L'analyse des PI associés aux exosomes montre une augmentation, bien que non significative, du contenu total et des espèces moléculaires des PI avec les 2 CAD par rapport aux cellules contrôles (tableau 49, figure 93). De plus comme avec les PI cellulaires, l'amiodarone entraîne des variations significatives dans les proportions relatives des espèces saturées, en moyenne 5,4%, monoinsaturées, en moyenne 46% et polyinsaturées, en moyenne 48,6% par rapport aux cellules contrôles où elles représentent pour les saturées 3,2%, monoinsaturées 42,3% et polyinsaturées 54,5%.

A la différence des variations inverses entre les PC et PE cellulaires et ceux associés aux exosomes, l'amiodarone augmente à la fois les PI cellulaires et exosomaux. De plus comme pour les PE, les proportions relatives des espèces polyinsaturées des PI diminuent significativement dans les exosomes et dans les cellules traitées avec l'amiodarone par rapport aux cellules contrôles.

Tableau 49 : quantification des espèces moléculaires des PI exosomales en AU/mg de prot, moyenne +/- sem, n=3, EV obtenu par UF-UC (RAW 264.7 ; HPLC-MS/MS)

Phosphatidylinositol : espèces moléculaires (AU/mg de protéines)	EV contrôle (n=3)	EV amiodarone (n=3)	EV chloroquine (n=3)
PI32_1	0 ± 0	0,07 ± 0,07	0 ± 0
PI34_1	0,68 ± 0,23	1,31 ± 0,23	1,17 ± 0,27
PI34_2	0,45 ± 0,18	0,55 ± 0,08	0,89 ± 0,21
PI36_0	0,78 ± 0,22	1,87 ± 0,27	1,34 ± 0,27
PI36_1	2,42 ± 0,67	5,71 ± 0,97	4,25 ± 1,11
PI36_2	2,93 ± 1,09	4,29 ± 0,75	5,73 ± 1,29
PI36_3	0,89 ± 0,37	1,03 ± 0,18	1,82 ± 0,47
PI38_1	0,68 ± 0,23	0,74 ± 0,09	1,09 ± 0,23
PI38_2	3,06 ± 1,04	3,15 ± 0,61	4,66 ± 1,26
PI38_3	6,65 ± 2,55	6,86 ± 1,47	10,99 ± 3,02
PI38_4	3,41 ± 1,60	4,89 ± 1,06	6,58 ± 1,60
PI38_5	0,85 ± 0,41	1,34 ± 0,27	1,81 ± 0,33
PI40_2	0,30 ± 0,10	0,30 ± 0,03	0,25 ± 0,25
PI40_3	0,67 ± 0,28	0,68 ± 0,09	1,11 ± 0,20
PI40_4	0,84 ± 0,38	0,92 ± 0,12	1,48 ± 0,36
PI40_5	0,73 ± 0,34	0,89 ± 0,14	1,31 ± 0,28
PI40_6	0,47 ± 0,21	0,56 ± 0,08	0,85 ± 0,13
Total PI	25,82 ± 9,89	35,17 ± 6,20	45,33 ± 11,26

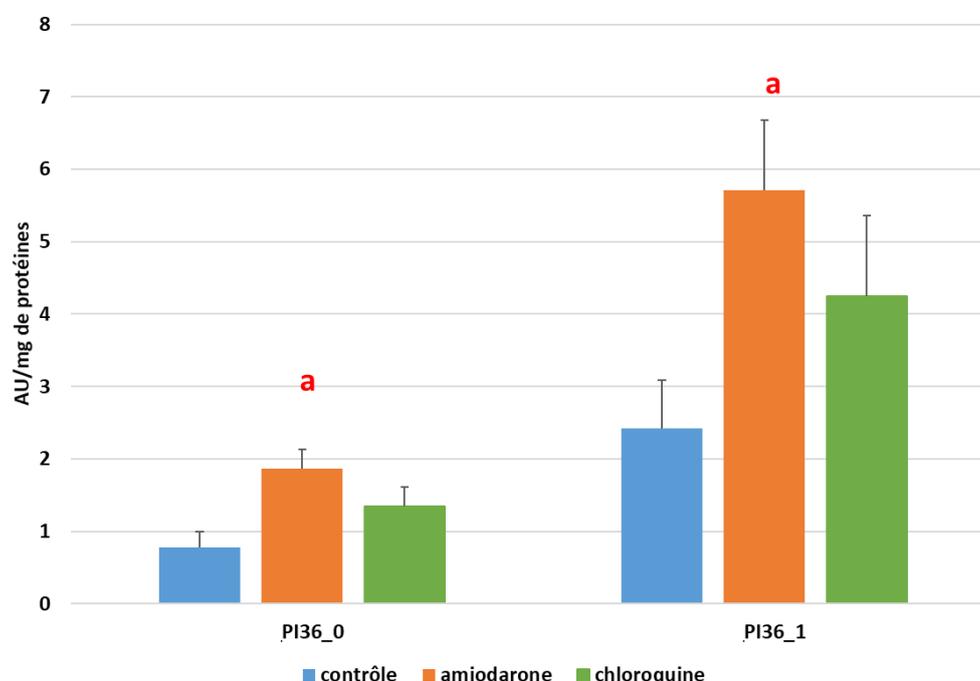


Figure 93 : Différence significative des espèces moléculaire des PI exosomales analysées entre les différents traitements $p < 0,05$, moyenne +/- sem, n=3, EV obtenu par UF-UC (RAW 264.7 ; HPLC-MS/MS)

- Les phosphatidylsérines

Comme pour les PI, les 2 CAD entraînent une augmentation du contenu total et des espèces moléculaires de PS cellulaires, les autres phospholipides anioniques, par rapport aux cellules contrôles. Cette augmentation est plus importante et significative pour l'amiodarone que pour la chloroquine (tableau 50, figure 94). Toutefois, nous n'observons pas de différence significative dans les proportions relatives des espèces saturées, monoinsaturées et polyinsaturées après traitement par l'amiodarone ou la chloroquine par rapport aux contrôles.

Tableau 50 : quantification des espèces moléculaires des PS cellulaires en AU/mg de prot, moyenne +/- sem, n=3 (RAW 264.7 ; HPLC-MS/MS)

Phosphatidylsérine : espèces moléculaires (AU/mg de protéines)	Cellules contrôle (n=3)	Cellules amiodarone (n=3)	Cellules chloroquine (n=3)
PS32_0	0,008 ± 0,001	0,02 ± 0,001	0,01 ± 0,0009
PS32_1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
PS34_0	0,06 ± 0,009	0,12 ± 0,007	0,08 ± 0,006
PS34_1	0,20 ± 0,03	0,40 ± 0,02	0,28 ± 0,02
PS34_2	0,02 ± 0,003	0,06 ± 0,003	0,03 ± 0,003
PS36_0	0,21 ± 0,04	0,33 ± 0,02	0,26 ± 0,02
PS36_1	0,16 ± 0,16	0,80 ± 0,40	0,31 ± 0,31
PS36_2	0,15 ± 0,02	0,32 ± 0,02	0,22 ± 0,02
PS36_3	0,01 ± 0,001	0,02 ± 0,001	0,01 ± 0,002
PS38_1	0,03 ± 0,006	0,05 ± 0,003	0,04 ± 0,003
PS38_2	0,06 ± 0,012	0,09 ± 0,003	0,07 ± 0,007
PS38_3	0,07 ± 0,013	0,11 ± 0,005	0,08 ± 0,008
PS38_4	0,02 ± 0,003	0,05 ± 0,005	0,03 ± 0,003
PS38_6	0,005 ± 0,0006	0,01 ± 0,001	0,007 ± 0,0005
PS40_4	0,04 ± 0,005	0,06 ± 0,005	0,04 ± 0,005
PS40_5	0,07 ± 0,010	0,10 ± 0,01	0,06 ± 0,009
PS40_6	0,06 ± 0,009	0,09 ± 0,01	0,05 ± 0,009
PS42_6	0,003 ± 0,0003	0,005 ± 0,0002	0,004 ± 0,0002
Total PS	1,18 ± 0,10	2,63 ± 0,48	1,59 ± 0,38

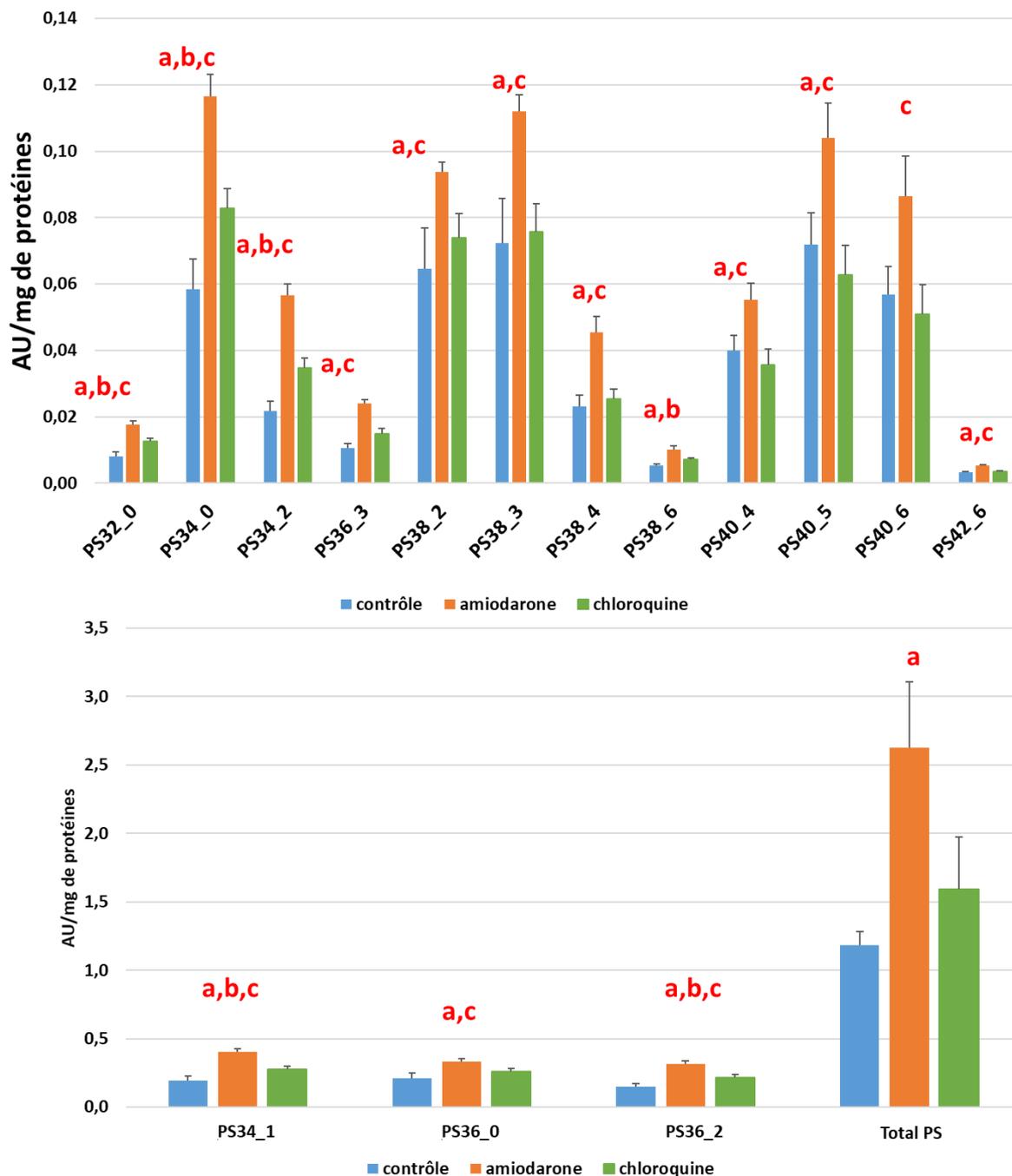


Figure 94 : Différence significative des espèces moléculaire des PE cellulaires analysées entre les différents traitements $p < 0.05$, moyenne \pm sem, $n=3$ (RAW 264.7 ; HPLC-MS/MS)

Malheureusement, l'analyse des espèces moléculaires de PS associées aux exosomes étant en dessous des limites de détection de la LC-MS, n'a pas permis leur évaluation dans nos échantillons.

Conclusion

L'ensemble de ces résultats sur l'effet des CAD sur la sécrétion des exosomes par les macrophages montre que l'amiodarone et la chloroquine ont stimulé la sécrétion des EV comme l'indique l'augmentation du nombre de vésicules avec les 2 CAD et des protéines avec l'amiodarone. Ces EV ont été caractérisées par la présence des marqueurs protéiques exosomaux ALIX et TSG101 et la mesure de leur diamètre moyen, 123 à 145 nm, compatible avec la taille des exosomes qui n'est pas modifiée par le traitement avec les CAD. De plus, nous avons vérifié au préalable que le temps de traitement et les concentrations de CAD utilisées ne semblaient pas toxiques (données non montrées).

L'analyse lipidique détaillée des cellules et des EV après 48h de sécrétion indique que les 2 CAD n'ont pas modifié de façon similaire la composition lipidique des EV et des cellules, suggérant donc qu'elles n'ont pas le même effet sur le métabolisme des lipides étudiés.

La chloroquine et l'amiodarone plus fortement, ont augmenté la quantité du di-oléate BMP associé aux EV par rapport aux EV des cellules contrôles. Le di-oléate BMP, espèce du BMP majoritaire dans les macrophages RAW264.7, est la seule espèce détectée dans les EV. Les 2 CAD ont aussi augmenté la quantité totale de céramides exosomales, légèrement plus avec la chloroquine qu'avec l'amiodarone, par rapport aux EV des cellules contrôles. De plus, l'amiodarone entraîne la diminution des SM exosomales alors que la chloroquine les augmente par rapport aux EV des cellules contrôles. Cette différence d'effet entre les 2 types de CAD est retrouvée pour les autres phospholipides (PC et PE) alors que les 2 CAD augmentent les PI exosomaux. Toutefois, ces variations ne sont pas significatives dans nos conditions de sécrétion.

L'ensemble des résultats sur les variations des SL et PL cellulaires confirme que les deux CAD ont bien perturbé le compartiment endolysosomal et interféré avec les mécanismes de dégradation de ces lipides (voir le chapitre 2.3.3 sur les hypothèses d'action des CAD). Toutefois, les effets variables selon ces CAD pourraient être liés à des mécanismes d'action différents en rapport avec les différences de variation du pH endolysosomal induites par ces bases faibles (Mitterreiter et al., 2010).

Tant au niveau des cellules qu'au niveau des EV, nous avons observé la production de céramides qui sont connus pour favoriser la sécrétion des exosomes (Trajkovic et al., 2008;

Verderio et al., 2018). Bien que l'importance de la longueur de la chaîne acyle sur les propriétés fonctionnelles des céramides ne soit pas complètement établie (Hannun & Obeid, 2018), les variations induites pourraient moduler la formation de domaines membranaires enrichis en céramides (Nurminen et al., 2002) et donc avoir un impact sur la sécrétion des exosomes. Ainsi l'augmentation des VLC-céramides observée dans les exosomes alors que les VLC-SM ont diminué dans les cellules traitées par la chloroquine, suggère l'implication de la nSMase2 dans la stimulation de la sécrétion exosomale, puisque la celle-ci aurait une préférence pour les C24 :0 et C24 :1 SM (Gault et al., 2010).

Enfin, notre analyse lipidique n'a pas permis pas de faire une comparaison des ratios entre les différents lipides au niveau des cellules et des EV. En effet comme souligné par Skotland *et al* (Skotland et al., 2017), la plupart des analyses lipidiques publiées sur les EV présentent une imprécision non négligeable due aux différences de sensibilité de détection en masse des espèces moléculaires et ceci d'autant plus qu'elles sont minoritaires. A cette variation s'ajoute en plus l'hétérogénéité des populations d'EV sécrétées. Toutefois, nous avons montré que le traitement par l'amiodarone a diminué la sécrétion de cholestérol libre via les exosomes et induit une augmentation du cholestérol intracellulaire en accord avec la perturbation du compartiment endolysosomal induite par cette CAD (Palmeri et al., 1995; Piccoli et al., 2011)

De façon à étudier plus en détail, le lien entre la quantité de BMP et de cholestérol libre intracellulaire et la sécrétion des exosomes, nous avons utilisé des modèles différents de surcharge en cholestérol.

16.3 Dysfonctionnement endo-lysosomal induit lors de surcharge en cholestérol génétique ou induite

Introduction

Les surcharges en cholestérol peuvent être génétiques comme par exemple la maladie de Niemann Pick de type C, ou bien induites par l'alimentation. La NPC est une maladie rare, mais grave car elle touche généralement des enfants, qui développent de graves troubles neurologiques (Vanier, 2010). L'athérosclérose quant à elle fait partie des maladies qui tue le plus de personnes dans le monde. Malheureusement à l'heure actuelle il y a peu de traitement permettant de limiter la surcharge en cholestérol cellulaire. Les statines sont des inhibiteurs de la HMG-CoA réductase, permettant de réduire la synthèse de cholestérol, mais ne diminuant pas les surcharges liées à un problème du transport du cholestérol par exemple. Nous proposons donc dans cette partie d'étudier la participation du BMP dans la sécrétion des exosomes pour éliminer l'excès de cholestérol libre et de lipides intracellulaires en utilisant 2 modèles cellulaires différents. :

- des fibroblastes de patients atteints de NPC et de sujets contrôles
- des macrophages murins, la lignée RAW 264.7, traités avec différents stimuli

16.3.1 Dysfonctionnement endo-lysosomal induit par la maladie de Niemann-Pick de type C (fibroblastes humains)

Les fibroblastes contrôles et NPC ont été mis à sécréter en milieu conditionné sans EV (EV free) pendant 48h (chapitres 7.3). Puis les EV ont été récoltées par UF-UC, et caractérisées par Western blot, la quantité de protéines et la taille et le nombre de vésicules par NTA. L'analyse lipidique du BMP et des autres lipides n'a pu être réalisée que sur les cellules après 48h de sécrétion. Malheureusement, nous n'avons pas pu analyser les lipides des EV en raison d'une trop faible quantité d'échantillon.

16.3.1.1 Caractérisation des exosomes sécrétés par des fibroblastes contrôles ou de NPC

Les EV isolées par UF-UC ont été analysées par western blot pour caractériser la présence d'exosomes (Figure 95).

On observe la présence des marqueurs protéiques exosomaux CD63 et CD81 dans les EV de sujets contrôles et de NPC. Le marquage de CD81 est plus fort pour les sujets NPC que pour les contrôles, ce qui indiquerait une plus grande quantité d'exosomes sécrétés par les fibroblastes NPC (protéines sécrétées dans les EV des NPC plus faible données non montrées). De plus, le diamètre moyen des vésicules a été analysé par NTA pour un contrôle et un patient NPC (en triplicata pour chaque préparation d'EV). Les valeurs obtenues correspondent à des tailles compatibles avec des exosomes (Contrôle : 116 nm, NPC : 112nm) et ne montrent pas de différence entre le NPC et le contrôle.

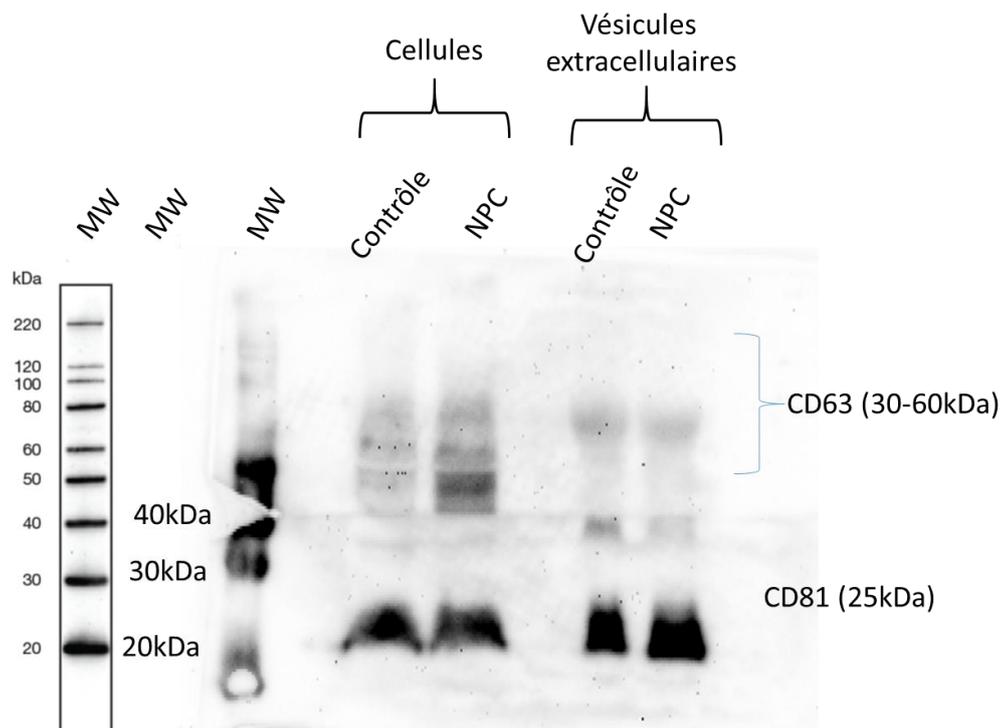


Figure 95 : caractérisation de la présence d'exosomes par western blot, marqueurs utilisés CD63 et CD81, dépôts réalisés à volume égal $v=15\mu\text{L}$, un western blot représentatif ($n=3$), EV obtenu par UF-UC (fibroblastes)

16.3.1.2 Variation de la composition lipidique des fibroblastes contrôles et NPC

16.3.1.2.1 Effet sur le contenu et la composition du BMP des fibroblastes

Comme attendu, nous observons une augmentation, bien que non significative, du BMP total et de toutes ses espèces moléculaires dans les cellules NPC par rapport aux contrôles à l'exception de l'espèce PaD-BMP (tableau 51) (Pa = acide palmitoléique ; D=DHA). Une augmentation significative de la proportion des espèces polyinsaturées du BMP est observée dans les cellules NPC (66%) par rapport aux contrôles (49%), dont l'espèce l'oléoyl docosahexaénoyl OD-BMP qui représente 32,7% et 25,7% des espèces du BMP dans les NPC et les contrôles, respectivement. De plus par rapport au BMP des cellules RAW 264.7 (tableau 39), les espèces majoritaires du BMP des fibroblastes sont le di-DHA BMP (14%) et l'OD-BMP (26-33%) pour les contrôles et les NPC.

Tableau 51 : quantification des espèces moléculaires du BMP cellulaires en nmol/mg de prot, moyenne +/- sem, n=3 (un tableau se trouve en annexe pour la correspondance des acide gras), * pvalue <0.05. espèces considérées comme polyinsaturées

BMP (Bis(monoacylglycéro)phosphate) : espèces moléculaires (nmol/mg de protéines)		Cellules contrôle (n=3)			Cellules NPC (n=3)		
PP BMP	C16:0,C16:0	1,64	±	0,07	1,94	±	0,15
LL BMP	C18:2n-6,C18:2n-6	0	±	0	0	±	0
SS BMP	C18:0,C18:0	0,46	±	0,03	0,36	±	0,13
di DPA BMP	C22:5n-3,C22:5n-3/6	0,008	±	0,002	0,015	±	0,006
AA BMP	C20:4n-6,C20:4n-6	0,002	±	0,000	0,007	±	0,005
ODTA BMP	C18:1,C22:4n-6	0,014	±	0,011	0,011	±	0,004
OA BMP	C18:1n-9,C20:4n-6	0,04	±	0,005	0,17	±	0,11
OETA BMP	C18:1n-9,C20:3n-6/9	0,03	±	0,000	0,16	±	0,12
OEE BMP	C18:1n-9,C20:2n-6	0	±	0	0,04	±	0,02
PO BMP	C16:0,C18:1n-9	0,006	±	0,004	0,08	±	0,05
OL BMP	C18:1n-9,C18:2n-6	0,02	±	0,01	0,18	±	0,14
OO BMP	C18:1n-9,C18:1n-9	0,07	±	0,009	0,46	±	0,19
SO BMP	C18:0,C18:1n-9	0,02	±	0,004	0,06	±	0,04
ODPA BMP	C18:1n-9,C22:5n-3/6	0,09	±	0,008	0,64	±	0,37
OD BMP	C18:1n-9,C22:6n-3	1,13	±	0,15	3,21	±	1,08
PaD BMP	C16:1n-9,C22:6n-3	0,006	±	0,004	0,03 *	±	0,006
PD BMP	C16:0,C22:6n-3	0,03	±	0,016	0,24	±	0,10
AD BMP	C20:4n-6,C22:6n-3	0,07	±	0,011	0,17	±	0,08
DD BMP	C22:6n-3,C22:6n-3	0,59	±	0,06	1,41	±	0,49
LD BMP	C18:2n-6,C22:6n-3	0,09	±	0,013	0,33	±	0,15
SD BMP	C18:0,C22:6n-3	0,04	±	0,003	0,22	±	0,11
Total BMP		4,37	±	0,09	9,72	±	3,29

16.3.1.3 Effet sur le contenu en cholestérol des fibroblastes

Après 48h de sécrétion, on observe toujours une augmentation significative de la quantité de cholestérol libre dans les cellules NPC par rapport aux cellules contrôles (figure 96). Comme attendu, les taux d'esters de cholestérol ne montrent pas de différence significative entre les cellules contrôles et NPC : $0,37 \pm 0,07$ et $0,49 \pm 0,10$ AU/mg protéines , respectivement (moyenne \pm sem, n=3). Ceci indique que le phénotype NPC est toujours maintenu dans nos conditions expérimentales.

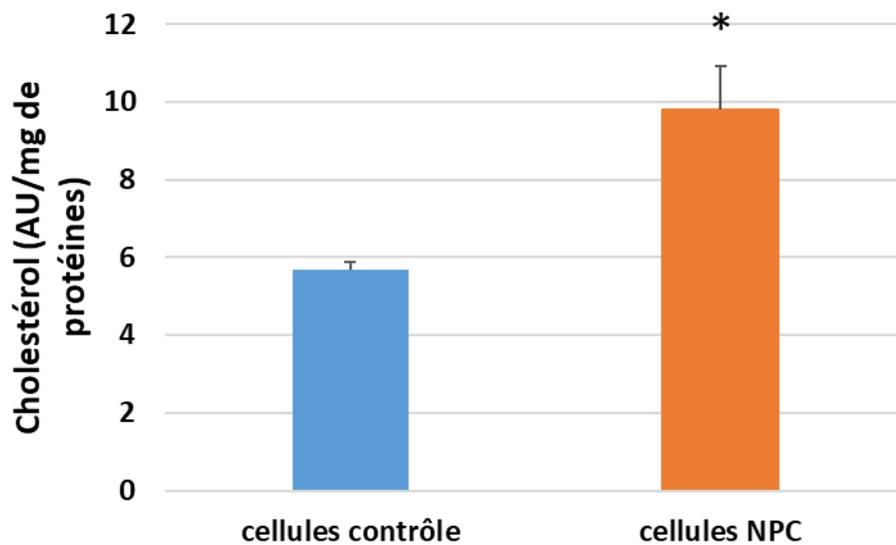


Figure 96 : quantité de cholestérol cellulaire en AU/mg de protéines, moyenne +/- sem, n=3 (fibroblaste, GC-FID)

16.3.1.4 Effet sur le contenu en sphingolipides et glycérophospholipides des fibroblastes

16.3.1.4.1 Effet sur les sphingolipides

- Les céramides

L'analyse des céramides montre que leur quantité globale ainsi que leurs espèces moléculaires diminuent dans les cellules NPC par rapport aux contrôles bien que de façon non significative (tableau 52). De plus, nous n'observons pas de variation des proportions relatives des LC-, VLC- et ULC-céramides entre les cellules NPC et les contrôles (LC- : long chain, VLC- : very long chain, ULC- ultra long chain).

Tableau 52 : quantification des espèces moléculaires de céramides cellulaires en AU/mg de prot, moyenne +/- sem, n=3 (fibroblaste, HPLC-MS/MS)

Céramides : espèces moléculaires (AU/mg de protéines)	Cellules contrôle (n=3)		Cellules NPC (n=3)	
Cerd18_1.16_0	17,204	± 7,09	13,87	± 4,19
Cerd18_1.16_1	0,18	± 0,07	0,17	± 0,04
Cerd18_1.18_0	1,44	± 0,85	1,29	± 0,66
Cerd18_1.18_1	0,07	± 0,03	0,08	± 0,03
Cerd18_1.20_0	0,31	± 0,19	0,24	± 0,11
Cerd18_1.22_0	2,65	± 1,43	2,03	± 0,79
Cerd18_1.24_0	12,80	± 5,42	10,03	± 2,78
Cerd18_1.24_1	9,62	± 4,61	7,49	± 2,15
Cerd18_1.26_0	0,62	± 0,24	0,40	± 0,03
Cerd18_1.26_1	0,52	± 0,20	0,36	± 0,01
Total Cer	45,41	± 20,10	35,95	± 10,77

- Les sphingomyélines

En parallèle, nous n’observons pas d’augmentation significative de la quantité totale de SM dans les cellules NPC par rapport aux contrôles (tableau 53). Néanmoins, les proportions relatives de LC-SM sont significativement diminuées (57,5% et 65,4%, respectivement) dans les cellules NPC par rapport aux cellules contrôles, alors que les VLC-SM sont significativement augmentées (42,5% et 34,6%, respectivement).

Malgré la faible augmentation du taux global de sphingomyéline, les variations de leurs proportions relatives ainsi que la diminution du taux des céramides suggèrent que le métabolisme des sphingomyélines est toujours perturbé dans les cellules NPC après 48h de sécrétion.

Tableau 53 : quantification des espèces moléculaires des SM cellulaires en AU/mg de prot, moyenne +/- sem, n=3 (fibroblaste, HPLC-MS/MS)

Sphingomyélines : espèces moléculaires (AU/mg de protéines)	Cellules contrôle (n=3)		Cellules NPC (n=3)	
SM18_1.14_0	23,85	± 1,57	22,71	± 2,96
SM18_1.16_0	511,57	± 24,24	441,93	± 111,29
SM18_1.16_1	38,77	± 2,25	35,38	± 4,77
SM18_1.18_0	16,89	± 1,27	21,72	± 8,53
SM18_1.18_1	5,80	± 0,26	6,48	± 1,78
SM18_1.20_0	2,96	± 0,24	6,56	± 2,63
SM18_1.20_1	0,90	± 0,04	1,67	± 0,56
SM18_1.22_0	30,83	± 2,56	43,28	± 15,65
SM18_1.22_1	17,17	± 0,57	24,37	± 7,08
SM18_1.24_0	83,19	± 6,81	91,40	± 28,19
SM18_1.24_1	180,19	± 2,13	228,94	± 57,71
Total SM	912,11	± 22,27	924,45	± 239,78

16.3.1.4.2 Effet sur les glycérophospholipides (PC, PE, PI, PS)

- Les phosphatidylcholines et phosphatidyléthanolamine

L'analyse des phospholipides neutres PC et PE des fibroblastes après 48h de sécrétion montre une diminution non significative de leur quantité globale ainsi que de la plupart de leurs espèces moléculaires dans les cellules NPC par rapport aux contrôles (tableaux 54 et 55). De plus, les proportions relatives de leurs espèces moléculaires ne montrent pas de différence entre les cellules NPC et les contrôles.

Tableau 54 : quantification des espèces moléculaires des PC cellulaires en AU/mg de prot, moyenne +/- sem n=3 (fibroblaste, HPLC-MS/MS)

Phosphatidylcholine : espèces moléculaires (AU/mg de protéines)	Cellules contrôle (n=3)		Cellules NPC (n=3)	
PC28_0	3,37	± 0,26	1,53	± 1,03
PC30_0	72,75	± 4,91	48,42	± 22,85
PC30_1	14,52	± 1,21	12,78	± 2,62
PC32_0	151,61	± 14,75	126,64	± 30,89
PC32_1	150,17	± 12,80	129,83	± 25,15
PC32_2	9,97	± 0,89	9,01	± 1,51
PC34_0	45,71	± 4,49	38,51	± 8,69
PC34_1	283,45	± 29,40	225,17	± 49,60
PC34_2	75,89	± 8,05	63,13	± 12,75
PC34_3	7,60	± 0,87	6,02	± 1,89
PC36_1	12,46	± 1,12	11,79	± 1,43
PC36_2	158,64	± 13,21	124,19	± 35,24
PC36_3	140,29	± 14,23	118,28	± 18,68
PC36_4	30,94	± 2,43	25,96	± 8,32
PC38_2	27,12	± 3,14	20,03	± 11,37
PC38_3	27,67	± 3,28	21,27	± 5,03
PC38_4	53,05	± 3,75	39,12	± 14,13
PC38_5	15,47	± 1,52	11,84	± 5,39
PC38_6	26,42	± 2,62	18,74	± 6,81
PC40_3	89,39	± 6,10	66,90	± 26,55
PC40_6	3,99	± 0,34	3,10	± 0,77
Total PC	1400,49	± 114,98	1122,26	± 276,58

Tableau 55 : quantification des espèces moléculaires des PE cellulaires en AU/mg de prot, moyenne +/- sem, n=3 (fibroblaste, HPLC-MS/MS)

Phosphatidyléthanolamine : espèces moléculaires (AU/mg de protéines)	Cellules contrôle (n=3)		Cellules NPC (n=3)	
PE32_0	4,90	± 0,82	4,68	± 1,44
PE32_1	4,63	± 0,98	4,69	± 1,38
PE32_2	1,22	± 0,30	0,99	± 0,53
PE34_0	65,45	± 12,88	66,76	± 19,63
PE34_1	23,68	± 5,26	21,89	± 6,65
PE36_1	126,26	± 23,94	138,01	± 40,98
PE36_2	121,51	± 26,53	116,67	± 35,14
PE36_3	65,31	± 17,03	54,10	± 20,31
PE36_4	54,38	± 14,61	42,02	± 18,47
PE38_2	33,80	± 7,28	28,20	± 11,31
PE38_3	280,58	± 66,26	228,63	± 95,36
PE38_4	434,26	± 105,73	351,11	± 147,24
PE38_5	53,35	± 15,17	44,24	± 16,81
PE38_6	207,27	± 54,83	165,26	± 66,91
PE40_3	7,81	± 1,71	8,97	± 2,80
PE40_5	76,36	± 19,84	70,08	± 22,93
PE40_6	65,31	± 16,53	56,46	± 19,92
PE40_7	23,08	± 6,60	18,73	± 6,52
Total PE	1649,15	± 396,23	1421,47	± 511,56

- Les phosphatidylinositols et les phosphatidylsérines

L'analyse des phospholipides anioniques PI et PS des fibroblastes après 48h de sécrétion montre une augmentation de la quantité globale ainsi que de certaines espèces moléculaires des PI dans les cellules NPC par rapport aux contrôles (tableau 56 avec significativité pour PI 32 :1 et 38 :1). Par contre, aucune variation n'est observée pour les PS entre les cellules NPC et les contrôles (Tableau 57). De plus, les proportions relatives des espèces moléculaires de PI et PS ne montrent pas de différence entre les cellules NPC et les contrôles.

Tableau 56 : quantification des espèces moléculaires des PI cellulaires en AU/mg de prot, moyenne +/- sem, n=3 (fibroblaste, HPLC-MS/MS), * pvalue <0.05.

Phosphatidylinositol : espèces moléculaires (AU/mg de protéines)	Cellules contrôle (n=3)			Cellules NPC (n=3)		
PI32_1	1,34	±	0,10	1,74*	±	0,11
PI34_1	11,25	±	0,63	14,75	±	2,83
PI34_2	4,76	±	0,43	5,55	±	0,68
PI36_0	5,31	±	0,73	7,47	±	1,07
PI36_1	18,29	±	2,43	24,75	±	3,82
PI36_2	16,72	±	2,34	21,83	±	2,53
PI36_3	6,87	±	0,92	7,14	±	1,62
PI38_1	0,91	±	0,08	1,40*	±	0,10
PI38_2	10,10	±	1,55	12,09	±	2,33
PI38_3	75,53	±	10,86	78,34	±	22,83
PI38_4	165,53	±	23,71	162,06	±	54,47
PI38_5	33,56	±	2,45	31,13	±	9,86
PI40_2	2,40	±	0,27	2,33	±	0,33
PI40_3	3,72	±	0,31	3,44	±	0,36
PI40_4	10,03	±	1,49	8,77	±	2,53
PI40_5	12,70	±	2,59	11,36	±	4,22
PI40_6	6,08	±	1,21	5,59	±	2,16
Total PI	385,12	±	51,05	399,73	±	109,54

Tableau 57 : quantification des espèces moléculaires des PS cellulaires en AU/mg de prot, moyenne +/- sem, n=3 (fibroblaste, HPLC-MS/MS)

Phosphatidylsérine : espèces moléculaires (AU/mg de protéines)	Cellules contrôle (n=3)			Cellules NPC (n=3)		
PS32_0	0,02	±	0,003	0,02	±	0,003
PS32_1	0	±	0	0	±	0
PS34_0	0,10	±	0,01	0,12	±	0,02
PS34_1	0,23	±	0,03	0,23	±	0,03
PS34_2	0,02	±	0,002	0,02	±	0,002
PS36_0	0,64	±	0,05	0,66	±	0,04
PS36_1	2,04	±	0,14	1,51	±	0,58
PS36_2	0,22	±	0,02	0,25	±	0,02
PS36_3	0,01	±	0,002	0,01	±	0,0007
PS38_1	0,07	±	0,01	0,08	±	0,004
PS38_2	0,12	±	0,009	0,12	±	0,02
PS38_3	0,24	±	0,01	0,21	±	0,05
PS38_4	0,10	±	0,006	0,08	±	0,02
PS38_6	0,02	±	0,002	0,02	±	0,002
PS40_4	0,33	±	0,01	0,25	±	0,12
PS40_5	0,35	±	0,003	0,29	±	0,17
PS40_6	0,21	±	0,012	0,21	±	0,13
PS42_6	0,02	±	0,00	0,02	±	0,005
Total PS	4,73	±	0,27	4,09	±	0,92

16.3.1.5 Conclusion

Cette étude montre qu'après 48h de sécrétion, les fibroblastes sécrètent des EVs caractérisées par la présence des marqueurs exosomaux CD63 et TSG101 qui semblent enrichies dans les EV de patients NPC par rapport aux sujets contrôles. Malgré la détection du BMP dans des préparations d'EV non purifiées (en particulier l'espèce di-DHA-BMP, résultat non montré) lors d'expérience préliminaire, nous n'avons pas pu analyser de façon fiable le BMP dans les EV purifiées par UF-UC. En effet, le faible rendement de purification mais aussi la limite de croissance cellulaire des fibroblastes en milieu conditionné ne permet pas d'obtenir suffisamment de cellules en conservant le phénotype NPC.

Toutefois, l'analyse lipidique des fibroblastes de patients NPC a permis de prouver que les fibroblastes NPC contenaient plus de cholestérol et de BMP que les cellules contrôles après 48h de sécrétion, confirmant donc le dysfonctionnement endo-lysosomal qui a été vérifié aussi par immunofluorescence (données non présentées). De plus, nous montrons l'enrichissement du BMP en espèces docosahexaenoates en particulier le di-DHA-BMP, complétant donc l'analyse publiée sur le BMP des fibroblastes contrôles (Scherer et al., 2010). La diminution des céramides et l'augmentation des SM suggèrent toujours la perturbation du catabolisme des sphingolipides dans les cellules NPC par rapport aux cellules contrôles, ces faibles variations non significatives indiquent que le phénotype NPC puisse être modifié lors des subcultures des primocultures de fibroblastes NPC (Kobayashi et al., 1999; Vanier, 2015).

Les fibroblastes de peau de patients NPC ont été très utiles pour la caractérisation et le diagnostic de cette maladie (Vanier, 2015). L'utilisation d'autres types cellulaires (CHO, HeLa) KO pour les protéines NPC1 et /ou NPC2 a permis de préciser le mécanisme d'action de ces protéines avec toutefois de possibles effets secondaires dus à la répression du gène (Feldes et al., 2020; Pipalia et al., 2017). Enfin, les études métaboliques plus récentes sur la NPC s'orientent vers l'utilisation des cellules-cible de cette maladie : les cellules neuronales différenciées par reprogrammation de cellules souches obtenues à partir de fibroblastes de patients NPC présentant donc uniquement la mutation impliquée dans la pathologie (Inytska, Lai, et al., 2021; D. Yu et al., 2014). L'utilisation de ces différents modèles a donc permis d'évaluer l'implication de la sécrétion du cholestérol via les exosomes (Inytska, Jeziorek, et

al., 2021; Strauss et al., 2010) et de l'exocytose via la sécrétion lysosomale (F. W. Chen et al., 2010; Vacca et al., 2019) dans la pathologie NPC.

Nous avons alors choisi pour compléter notre étude sur l'implication du BMP dans la sécrétion exosomale du cholestérol d'utiliser à nouveau le modèle des macrophages RAW caractérisés précédemment pour leur richesse en BMP, la sécrétion d'exosomes contenant du BMP et leur engorgement en cholestérol suite à l'incubation avec des lipoprotéines.

16.3.2 Dysfonctionnement endo-lysosomal consécutif à une surcharge en cholestérol induite par différents traitements dans les macrophages RAW 264.7

Introduction

Pour poursuivre l'étude de l'implication du BMP dans la sécrétion des exosomes et l'élimination de l'excès de cholestérol et autres lipides accumulés dans le compartiment endo-lysosomal au cours de surcharge en cholestérol, les macrophages murins RAW 264.7 ont été mis en culture avec différents stimuli pendant 24h (à l'exception de l'U18666A qui est maintenu pendant le temps de sécrétion (72h au total)), puis mis à sécréter en milieu conditionné pendant 48h (voir chapitre 7.2 pour le détail des protocoles expérimentaux). Les EV ont été ensuite purifiées par UF-UC et caractérisées par la présence des marqueurs protéiques exosomaux (Western blot) et par leur taille et nombre (NTA). Les différents lipides des cellules et des EVs ont été analysés par MS. Trois stimuli sont utilisés seuls ou en combinaison :

-un agent pharmacologique : l'U18666A (abréviation U18), cet agent mime un phénotype NPC et permet de séquestrer le cholestérol libre dans les endosomes (Liscum & Faust, 1989; Underwood et al., 1996).

-les LDL acétylées (acLDL) : les acLDL induisent une surcharge en cholestérol. En effet grâce à leur acétylation, les acLDL vont rentrer de façon non régulée dans les cellules (Basu et al., 1976).

-le di-oléate PG : caractérisé comme précurseur du BMP, il augmente la concentration intracellulaire du BMP et donc d'étudier-l'effet sur la sécrétion d'exosomes.

Comme dans les 2 parties expérimentales précédentes (Chapitre 16.2 et Chapitre 16.3.1), les résultats des analyses des espèces moléculaires du BMP sont présentées sous plusieurs formes:

-sous forme de tableau, où sont regroupés toutes les espèces moléculaires en fonction des différents traitements.

-sous forme d'histogramme, où sont schématisées uniquement les espèces moléculaires qui varient de façon significative en fonction des différents traitements.

Enfin un code représentatif du traitement est utilisé pour représenter la significativité des analyses statistiques pour une valeur de $p < 0.05$ en comparant 2 moyennes par test T de Student :

-a : la valeur de l'espèce moléculaire est significativement différente entre le groupe contrôle et le groupe PG.

-b: la valeur de l'espèce moléculaire est significativement différente entre le groupe contrôle et le groupe acLDL.

-c: la valeur de l'espèce moléculaire est significativement différente entre le groupe contrôle et le groupe acLDL PG.

-d : la valeur de l'espèce moléculaire est significativement différente entre le groupe contrôle et le groupe acLDL U18.

-e : la valeur de l'espèce moléculaire est significativement différente entre le groupe acLDL et le groupe PG.

-f: la valeur de l'espèce moléculaire est significativement différente entre le groupe acLDL U18 et le groupe PG.

-g: la valeur de l'espèce moléculaire est significativement différente entre le groupe LDL PG et le groupe PG.

-h : la valeur de l'espèce moléculaire est significativement différente entre le groupe acLDL U18 et le groupe acLDL.

-i: la valeur de l'espèce moléculaire est significativement différente entre le groupe acLDL PG et le groupe acLDL.

-j: la valeur de l'espèce moléculaire est significativement différente entre le groupe acLDL PG et le groupe acLDL U18.

16.3.2.1 Caractérisation des exosomes sécrétés par les macrophages RAW 264.7 lors de surcharge en cholestérol

Après purification des EV par UF-UC suite aux différentes conditions de stimulation des cellules RAW, la caractérisation des exosomes est faite par Western blot par la présence des marqueurs exosomaux ALIX et TSG101. 2 western blot représentatifs sont présentés dans la figure 97. La figure 97 A regroupe les conditions contrôle, acLDL, acLDL+PG et PG. La figure 97 B regroupe les conditions contrôle, acLDL +U18666A et acLDL.

Quel que soit le traitement utilisé, les EV sécrétées par les cellules RAW contiennent des marqueurs d'exosomes. De plus, on peut constater que les signaux sont beaucoup plus faibles pour les EV sécrétées par des cellules traitées seulement avec des acLDL.

Les cellules RAW 264.7 produisent des exosomes dans des conditions de surcharge en cholestérol ou d'augmentation de la concentration intracellulaire de BMP.

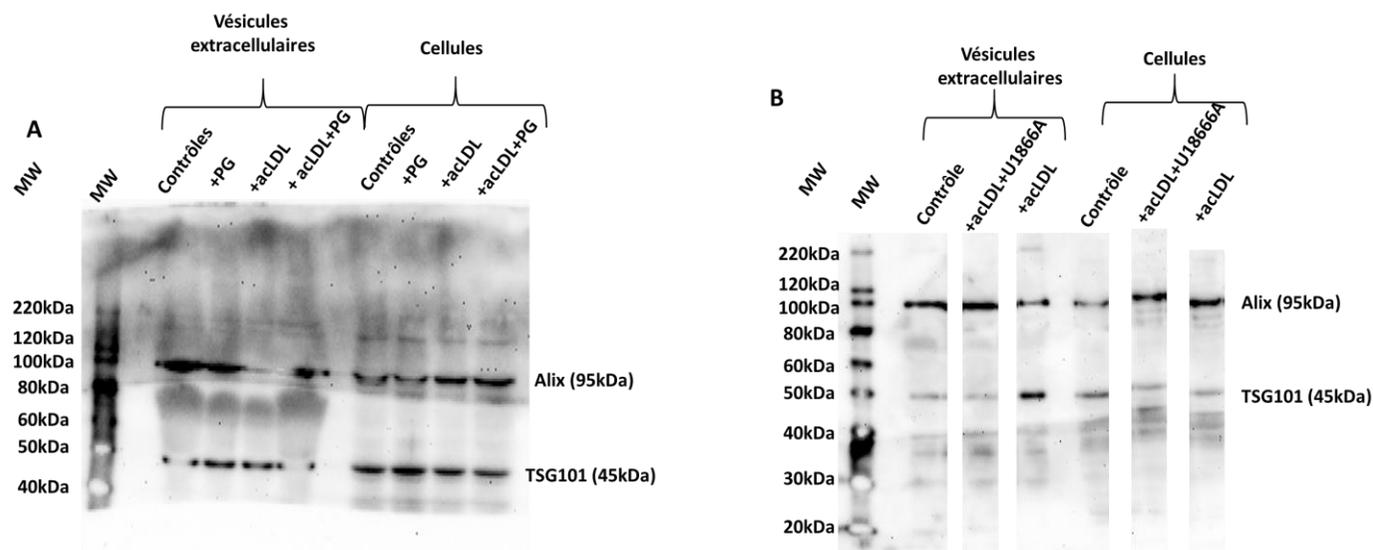


Figure 97 : caractérisation de la présence d'exosomes par western blot, marqueurs utilisés ALIX et TSG101, dépôts réalisés à volume égales $v = 15\mu\text{L}$, western blot représentatif ($n=3$), EV obtenu par UF-UC (RAW 264.7)

Tableau 58 : Caractéristiques des EV sécrétées par les macrophages RAW 264.7 traités avec des acLDL (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 24h de pré incubation), du PG (30 μM , 24H de pré incubation) et de l'U18666A (24h de préincubation +48h de sécrétion) associé ou non. – les protéines des EV ont été dosées par la méthode de Bradford. Le nombre, diamètre et distribution de taille des vésicules ont été analysés par NTA et représentent les moyennes \pm sem de 3 expériences, * $p < 0,05$ pour les acLDL PG par rapport au acLDL, PG, et acLDL +U18666A.

étude de la sécrétion des vésicules										
nombre de vésicules ($\times 10^6/10^6$ cellules)	contrôles (n=6)		PG (n=3)		acLDL (n=6)		acLDL+PG(n=3)		acLDL + U18666A(n=3)	
		112,7	\pm 38,2	78,4	\pm 10,7	61,4	\pm 8,8	126,3	\pm 32,4	
protéines des vésicules ($\mu\text{g}/10^6$ cellules)	contrôles (n=3)		PG (n=3)		acLDL (n=3)		acLDL+PG(n=3) *		acLDL + U18666A(n=3)	
	0,34	\pm 0,05	0,29	\pm 0,02	0,24	\pm 0,02	0,41	\pm 0,03	0,27	\pm 0,02
caractérisation des vésicules										
protéines des vésicules ($\mu\text{g}/10^9$ vésicules)	contrôles (n=3)		PG (n=3)		acLDL (n=3)		acLDL+PG(n=3)		acLDL + U18666A(n=3)	
	3,48	\pm 0,77	3,79	\pm 0,47	4,33	\pm 0,2	4,61	\pm 1,42		
diamètre des vésicules (nm)	146,1	\pm 11,8	134,5	\pm 3,1	129,5	\pm 2,9	140,5	\pm 11,1		
D10 (10% des EV diamètre <nm)	96,3	\pm 6,6	90,8	\pm 4,8	84,4	\pm 1,5	90,1	\pm 6		
D50 (50% des EV diamètre <nm)	131,8	\pm 9,1	125,9	\pm 5,1	121	\pm 2,5	128,5	\pm 8,4		
D90 (90% des EV diamètre <nm)	217,9	\pm 29,9	187,1	\pm 3,7	186,4	\pm 4,7	209,8	\pm 20,8		

Alors que le traitement par les acLDL entraîne une diminution non significative de la sécrétion des protéines des EV par rapport aux cellules contrôles, la co-incubation acLDL + PG induit une augmentation significative de leur sécrétion par rapport aux EV des cellules traitées uniquement avec les acLDL ou avec le PG ou avec les acLDL+ U18666A (Tableau 58).

L'absence de toxicité suite aux différents traitements a été vérifiée par la croissance cellulaire. Alors que le traitement par les acLDL seules ou en co-incubation avec le U18666A entraîne une diminution de la croissance par rapport aux cellules contrôles, l'incubation avec les acLDL+PG permet de la restaurer au même niveau que celle des cellules contrôles ou traitées avec le PG (résultats non présentés).

En parallèle des variations de sécrétion des protéines des EV, on remarque que le nombre total d'EVs sécrétées par 10^6 cellules diminue après traitement par les acLDL (61×10^6) ou le PG (78×10^6) par rapport aux cellules contrôles, alors que la co-incubation acLDL + PG restaure leur sécrétion au niveau de celle des cellules contrôles, 126×10^6 et 113×10^6 , respectivement (voir Tableau 58).

De façon intéressante, le diamètre moyen des vésicules est assez similaire quel que soit le traitement (de 129 à 146 nm) et compatible avec celui des exosomes. De plus, l'analyse de la distribution de taille montre que 50% des EVs isolées par UF-UC ont un diamètre inférieur à 132 nm quel que soit le traitement (voir Tableau 58).

L'ensemble de ces résultats suggère donc que l'incubation avec du dioléate PG de macrophages RAW traités avec des LDL acétylées stimule la sécrétion des EVs (en nombre de vésicules et en protéines) sans modifier significativement leur taille, par rapport aux cellules traitées uniquement avec des acLDL ou du PG ou co-incubées avec des acLDL+ U18666A.

16.3.2.2 Variation de la composition lipidique des cellules RAW et des exosomes sécrétés lors de surcharge en cholestérol

Nous avons d'abord vérifié la surcharge en cholestérol dans les conditions utilisées puis analysé les modifications des taux de BMP dans les cellules RAW. Puis, ces taux de BMP et cholestérol dans les EV pour corrélérer ces taux exosomaux avec ceux des cellules après 48h de sécrétion. Comme précédemment, les résultats sont exprimés en unités arbitraires (AU) corrigés par le standard interne et la quantité de protéines ou le nombre de cellules de l'échantillon pour le cholestérol ; les quantités de BMP sont exprimées en pmol.

16.3.2.2.1 Effet sur le contenu en cholestérol des macrophages et EV sécrétés

Le cholestérol (libre et estérifié) a été quantifié par GC-FID. Après 24h d'incubation, le cholestérol libre intracellulaire double en moyenne avec la condition acLDL co-incubées ou non avec du PG par rapport aux cellules contrôles ou incubées avec le PG seul, tandis qu'il est augmenté d'environ 7 fois pour la condition acLDL+U18666A par rapport aux cellules contrôles. De plus comme attendu, le cholestérol estérifié est fortement augmenté d'environ 30 fois en moyenne dans les cellules traitées avec les acLDL co-incubées ou non avec du PG par rapport aux cellules contrôles ou incubées avec le PG seul, tandis qu'il n'augmente que de 10 fois pour la condition acLDL+U18666A par rapport aux cellules contrôles, en accord avec le mécanisme d'action de cette amine hydrophobe (résultats non présentés).

Après 48 h de sécrétion en milieu conditionné, le cholestérol libre intracellulaire a été analysé (figure 98). On observe la persistance de l'augmentation du cholestérol libre intracellulaire, quoique non significative, pour les conditions acLDL et acLDL+ PG par rapport aux cellules contrôles, alors que l'incubation avec le PG seul modifie peu son contenu par rapport aux cellules contrôles comme déjà observé (Delton-Vandenbroucke et al., 2007). Seules les cellules traitées avec les acLDL et l'U18666A maintiennent une quantité de cholestérol libre significativement augmentée par rapport aux cellules contrôles, mais aussi aux autres conditions, alors que la proportion de cholestérol estérifié est toujours inférieure à celle avec les acLDL seules (résultats non présentés). Ces résultats confirment donc que le cholestérol libre est bien séquestré dans les endosomes lors du traitement par l'U18666A. De

plus, la proportion de cholestérol estérifié intracellulaire est toujours augmentée pour les conditions acLDL et acLDL+ PG par rapport aux cellules contrôles ou incubées avec le PG seul, suggérant que l'estérification du cholestérol libre et donc son transport vers le réticulum endoplasmique n'est pas perturbé dans ces conditions (résultats non présentés). Comme observé pour le cholestérol libre, l'incubation avec le PG seul ne modifie pas le contenu intracellulaire en cholestérol estérifié par rapport aux cellules contrôles.

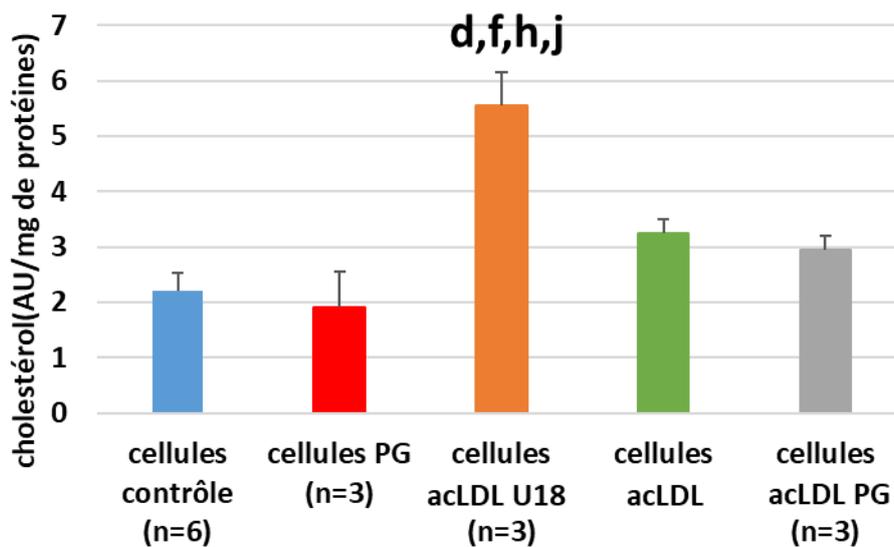


Figure 98 : quantité de cholestérol cellulaire en AU/mg de protéines, moyenne +/- sem, contrôle n=6, PG n=3, acLDL U18 n =3, acLDL n =6, acLDL PG n=3 (RAW 264.7, GC-FID)

Le cholestérol libre présent dans les exosomes après 48h de sécrétion a été analysé (figure 99 A et B). Bien que les variations observées ne soient pas statistiquement significatives entre les différentes conditions, on peut noter certaines différences qui pourraient être dépendantes du niveau de surcharge intracellulaire en cholestérol et de ses voies de transport intracellulaire.

La quantité de cholestérol libre retrouvée dans les EV (exprimée relative aux protéines exosomales) diminue pour les cellules incubées avec le PG seul par rapport aux cellules contrôles et aussi pour les conditions acLDL+ PG par rapport aux cellules incubées avec les acLDL seules. De plus, le cholestérol libre des EV diminue plus fortement pour acLDL+ U18 par rapport aux cellules incubées avec les acLDL seules et aux cellules contrôles (figure 99 A). Ceci suggère que la composition des EV en cholestérol libre ne dépend pas seulement de la

quantité de cholestérol libre dans le compartiment endo-lysosomal mais aussi des possibilités de sortie de ce compartiment dépendante du taux de BMP intra-endosomal (voir plus loin) ou du transfert vers le reticulum.

De façon à évaluer l'effet des différentes conditions sur la quantité de cholestérol que les cellules peuvent sécréter, la quantité de cholestérol libre associé aux EVs a été exprimée par million de cellules RAW 264.7 (figure 99 B). Pour les conditions PG, acLDL+ U18 et acLDL la quantité de cholestérol libre sécrété par les cellules et associé aux EV diminue par rapport aux cellules contrôles. Toutefois, la coincubation des acLDL avec le PG permet de restaurer la diminution observée avec les acLDL seules.

Tous ces résultats suggèrent que l'incubation des macrophages avec le PG stimule la sécrétion de cholestérol libre associé aux EV après co-incubation avec les acLDL sans induire d'enrichissement des EV en cholestérol libre. Ceci corrèle avec la stimulation de la sécrétion des EVs (en nombre de vésicules et en protéines) observées pour les conditions acLDL+ PG par rapport aux cellules traitées uniquement avec des acLDL ou du PG.

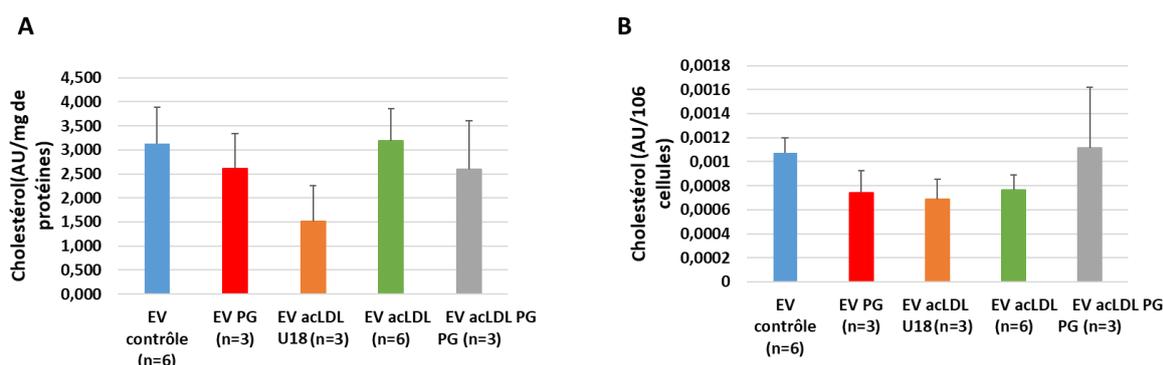


Figure 99 : A : quantité de cholestérol exosomal en AU/mg de protéines, moyenne +/- sem, contrôle n=6, PG n=3, acLDL U18 n=3, acLDL n =6, acLDL PG n=3 ; B : quantité de cholestérol en AU/million de cellules, moyenne +/- sem, contrôle n=6, PG n=3, acLDL U18 n =3, acLDL n =6, acLDL PG n=3, EV obtenu par UF-UC (RAW 264.7, GC-FID)

16.3.2.2.2 Effet sur le contenu et la composition du BMP

Les études précédentes du laboratoire (Bouvier et al., 2009) et d'autres équipes (Ilnytska, Jeziorek, et al., 2021; Ilnytska, Lai, et al., 2021) ont démontré que 24h d'incubation avec du di-oléate PG augmente sélectivement le contenu intracellulaire du BMP, en particulier l'espèce di-oléate BMP, sans modification des PC et PE. De plus aucune accumulation intracellulaire de di-oléate PG, ni de modification du cardiolipide ne sont observées (Bouvier et al., 2009).

Ainsi comme attendu après 24h de stimulation (avant la mise à sécrétion), le di-oléate BMP est augmenté 13 fois pour le groupe 30 μ M PG et 5 fois pour le groupe acLDL +PG par rapport au groupe contrôle.

La quantification du contenu total et des espèces moléculaires du BMP après 48h de sécrétion en milieu conditionné est présentée dans le tableau 59 et la figure 100. Aucune différence significative du contenu total en BMP et de toutes ses espèces moléculaires n'est observée pour les cellules du groupe PG seul par rapport au groupe contrôle. Toutefois, l'espèce majoritaire di-oléate BMP est toujours légèrement plus augmentée représentant respectivement, 48,5 % et 45,1% des espèces du BMP dans les cellules du groupe PG par rapport au groupe contrôle. Ceci suggère qu'après 48h de sécrétion, le contenu intracellulaire en BMP est revenu dans des proportions normales.

L'incubation avec les acLDL seules ou co-incubées avec le PG augmente, quoique non significativement, le contenu total en BMP par rapport aux cellules contrôles. On remarque une modification dans les proportions relatives des différentes espèces moléculaires, en particulier une augmentation des espèces saturées : en moyenne 34% et 18% dans le groupe acLDL et acLDL+PG respectivement, et la diminution des espèces polyinsaturées : en moyenne 28% et 31% dans le groupe acLDL et acLDL+PG respectivement par rapport aux cellules contrôles où elles représentent en moyenne 14% et 37%, respectivement. Bien que nous n'ayons pas analysé la composition en acides gras totaux des acLDL utilisées, ces variations seraient plutôt dues à l'apport lipidique via ces lipoprotéines comme le suggère la différence de composition en esters de cholestérol des cellules avec ou sans incubation avec les acLDL (résultats non présentés, (Delton-Vandenbroucke et al., 2007)). Toutefois, le di-oléate BMP représente

toujours l'espèce majoritaire dans le groupe acLDL+PG (en moyenne 44%) alors qu'il ne représente que 33% des espèces de BMP dans le groupe acLDL.

Enfin, l'incubation des cellules avec les acLDL+U18 augmente significativement le contenu total et les espèces moléculaires de BMP par rapport aux cellules contrôles. Mais à la différence de l'effet sélectif du di oléate PG sur l'augmentation du di oléate BMP, on remarque que l'augmentation du BMP est liée à l'augmentation des espèces saturées, particulièrement au di palmitate BMP qui représente en moyenne 37% des espèces de BMP alors qu'il ne représente que 13% de celles des cellules contrôles, tandis que le di oléate BMP ne représente plus que 24% des espèces. Ceci suggère que l'augmentation du BMP induite par l'U18666A est liée non seulement à la surcharge en cholestérol induite par l'U18666A comme déjà observé par Chevallier *et al* 2008 pour les cellules BHK, mais aussi à la perturbation du métabolisme intraendosomal du BMP (Chevallier *et al.*, 2008).

Tableau 59 : Quantification des espèces moléculaires du BMP cellulaire en nmol/mg de prot, moyenne +/- sem, contrôle n=6, PG n=3, aLDL U18 n =3, acLDL n =6, acLDL PG n=3 (un tableau se trouve en annexe pour la correspondance des acide gras) (RAW 264.7, HPLC-MS/MS)

BMP (Bis(monoacylglycero)phosphate : espèces moléculaires (nmol/mg de protéines)	Cellules contrôle (n=6)	Cellules PG (n=3)	Cellules acLDL U18666A (n=3)	Cellules acLDL (n=6)	Cellules acLDL PG (n=3)
PP BMP C16:0,C16:0	0,85 ± 0,37	0,59 ± 0,21	6,95 ± 2,10	4,89 ± 1,45	5,03 ± 4,25
PL BMP C16:0,C18:2n-6	0,01 ± 0,006	0,009 ± 0,001	0,11 ± 0,01	0,03 ± 0,009	0,05 ± 0,04
LL BMP C18:2n-6,C18:2n-6	0,009 ± 0,003	0,01 ± 0,003	0,02 ± 0,004	0,01 ± 0,004	0,01 ± 0,01
SS BMP C18:0,C18:0	0,04 ± 0,02	0,04 ± 0,02	0,55 ± 0,15	0,31 ± 0,09	0,35 ± 0,31
PO BMP C16:0,C18:1n-9	0,13 ± 0,07	0,20 ± 0,02	0,79 ± 0,03	0,33 ± 0,07	0,60 ± 0,32
OL BMP C18:1n-9,C18:2n-6	0,43 ± 0,23	0,34 ± 0,09	1,59 ± 0,06	0,71 ± 0,19	1,24 ± 0,89
OO BMP C18:1n-9,C18:1n-9	2,57 ± 1,30	3,27 ± 0,17	6,86 ± 0,40	3,92 ± 0,88	8,40 ± 5,53
SO BMP C18:0,C18:1n-9	0,09 ± 0,04	0,16 ± 0,07	0,39 ± 0,08	0,21 ± 0,04	0,35 ± 0,13
ODPA BMP C18:1n-9,C22:5n-3/6	0,15 ± 0,10	0,13 ± 0,03	0,64 ± 0,04	0,31 ± 0,09	0,47 ± 0,35
OA BMP C18:1n-9,C20:4n-6	0,07 ± 0,03	0,08 ± 0,03	0,93 ± 0,19	0,32 ± 0,09	0,58 ± 0,48
OETA BMP C18:1n-9,C20:3n-6/9	0,35 ± 0,14	0,60 ± 0,11	1,09 ± 0,11	0,46 ± 0,10	0,95 ± 0,65
OEE BMP C18:1n-9,C20:2n-6	0,43 ± 0,15	0,63 ± 0,04	0,63 ± 0,06	0,46 ± 0,10	0,79 ± 0,44
OE BMP C18:1,C20:1n-9	0,17 ± 0,08	0,24 ± 0,03	0,25 ± 0,02	0,18 ± 0,03	0,56 ± 0,38
OD BMP C18:1n-9,C22:6n-3	0,52 ± 0,30	0,45 ± 0,04	1,54 ± 0,12	1,14 ± 0,33	1,60 ± 1,06
AD BMP C20:4n-6,C22:6n-3	0,0005 ± 0,0002	0,002 ± 0,0001	0,02 ± 0,003	0,015 ± 0,008	0,01 ± 0,008
PaD BMP C16:1n-9,C22:6n-3	0,005 ± 0,002	0,009 ± 0,002	0,01 ± 0,006	0,003 ± 0,002	0,02 ± 0,009
PD BMP C16:0,C22:6n-3	0,006 ± 0,003	0,007 ± 0,001	0,06 ± 0,007	0,03 ± 0,008	0,04 ± 0,03
DD BMP C22:6n-3,C22:6n-3	0,004 ± 0,002	0,004 ± 0,001	0,02 ± 0,002	0,012 ± 0,003	0,02 ± 0,01
di DPA BMP C22:5n-3/6,C22:5n-3/6	0,000 ± 0,000	0,000 ± 0,000	0,005 ± 0,002	0,003 ± 0,001	0,005 ± 0,004
Total BMP	5,85 ± 2,80	6,79 ± 0,65	20,94 ± 2,10	13,38 ± 3,38	21,11 ± 14,91

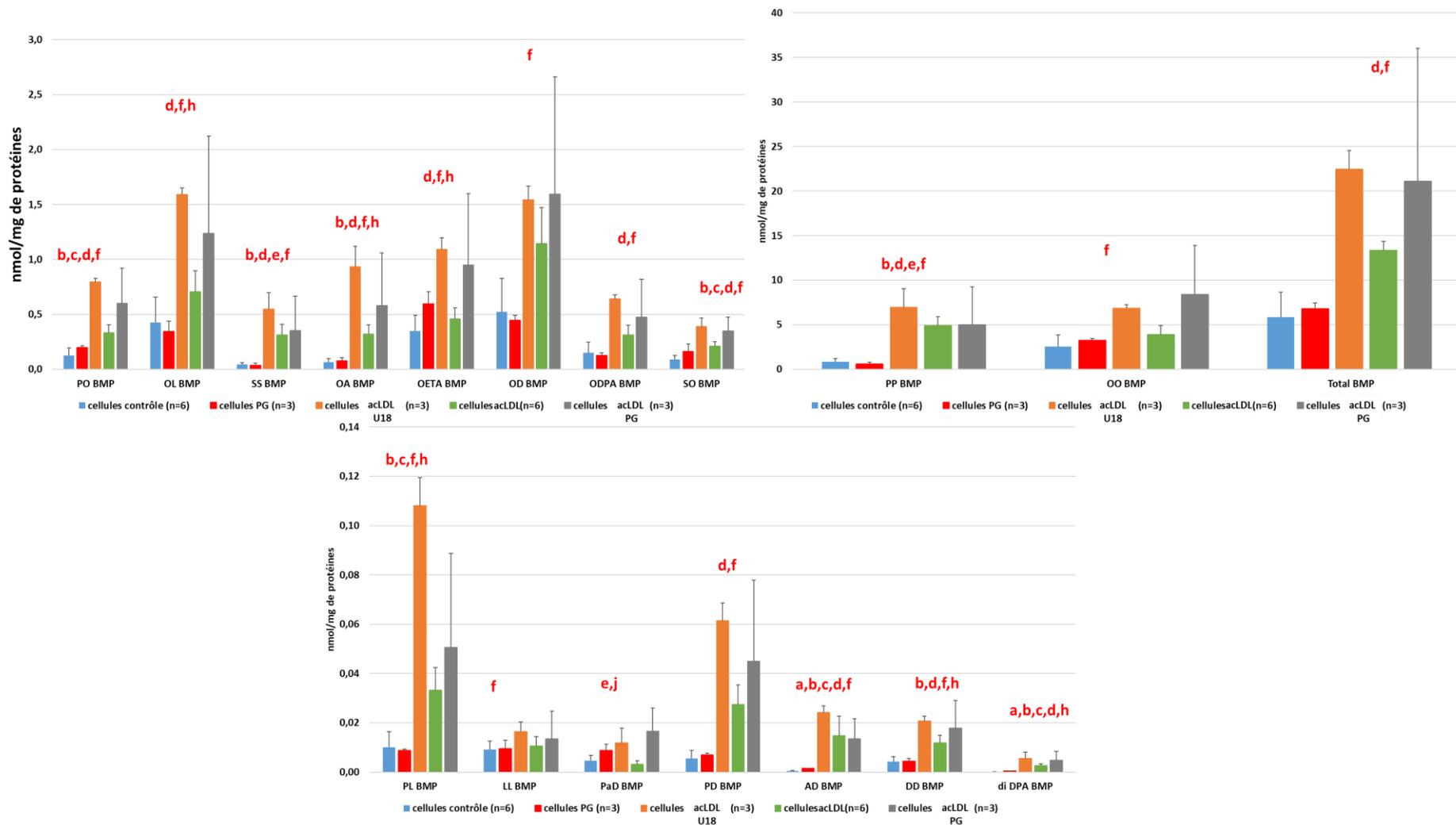


Figure 100 : Différences significatives des espèces moléculaires du BMP cellulaires analysées entre les différents traitements $p < 0.05$, moyenne \pm sem, contrôle n=6, PG n=3, acLDL U18 n=3, acLDL n=6, acLDL PG n=3 (RAW 264.7, HPLC-MS/MS)

L'analyse du BMP ne détecte à nouveau que l'espèce di-oléate BMP dans les EV sécrétées par les cellules contrôles ou après les différents traitements. La figure 101 A représente la quantité de BMP en fonction de la quantité de protéines des EV, ce qui nous permet de comparer l'enrichissement en BMP des vésicules. Les cellules traitées avec le PG et co-incubées ou non avec les acLDL sécrètent significativement plus de BMP que les cellules contrôles. De plus, l'enrichissement des vésicules en BMP est plus élevé pour les cellules incubées avec les acLDL+PG qu'avec les acLDL seules, suggérant donc le lien entre la composition et sécrétion des EV et les taux intracellulaires de BMP et de cholestérol. Les cellules incubées avec les acLDL en présence ou non d'U18666A sécrètent aussi plus de BMP associé aux EV que les cellules contrôles, bien que de façon non significative.

Pour évaluer plus précisément l'effet des différentes conditions sur la sécrétion de BMP associé aux EV, la quantité de BMP dans les EV est exprimée par million de cellules (figure 101 B). Le traitement par le PG seul ou en présence des acLDL augmente la capacité des cellules à sécréter du BMP, bien que de façon non significative, par rapport aux cellules contrôles ou aux cellules traitées avec les acLDL seules. Le traitement acLDL+ U18 augmente, dans une moindre proportion, la sécrétion du BMP associé aux EV, par rapport aux cellules contrôles ou aux cellules traitées avec les acLDL seules. Les acLDL seules ne font pas varier la quantité de BMP sécrétée par million de cellules.

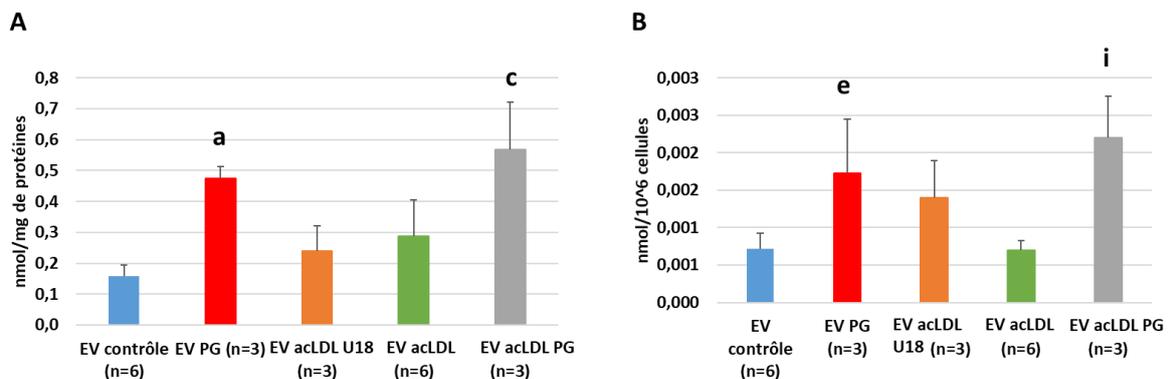


Figure 101 : A : *Quantité de di-oléate BMP exosomal en nmol/mg de protéines, moyenne +/- sem , contrôle n=6, PG n=3, acLDL U18 n =3, acLDL n =6, acLDL PG n=3; différences significatives entre les différents traitements p<0.05 ; B : quantité de BMP exosomale en nmol/million de cellules, moyenne +/- sem, contrôle n=6, PG n=3, acLDL U18 n =3, acLDL n =6, acLDL PG n=3, différences significatives entre les différents traitements p<0.05 , EV obtenu par UF-UC (RAW 264.7, HPLC-MS/MS)*

Conclusion

Le but de cette étude était d'étudier le rôle du BMP dans la sortie du cholestérol cellulaire, via les exosomes lors d'une surcharge en cholestérol des macrophages RAW264,7 induite par les LDL acétylées. Bien que certains des résultats ne donnent pas de données statistiquement significatives dans nos conditions expérimentales, des conclusions intéressantes peuvent être retenues et utiles pour de futures expériences.

La surcharge en cholestérol intracellulaire induite par l'incubation des macrophages avec les acLDL entraîne la diminution de la sécrétion du cholestérol associé aux exosomes. La co-incubation des acLDL avec le PG pour augmenter le BMP intracellulaire, permet de rétablir la sécrétion du cholestérol exosomal à des niveaux semblables aux cellules contrôles. De plus, l'enrichissement des vésicules en BMP pour les cellules incubées avec les acLDL+PG par rapport aux cellules incubées avec les acLDL seules, suggère aussi un lien entre la composition des EV et leur sécrétion. Ceci corrèle aussi avec la stimulation de la sécrétion des EVs (en nombre de vésicules et en protéines) observées après incubation des cellules avec les acLDL+PG par rapport aux cellules traitées uniquement avec des acLDL ou du PG. Tous ces résultats suggèrent donc un lien entre le taux de BMP intracellulaire et la sécrétion de cholestérol via les exosomes. De plus, cette étude confirme nos résultats préliminaires montrant que les macrophages enrichis en BMP sécrètent des EV caractérisées comme exosomes, enrichis en BMP et contenant du cholestérol (voir Chap 16.1).

Toutefois, ces résultats montrent aussi que la sécrétion du cholestérol via les exosomes dépend non seulement du taux de BMP mais aussi de la concentration de cholestérol intracellulaire. Comme déjà observé par Chevallier *et al* 2008 (Chevallier et al., 2008), les proportions relatives du cholestérol et du BMP dans le compartiment endo-lysosomal sont importantes pour réguler la capacité de stockage en cholestérol dans ce compartiment. Nous montrons ici qu'elles semblent réguler aussi la sortie du cholestérol via les exosomes. Toutefois, des analyses quantitatives des ratios BMP/cholestérol dans les cellules et les EV sont nécessaires pour améliorer la compréhension du rôle du BMP et du cholestérol dans la sécrétion des exosomes. Ces hypothèses sont regroupées dans la partie discussion.

PARTIE IV- CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Nos travaux ont permis d'apporter des informations sur les espèces moléculaires du BMP mais aussi d'autres lipides de cellules et vésicules extracellulaires sécrétées après différentes conditions de stimulation. Trois types d'échantillons biologiques ont été analysés: des urines humaines (seulement le BMP), des macrophages murins (RAW 264.7) et des fibroblastes humains. Ces analyses ont été effectuées en conditions contrôles, ou lors de surcharges endolysosomales médicamenteuses (induites par l'amiodarone ou la chloroquine), génétiques (fibroblastes NPC) et pharmacologiques (surcharge réalisée via les acLDL).

Nous apportons grâce à notre étude, des données molaires sur les quantités de BMP intracellulaire et présent dans les EV. Pour le cholestérol, les autres principaux glycérophospholipides, les Cer et les SM, nous n'apportons pas de données massiques ou molaires, cependant, nos résultats permettent d'évaluer les variations relatives de chaque lipide dans nos conditions expérimentales.

De plus, la présence du BMP dans les exosomes sécrétées par les cellules RAW264.7 et HEK 293 et d'urine a pu être démontrée par immunogold pour la première fois durant cette thèse. Le rôle du BMP comme biomarqueur de perturbation endosomale a pu être confirmé dans l'étude clinique sur des sujets traités par l'amiodarone (Rabia et al., 2020). L'amiodarone entraîne une augmentation de la sécrétion d'exosomes dans les urines de patients traités, mais aussi par les macrophages RAW 264.7. Cependant Piccoli et al ont montré que des cellules rénales (BHK et VERO) traitées avec de l'U18666A pour mimer un phénotype NPC et de l'amiodarone, ne sécrètent pas plus d'exosomes que des cellules non traitées par l'amiodarone (Piccoli et al., 2011). Les études ont été réalisées avec des types cellulaires et des traitements différents, suggérant que l'amiodarone n'a pas le même effet en fonction du type cellulaire. Nous montrons aussi qu'il est possible d'augmenter la quantité de BMP sécrété et associé aux EV par des cellules RAW en utilisant le di-oléate PG, le précurseur du BMP.

Notre étude de surcharge en cholestérol, médiée par les acLDL et couplée à une augmentation du BMP intracellulaire, n'a pas donné de résultat statistiquement significatif sur la sortie de cholestérol via les exosomes. Néanmoins, on constate une augmentation de la sortie du cholestérol via les exosomes par rapport aux cellules incubées avec les acLDL seules ainsi qu'une augmentation de la sécrétion des vésicules (en nombre de vésicules et en protéines). Une étude récente réalisée par l'équipe de Judith Storch suggère aussi le rôle du BMP dans la sortie du cholestérol via les exosomes (Ilnytska, Jeziorek, et al., 2021). En effet dans cette étude,

la sortie de cholestérol par la voie des exosomes a été stimulée en augmentant la concentration de BMP intracellulaire via le PG. Cette étude a été réalisée sur des fibroblastes mutés pour NPC1, ce qui induit une perturbation du trafic du cholestérol, le stockant dans les endosomes. Nous avons utilisé une lignée de macrophages (RAW 264.7) qui, ne sont pas déficients en NPC1. N'ayant pas de perturbation du trafic initial dans la sortie du cholestérol des endosomes, il est possible que la voie des exosomes ne soit pas suffisamment stimulée, ne permettant pas d'observer de véritables variations significatives. En effet, la sortie du cholestérol via les exosomes semble être une voie minoritaire (Ilnytska, Jeziorek, et al., 2021; Strauss et al., 2010). De plus, le temps de sécrétion des cellules est différent: moins de 24h alors que 48h pour la nôtre. Les macrophages sont connus pour sécréter beaucoup d'EV mais également pour leur importante fonction d'endocytose/phagocytose favorisant la captation des EV. Il est donc possible que 48h de sécrétion soit trop long pour observer la sécrétion des exosomes enrichis en cholestérol. De plus, lors de l'étude comparative entre les fibroblastes de sujet sains et les patients NPC, nous n'avons pas pu quantifier le cholestérol dans les EV. Cependant, nous avons constaté une augmentation de la sécrétion des exosomes pour les cellules NPC, confirmant ainsi les résultats obtenus par Strauss et al et Ilnytska et al (Ilnytska, Jeziorek, et al., 2021; Strauss et al., 2010). Au vu de ces résultats, il faut poursuivre l'étude du BMP dans la sécrétion du cholestérol via les exosomes. Il serait intéressant de réaliser des expériences sur des cellules déficientes en NPC1 et/ou NPC2, permettant ainsi de retrouver un phénotype NPC et donc d'empêcher le cholestérol de sortir des endosomes par les voies habituelles. Cependant, il semblerait que seule NPC 2 soit nécessaire pour la sécrétion de cholestérol via les EV/exosomes. En effet, des études ont montré que lors d'une déficience en NPC1 mais en présence de NPC2 fonctionnelle, l'augmentation du BMP intracellulaire via son précurseur (McCauliff et al., 2019) ou bien son apport direct (Chevallier et al., 2008) entraîne une diminution du cholestérol des endo-lysosomes. Cette diminution serait due en partie à une augmentation de la sécrétion exosomale (Ilnytska, Jeziorek, et al., 2021), mais aussi via la stimulation de l'autophagie (Ilnytska, Lai, et al., 2021). La protéine NPC 1 ne jouerait pas de rôle dans le mécanisme de sécrétion du cholestérol via les exosomes, en effet lors de l'augmentation du BMP intracellulaire via le PG dans des cellules NPC 2 déficientes, la concentration en cholestérol des endo-lysosomes n'est pas modifiée (Ilnytska, Jeziorek, et al., 2021; McCauliff et al., 2019). De plus, il serait nécessaire d'utiliser des cellules contenant de façon physiologique de fortes quantités de BMP comme les macrophages ce qui permettrait d'étudier plus facilement ce phospholipide. Actuellement les études réalisées ne portent que sur

l'augmentation du di-oléate BMP via le di-oléate PG. Il serait intéressant d'augmenter la concentration d'autres espèces moléculaires du BMP. Il est possible de l'augmenter en enrichissant le milieu de culture avec du DHA et de la vitamine E (Bouvier et al., 2009). L'insaturation jouant un rôle important dans la fusion membranaire, l'augmentation des espèces insaturées du BMP permettrait peut-être de stimuler la formation d'exosomes. Ensuite au vu des résultats, il serait important de réaliser des études sur les ratios BMP/cholestérol intracellulaire qui permettraient peut-être de faire varier la sécrétion de cholestérol exosomal. En effet, lorsque la concentration en cholestérol cellulaire est normale, l'augmentation du BMP intracellulaire entraîne une diminution de la sécrétion exosomale de cholestérol. Mais lors d'une augmentation du cholestérol et du BMP cellulaire, on observe la normalisation de la sécrétion exosomale du cholestérol. Ceci suggère donc bien un lien entre les concentrations en cholestérol et BMP cellulaire pour la sortie du cholestérol via les exosomes. Enfin, la cinétique de sécrétion des exosomes est très importante. Il faudrait donc réaliser des études de cinétique de production exosomale lors de surcharge en cholestérol dans différents modèles cellulaires, en particulier en lien avec le phénotype NPC.

Il faut poursuivre ces analyses pour utiliser le BMP comme outil thérapeutique comme suggéré par Judith Storch avec des analogues de PG (Ilnytska, Jeziorek, et al., 2021) ou des composés régulant le métabolisme du BMP (Ilnytska, Lai, et al., 2021). En effet, si le BMP permet d'augmenter la sécrétion du cholestérol via les exosomes, il permettrait peut-être de soulager les patients atteints de maladie de surcharge en cholestérol comme la NPC. Pour cela, il faudrait par exemple, réaliser des études animales sur des modèles de NPC murins (Ilnytska, Lai, et al., 2021). Il serait intéressant d'utiliser des régimes riches en PG ou en BMP afin de vérifier s'il est possible d'augmenter la quantité de BMP dans l'organisme et ainsi, faire sortir plus de cholestérol de l'organisme. Il serait également possible de moduler les espèces moléculaires du BMP via des régimes spécifiques.

Le BMP n'est pas seulement associé aux maladies de surcharge en cholestérol. Sa quantité se retrouve également augmentée dans de nombreuses maladies de surcharge lysosomale comme la maladie de Sandhoff, de Fabry, etc. (Akgoc et al., 2015; Meikle et al., 2008) (Abe & Shayman, 2009; Hullin-Matsuda et al., 2009; Linke, Wilkening, Lansmann, et al., 2001). Dans le plasma de sujets contrôles, 40% du BMP plasmatique est présent dans les lipoprotéines contre 80% pour le BMP circulant des sujets atteints de la maladie de Gaucher (Meikle et al., 2008). Il faudrait réaliser des expériences sur ces différentes maladies pour voir

si l'augmentation du BMP permet par exemple d'augmenter la sécrétion des lipides non dégradés, ou bien d'augmenter la dégradation des lipides. En effet, le BMP permet d'augmenter la dégradation de certains lipides comme les SL en stimulant par exemple la céramidase acide (Linke, Wilkening, Sadeghlar, et al., 2001) et la sphingomyélinase acide (Linke, Wilkening, Lansmann, et al., 2001). Les SM et surtout les céramides sont connus pour jouer un rôle dans la sécrétion des exosomes (Trajkovic et al., 2008; Verderio et al., 2018). Ainsi, l'inhibiteur de la nSMase2 sphingomyélinase neutre GW4869 (Blanc & Vidal, 2018) est utilisé pour bloquer la sécrétion d'exosomes. Il est donc intéressant d'étudier la modulation de la concentration et les espèces moléculaires du BMP cellulaire sur des troubles de surcharge en SL comme la maladie de Sandhoff, de Fabry, de Gaucher etc., afin de savoir, si le BMP permet le dégorgeement ou bien la dégradation de ces SL.

Lors d'une étude portant sur les perturbations de la voie endosomale et autophagique en lien avec les maladies neurodégénératives, Miranda et al ont pu mettre en évidence une augmentation de la sécrétion d'exosomes enrichis en BMP et en fragments du précurseur de la protéine amyloïde (Miranda et al., 2018; Miranda & Paolo, 2018). La protéine β amyloïde est un composant des plaques amyloïdes qui sont présentes lors de la maladie d'Alzheimer. Le BMP pourrait être utilisé comme marqueur extracellulaire de l'évolution des maladies neurodégénératives. Pour cela, il faudrait réaliser des études pour vérifier la présence du BMP dans le liquide céphalorachidien et corrélérer la concentration en BMP dans le liquide céphalorachidien et l'évolution de la maladie comme étudié récemment pour la maladie de Parkinson (Fuji et al. 2015).

Bien que cette thèse se focalise sur la sécrétion du cholestérol via les exosomes, d'autres mécanismes ont été observés, principalement sur des cellules NPC. Vacca et al ont mis en évidence une sécrétion lysosomale. Cette dernière est dépendante du calcium et induite par l'utilisation de la cyclodextrine à faible dose. La cyclodextrine faciliterait la redistribution du cholestérol intracellulaire, en particulier sa sortie du compartiment endo-lysosomal, puis sa sécrétion des cellules, expliquant son potentiel thérapeutique dans le traitement de la NPC. Ce mécanisme de sécrétion lysosomale dépendant du canal calcique MCOLN1 permettrait de faire diminuer le cholestérol et le BMP intracellulaire (Vacca et al., 2019). Dans cette étude, les cellules utilisées sont des cellules BHK et HeLa. Juhl et al ont montré une sortie du cholestérol

via les ectosomes. Cette étude est réalisée avec des fibroblastes humains mutés pour NPC2. Lors de l'incubation de ces cellules avec la protéine NPC2 recombinante et fonctionnelle, la quantité de cholestérol cellulaire est diminuée. Le cholestérol est alors sécrété sous la forme d'EV considérées comme des ectosomes par les auteurs. Dans ces ectosomes, le BMP et le cholestérol colocalisent (Juhl et al., 2021). Dans notre étude, nous n'excluons pas qu'une partie du cholestérol puisse sortir via d'autres EV que les exosomes. De plus, Juhl et al ont observé des ectosomes de taille comprise entre 500 et 1 200 nm (Juhl et al., 2021). Donc nous n'avons pas pu les analyser puisque nous avons filtré au préalable à 200nm pour isoler les exosomes. Il faudrait réaliser des études sur la sécrétion de ces vésicules en les isolant sans filtrer pour les purifier.

Le BMP peut être utilisé comme biomarqueur de perturbation endosomale (Hullin-Matsuda et al., 2009; Platt et al., 2018; K. L. Thompson et al., 2012). Notre équipe a pu montrer que le BMP urinaire était un marqueur de perturbation endosomale lors de l'utilisation de l'amiodarone (Rabia et al., 2020). Il faudrait poursuivre ces études en utilisant des traitements impliquant d'autres CAD, par exemple la chloroquine (antimalarial), l'amitriptyline (antidépresseur), la gentamicine (antibiotique/antibactérien), le ketoconazole (antifongique), le triparanol (inhibiteur de la synthèse de cholestérol/statine) (Breiden & Sandhoff, 2019). Dans un premier temps, des études pilotes (humaines) doivent être réalisées pour vérifier si le BMP peut être utilisé comme biomarqueur non invasif lors du traitement prolongé avec ces différentes CAD. Si oui, il serait intéressant de réaliser des études cliniques plus approfondies, avec des sujets à différents stades de traitement. Une corrélation entre la concentration en BMP et le degré de l'intoxication par les CAD pourrait ainsi être observée, permettant d'adapter le traitement en fonction de la gravité de l'intoxication, évitant ainsi des troubles plus sévères ou irréversibles.

Le BMP urinaire semble être le reflet du BMP de l'organisme (Rabia et al., 2020). En effet, lors de l'étude pilote, nous avons pu analyser environ 20 espèces moléculaires de BMP associé aux EV urinaires, alors qu'une seule est détectée lors de l'analyse du BMP dans les EV sécrétées par les RAW264.7. Il faut donc poursuivre l'analyse du BMP exosomal issu d'autres types cellulaires, permettant peut-être d'obtenir une signature « BMP exosomal » dépendante du type cellulaire. L'augmentation spécifique de certaines espèces moléculaires du BMP

pourrait ainsi être utilisée comme biomarqueur spécifique de souffrance d'un tissu en particulier. Enfin, nous avons montré dans cette thèse que le BMP est présent dans des EV caractérisées comme des exosomes. En effet, ils sont sécrétés dans des urines humaines (Rabia et al., 2020), par des macrophages (RAW 264.7) et par des cellules rénales (HEK 293)(Rabia et al., 2020). Il faut poursuivre l'analyse du BMP exosomal dans d'autres types cellulaires ou fluides biologiques (sang, liquide céphalorachidien) pour confirmer l'importance du BMP comme marqueur lipidique des exosomes.

Un aspect important de l'étude du BMP restant à explorer porte sur sa synthèse et sa dégradation. En effet à l'heure actuelle, la synthèse du BMP n'est pas encore élucidée (Hullin-Matsuda et al., 2009). En effet, les enzymes de sa synthèse ne sont pas toutes connues, empêchant actuellement de diminuer ou/et augmenter la concentration de BMP intracellulaire par génie génétique (diminution via KO génétique, augmentation via surexpression des enzymes). Actuellement nous pouvons augmenter le BMP cellulaire :

- soit, en utilisant son précurseur le PG (Amidon et al., 1995, 1996; Arnal-Levron et al., 2019; Bouvier et al., 2009; Ilnytska, Jeziorek, et al., 2021; Ilnytska, Lai, et al., 2021; Poorthuis & Hostetler, 1976, 1978; Somerharju & Renkonen, 1980; Thornburg et al., s. d.; Waite et al., 1987, 1990).

- soit, en réalisant un « jeûne » cellulaire, permettant d'augmenter la concentration de BMP par l'augmentation du flux autophagique (Grabner et al., 2020; Luquain et al., 2000).

Il est aussi possible de diminuer la quantité de BMP cellulaire, en diminuant l'expression de la protéine ALIX via siARN (Chevallier et al., 2008), cependant ALIX est impliquée dans plusieurs processus de trafic cellulaire pouvant donc interférer avec le métabolisme cellulaire. Il faut donc poursuivre nos efforts pour élucider cette synthèse pour nous permettre de modifier via génie génétique la concentration de BMP.

Il a déjà été montré qu'un apport en DHA couplé à la vitamine E permet d'augmenter la quantité de di-DHA BMP (Bouvier et al., 2009). Il serait intéressant de réaliser des études de régime alimentaire pour permettre de moduler les espèces moléculaires du BMP permettant ainsi d'améliorer les fonctions du BMP. En effet il semblerait que le di-DHA BMP jouerait le rôle d'antioxydant contre les oxystérols (Arnal-Levron et al., 2019). De plus, l'augmentation

de l'insaturation aide à la fluidité membranaire et donc à la fusion des membranes. Subra et al ont émis l'hypothèse que le BMP jouerait un rôle dans la sécrétion des exosomes grâce à ses propriétés fusogéniques (Subra et al., 2007). Le BMP aiderait à la fusion entre les MVB et la membrane plasmique ce qui permettrait la sécrétion des exosomes. Pour jouer son rôle fusogénique, le BMP doit être en conformation *sn-2 :sn-2'* (Carrière et al., 2020; Matsuo et al., 2004). Cette isomérisation n'est présente que dans des conditions acides (chapitre 15.4), c'est-à-dire que le BMP doit être présent au niveau du feuillet interne de la membrane des MVB, pour aider à cette fusion. Les doubles liaisons des acides gras entraînent des cassures dans leurs chaînes aliphatiques, augmentant leur encombrement stérique et donc la fluidité membranaire. Il serait intéressant donc d'augmenter les espèces moléculaires du BMP riche en acide gras polyinsaturés comme le di-DHA BMP. L'équipe a déjà montré qu'il est possible d'enrichir spécifiquement le BMP en DHA en incubant des macrophages avec du DHA sous différentes formes (Besson et al., 2006; Bouvier et al., 2009) ou lors de régimes riches en DHA chez la souris (Bouvier et al., 2009). Il serait intéressant d'utiliser ces protocoles pour modifier la composition du BMP intracellulaire, et d'étudier la sécrétion exosomale. Si le BMP participe bien à la sécrétion des exosomes, on pourra observer une corrélation entre la modification des espèces moléculaires du BMP et la modification de la sécrétion exosomale. Des études sur le BMP et la sécrétion exosomale sont encore nécessaires pour mieux appréhender les mécanismes mis en jeu.

Concernant la dégradation du BMP, peu de choses sont encore très claires. Le squelette de glycérol du BMP a une très longue vie, mais les acides gras ont un fort *turn over* (Huterer & Wherrett, 1986). Des enzymes ayant la capacité de dégrader *in vitro* le BMP ont été décrites (Breiden & Sandhoff, 2021; Cochran et al., 1987; Grabner et al., 2020; Ito et al., 2002; Luquain et al., 2000; Matsuzawa & Hostetler, 1980; Pribasnik et al., 2015; Record et al., 2011). Néanmoins, certaines sont uniquement cytoplasmiques comme l'ABHD6 (Grabner et al., 2020; Pribasnik et al., 2015) ou la PLRP2 (Record et al., 2011), ou bien la lipase de *R. arrhizus* issue d'un champignon, utilisée lors d'expériences *in vitro* (Luquain et al., 2000). Or le BMP ne se retrouvant que dans le compartiment endosomal, il n'y a théoriquement pas d'interaction possible entre le BMP et ces enzymes. Néanmoins, lors de la *back fusion* endosomale, le BMP se retrouve au niveau du feuillet cytoplasmique des endosomes (Falguières et al., 2009; Gruenberg, 2020; Luyet et al., 2008). Le BMP participe à la *back fusion* en collaboration avec

des partenaires protéiques comme ALIX ou les ESCRT (Gruenberg, 2020). Cette localisation au niveau du feuillet externe des endo-lysosomes après la *back fusion*, permettrait aux enzymes cytoplasmiques d'avoir accès au BMP et donc de le dégrader. La *back fusion* médiée par le BMP est-elle due à la nécessité de dégorgner les endosomes, ou bien est-elle nécessaire pour la dégradation du BMP ? Des études complémentaires sur le catabolisme du BMP doivent être réalisées pour mieux appréhender les mécanismes mis en jeu.

Lors de l'analyse du BMP en RP-HPLC, 3 isomères sont caractérisés: *sn-3:sn-3'*, *sn-2:sn-2'*, *sn-2:sn-3'/sn-3:sn-2'* (qui co-éluent sur la colonne). En condition acide (condition native du BMP), il se trouve majoritairement en position *sn-2:sn-2'*. En condition de pH neutre, il se trouve majoritairement en position *sn-3:sn-3'*. La position *sn-2:sn-2'* se retrouve majoritairement au niveau intracellulaire, la position *sn-3:sn-3'* se trouve majoritairement dans les exosomes présents dans des milieux de culture qui ont un pH neutre. Les positions, *sn-2:sn-3'*, *sn-3:sn-2'* se trouvent être des positions intermédiaires du BMP qui interviennent lors d'un changement de pH. Elles sont retrouvées majoritairement dans des EV de milieu faiblement acide comme les urines. Cette différence d'isomérisation permettrait de définir la localisation du BMP dans les feuillettes des membranes. En effet dans les endosomes, le BMP est en position *sn-2:sn-2'*, il se retrouve donc dans un milieu acide. Dans les endosomes, deux types de pH existent : un pH acide présent dans le lumen des endosomes et un pH neutre présent dans le lumen des ILV des endosomes. En effet, les ILV sont issues de l'invagination de la membrane des endosomes vers leurs lumens. Les ILV ainsi formées contiennent dans leurs lumens des éléments cytoplasmiques, induisant un pH neutre du moins peu de temps après leur formation (Falguieres et al., 2009). Le lumen des endo-lysosomes a un pH acide dû à l'action de la V-ATPase. Cette pompe à proton entraîne la diminution du pH de 6,9 (endosome précoce) jusqu'à 4,6 (lysosomes) (Scott et al., 2014; Scott & Gruenberg, 2011). Donc le BMP se retrouve dans les endosomes au niveau du feuillet externe des ILV, et au niveau du feuillet interne des endosomes. Dans le cas de la *back fusion*, il se trouve au niveau du feuillet externe des endosomes (Gruenberg, 2020). Au niveau des EV, différents isomères de BMP sont retrouvés en fonction du pH : par exemple, dans les urines qui ont un pH faiblement acide, il sera sous forme *sn-2:sn-2'*, *sn-2:sn-3'*, *sn-3:sn-2'*. Dans les EV sécrétées par les cellules RAW dans un milieu de culture de pH neutre, le BMP est sous forme *sn-3:sn-3'*. Ces résultats suggèrent que le BMP se trouve au niveau du feuillet externe des EV et donc des exosomes. Cette conclusion

permet de renforcer l'hypothèse que les exosomes sont issus des endosomes et sont donc les ILV endosomales. Néanmoins il faut réaliser des études cinétiques et physico-chimiques sur la localisation membranaire du BMP, la sécrétion des exosomes, et l'isomérisation du BMP pour permettre d'affirmer cette hypothèse. Les travaux récents utilisant la pHluorin vont permettre d'obtenir des informations plus précises sur les variations du pH intraluminal des ILV et des EV *in vivo* (Bebelman et al., 2020; Verweij et al., 2018)

Lors de l'analyse du BMP en RP-HPLC, 3 isomères sont caractérisés: *sn-3:sn-3'*, *sn-2:sn-2'*, *sn-2:sn-3'/sn-3:sn-2'* (qui co-éluent sur la colonne). En condition acide (condition native du BMP), il se trouve majoritairement en position *sn-2:sn-2'*. En condition de pH neutre, il se trouve majoritairement en position *sn-3:sn-3'*. La position *sn-2:sn-2'* se retrouve majoritairement au niveau intracellulaire, la position *sn-3:sn-3'* se trouve majoritairement dans les exosomes présents dans des milieux de culture qui ont un pH neutre. Les positions, *sn-2:sn-3'*, *sn-3:sn-2'* se trouvent être des positions intermédiaires du BMP qui interviennent lors d'un changement de pH. Elles sont retrouvées majoritairement dans des EV de milieu faiblement acide comme les urines. Cette différence d'isomérisation permettrait de définir la localisation du BMP dans les feuillettes des membranes. En effet dans les endosomes, le BMP est en position *sn-2:sn-2'*, il se retrouve donc dans un milieu acide. Dans les endosomes, deux types de pH existent : un pH acide présent dans le lumen des endosomes et un pH neutre présent dans le lumen des ILV des endosomes. En effet, les ILV sont issues de l'invagination de la membrane des endosomes vers leurs lumens. Les ILV ainsi formées contiennent dans leurs lumens des éléments cytoplasmiques, induisant un pH neutre du moins peu de temps après leur formation (Falguieres et al., 2009). Le lumen des endo-lysosomes a un pH acide dû à l'action de la V-ATPase. Cette pompe à proton entraîne la diminution du pH de 6,9 (endosome précoce) jusqu'à 4,6 (lysosomes) (Bebelman et al., 2020; Verweij et al., 2018)

Enfin pour conclure ces travaux, terminons par le rôle du BMP dans les infections virales. De nombreux virus détournent la voie endosomale pour infecter leur hôte. Les virus comme Ebola, VSV et d'autres utilisent le BMP pour sortir de la voie endosomale, éviter leur dégradation et ainsi infecter leur hôte (Carpio & Villalaín, 2020; Carrière et al., 2020; Luquain-Costaz et al., 2020; Luyet et al., 2008; Stadler et al., 2008; Zaitseva et al., 2010). Au vu du contexte actuel, de la multiplication des infections virales (EBOLA, SARS-CoV, MARBUG)

et du peu de traitements actuellement efficaces, il est important d'étudier les différents mécanismes permettant de réduire les infections virales. En effet, les virus vont détourner le BMP lors de la *back fusion*, permettant ainsi au virus de sortir des endo-lysosomes et donc de poursuivre l'infection. De plus, le BMP participe aux flux lipidiques des endo-lysosomes et plus particulièrement au trafic du cholestérol. Il permet de réguler la quantité de cholestérol dans les endo-lysosomes, et donc la fluidité membranaire. En effet, des domaines riches en cholestérol permettent de limiter la fluidité membranaire et donc de diminuer la sortie des virus des endosomes. Il est donc important de réaliser des études sur le BMP lors d'infections virales pour obtenir plus d'informations et peut être utiliser le BMP comme cible/outil thérapeutique. Pour poursuivre cette partie sur le BMP et les virus, je propose la revue publiée par l'équipe en 2020 qui se trouve en annexe et qui s'intitule : *Bis (monoacylglycero) phosphate, an important actor in the host endocytic machinery hijacked by SARS-CoV-2 and related viruses* (Luquain-Costaz et al., 2020).

ANNEXES

Annexes 1: Article 1: *Bis(monoacylglycero)phosphate, a new lipid signature of endosome-derived extracellular vesicles*

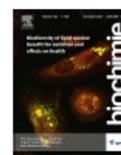
Biochimie 178 (2020) 26–38



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi



Bis(monoacylglycero)phosphate, a new lipid signature of endosome-derived extracellular vesicles



Maxence Rabia^a, Valentin Leuzy^a, Christophe Soulage^a, Annie Durand^a, Baptiste Fourmaux^{a,b}, Elisabeth Errazuriz-Cerda^c, René Köffel^d, Annette Draeger^{d,†}, Pascal Colosetti^a, Audrey Jalabert^a, Mathilde Di Filippo^{a,c}, Audrey Villard-Garon^f, Cyrille Bergerot^g, Céline Luquain-Costaz^a, Philippe Moulin^{a,f}, Sophie Rome^a, Isabelle Delton^a, Françoise Hullin-Matsuda^{a,*}

^a Univ-Lyon, CarMeN Laboratory, Inserm U1060, INRAe U1397, INSA Lyon, Villeurbanne, France

^b Functional Lipidomics Platform, CarMeN Laboratory / IMBL-INSa Lyon, 69621, Villeurbanne Cedex, France

^c Univ-Lyon, CIQLE (Centre D'Imagerie Quantitative Lyon Est) Rockefeller, Lyon, France

^d Department of Cell Biology, Institute of Anatomy, University of Bern, Bern, Switzerland

^e Department of Biochemistry and Molecular Biology, Centre de Biologie et de Pathologie Est, Hospices Civils de Lyon, Bron, France

^f Department of Endocrinology, Hôpital Cardiovasculaire Louis Pradel, Hospices Civils de Lyon, Lyon, Bron, France

^g Department of Cardiology, Hôpital Cardiovasculaire Louis Pradel, Hospices Civils de Lyon, Lyon, Bron, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 April 2020

Received in revised form

29 June 2020

Accepted 8 July 2020

Available online 10 July 2020

Keywords:

Bis(monoacylglycero)phosphate

Docosahexaenoic acid

Exosomes

Extracellular vesicles

Lysobisphosphatidic acid

Lysosomal storage diseases

ABSTRACT

Bis(monoacylglycero)phosphate (BMP), also known as lysobisphosphatidic acid (LBPA), is a phospholipid specifically enriched in the late endosome-lysosome compartment playing a crucial role for the fate of endocytosed components. Due to its presence in extracellular fluids during diseases associated with endolysosomal dysfunction, it is considered as a possible biomarker of disorders such as genetic lysosomal storage diseases and cationic amphiphilic drug-induced phospholipidosis. However, there is no true validation of this biomarker in human studies, nor a clear identification of the carrier of this endolysosome-specific lipid in biofluids. The present study demonstrates that in absence of any sign of renal failure, BMP, especially all docosahexaenoyl containing species, are significantly increased in the urine of patients treated with the antiarrhythmic drug amiodarone. Such urinary BMP increase could reflect a generalized drug-induced perturbation of the endolysosome compartment as observed *in vitro* with amiodarone-treated human macrophages. Noteworthy, BMP was associated with extracellular vesicles (EVs) isolated from human urines and extracellular medium of human embryonic kidney HEK293 cells and co-localizing with classical EV protein markers CD63 and ALIX. In the context of drug-induced endolysosomal dysfunction, increased BMP-rich EV release could be useful to remove excess of undigested material. This first human pilot study not only reveals BMP as a urinary biomarker of amiodarone-induced endolysosomal dysfunction, but also highlights its utility to prove the endosomal origin of EVs, also named as exosomes. This peculiar lipid already known as a canonical late endosome-lysosome marker, may be thus considered as a new lipid marker of urinary exosomes.

© 2020 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

Abbreviations: BMP, bis(monoacylglycero)phosphate; diC22:6-BMP, di-docosahexaenoyl BMP; CAD, cationic amphiphilic drug; ESCRT, endosomal sorting complexes required for transport; ILV, intraluminal vesicle; LBPA, lysobisphosphatidic acid; LSD, lysosomal storage disorder/disease; NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease; NASH, nonalcoholic steatohepatitis; MVE, multivesicular endosome.

* Corresponding author. Inserm UMR 1060, CarMeN Laboratory, IMBL building, 69621 Villeurbanne cedex, France.

E-mail address: francoise.hullin-matsuda@inserm.fr (F. Hullin-Matsuda).

† This manuscript is dedicated to Professor Annette Draeger who sadly passed away on October, 2nd, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.07.005>

0300-9084/© 2020 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

1. Introduction

Bis(monoacylglycero)phosphate (BMP) is an intriguing poly-glycerophospholipid due to its exclusive subcellular organelle localization, its unusual lipid structure and the still unresolved enzymatic steps of its *de novo* biosynthesis pathway [1–7]. It is also known as lysobisphosphatidic acid (LBPA), a misleading terminology for its structure of two monoacylglycerols linked through one

phosphate group [2,3]. BMP is found in most mammalian cells and tissues [2]. It is specifically enriched in the late endosome/lysosome, also referred to as endolysosome, where it participates actively in the trafficking of lipids and proteins passing through this acidic compartment. BMP appears progressively during the maturation of the endosome visualized by a multivesicular appearance due to inward budding of the organelle limiting membrane towards its lumen leading to the formation of intraluminal vesicles (ILVs). Whereas it represents only 1% of the total phospholipids in most mammalian tissues, BMP amounts to 15% of the phospholipids of the late endosome and constituting up to 70% of their internal membrane phospholipids, including ILVs [8]. BMP is a structural isomer of phosphatidylglycerol (PG) and displays an unusual *sn*-1-glycerophospho-*sn*-1'-glycerol configuration [9]. This unique stereoconfiguration renders BMP more stable in the acidic organelle environment and resistant to phospholipase potentially explaining its extended lifetime [10]. Several studies from our laboratory and others have demonstrated the role of BMP in the dynamics of the endolysosome membrane including its hijacking during pathogen infection, in cholesterol transport and in sphingolipid degradation [1,2,4,11–14]. Interestingly, BMP and other anionic phospholipids are necessary for RNA virus infection and replication as well as bacterial toxin release as highlighted by the inhibitory effect of anti-BMP antibodies or drug-induced modification of the acidic endosomal pH [4,15,16].

Noteworthy, the negative charge of BMP and its unsaturated fatty acid enrichment actively drive ILV formation in endosomes [4,7,17,18]. ILVs are important for the fate of the endocytosed proteins and lipids not only by mediating their transport to the lysosome for degradation, but also by being released as extracellular vesicles (EVs) after fusion of the multivesicular endosomes (MVEs) with the plasma membrane. The name EV refers to a heterogeneous group of membrane vesicles of variable sizes either originated from the endosome compartment often referred to as “exosomes” (about 50–120 nm in diameter) or from shedding of the plasma membrane often referred to as “microvesicles” (about 50 nm to 1 µm and even bigger in diameter) [19]. The precise role of BMP to control exosome biogenesis and secretion is still unclear [4,20]. In addition, contradictory results were published about the presence of BMP in EVs with its absence [21], its low content [22] and its enrichment in case of endolysosomal dysfunction [23]. Such discrepancy could be linked to the lack of sensitivity of the detection method used as well as the variability of exosome secretion according to the cell type. EVs are found in various biological fluids and involved in different pathophysiological processes linked to the release of their protein, lipid and nucleic acid content that can be used for intercellular communication [19,24–26].

BMP increase in cells and tissues was reported in various disorders such as cationic amphiphilic drugs (CAD)-induced phospholipidosis and genetic lysosomal storage diseases (LSDs) associated with endolysosomal dysfunction characterized by accumulation of undigested material and secondary metabolites [27–31]. The CAD toxicity, a major concern in drug development, is linked to this build-up of drug and undigested compounds inside the acidic endolysosomal compartment visualized by the formation of vacuoles and concentric multi-lamellar inclusions [32,33]. BMP and particularly the docosahexaenoic acid (C22:6n-3) containing species such as diC22:6-BMP, was detected also in extracellular fluids (plasma, urines...) during these disorders and thus, considered as a possible biomarker to follow disease progression [34,35]. However, most of these studies were performed with animal models [36,37] and are still requiring validation in humans as well as identification of the BMP carrier in extracellular fluids. We hypothesized that BMP in biological fluids could be associated with EVs and a valuable biomarker of CAD-induced endolysosomal dysfunction in humans.

With this aim, we performed a first pilot human study with urines of patients treated with amiodarone (Cordarone®), the most frequently used antiarrhythmic drug and a reference compound among the CADs. Amiodarone has a long elimination half-life, highly variable among patients (35–110 days). It may require months to reach steady state blood levels (about 0.7–3.7 µM). However, plasma levels do not correlate well with efficacy or adverse effects. The onset of action occurs within several hours after intravenous administration (primarily given for emergency treatment of serious arrhythmias) and requires 2–3 days after oral administration to outpatients. Because it is a lipophilic drug, it accumulates extensively in the liver, lung, fat, skin and other tissues (thyroid) [38–40]. Significant side effects due to tissue accumulation are observed even with low doses of amiodarone (200–300 mg/day) during long-term oral therapy and are not seen with short-term intravenous therapy (800–1600 mg/day). It was estimated that the prevalence of side effects can be as high as 15% in the first year and as high as 50% with long-term therapy that can go up to several years. Appropriate follow-up for liver injury or dysthyroidism (usually every 6 months) is essential during long-term treatment to evaluate the risk-benefit ratio. Fortunately, most of amiodarone's side effects are reversible with dose reduction or discontinuation of therapy. Thus, the build-up of phospholipidosis seems a gradual event and the extent and time course of drug trapping inside the late endosome/lysosome compartment appears to vary among patients.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Unless otherwise indicated, most reagents are from VWR Chemicals. Solvents used for lipid analysis are HPLC grade or RPE. Ammonium formate, amiodarone hydrochloride (A842) are from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Lipid standards are from Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, USA). The mouse monoclonal antibodies, anti-CD63 (Cluster of Differentiation CD63 or Lamp3; sc-5275), anti-CD81 (CD81 or TAPA-1; sc-166 028), anti-ALIX (apoptosis linked gene 2 ALG2-interacting protein X; sc-53540), anti-TSG101 (tumor susceptibility gene 101; sc-7964) are from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany). Mouse monoclonal antibody anti-BMP (clone 6C4) is a gift from Dr T. Kobayashi (Univ Strasbourg, France and RIKEN, Japan). Cell culture reagents are from Gibco (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France). Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) was purchased from BioLegend (London, UK) and phorbol ester PMA from Sigma.

2.2. Human subject study

Twenty-four ambulatory outpatients receiving oral treatment of amiodarone (=amiodarone group; average oral dose: 200 mg/day) were recruited from the outpatient clinic of Endocrinology and Cardiology of “Hospices Civils de Lyon” (HCL). Among them, six amiodarone-treated patients displayed amiodarone-induced dysthyroidism. As it is known that amiodarone can induce liver steatosis [41], we recruited six outpatients from Endocrinology not treated with amiodarone but suffering from nonalcoholic steatohepatitis (=NASH group) to evaluate the specific effect of hepatic dysfunction on urinary BMP concentration for comparison. Twelve healthy volunteers (=Control group) were recruited that matched in age with amiodarone and NASH patients (see Table 1 for detailed characteristics of subjects). The study was conducted in agreement with the bioethics law Jorde based on the Biobank INSERM UMR 1060 CARMEN_ministerial agreement N°DC-2010-117 and in accordance to the declaration of Helsinki principles. Written informed consent was obtained from all control subjects and

Table 1
Characteristics of the human subjects.

	Control subjects	Amiodarone patients	NASH patients
number (n)	12	24	6
age (years)	61 ± 2	71 ± 2	61 ± 7
women/men (n)	6/6	10/14	3/3
Amiodarone: average treatment length (months); oral daily dose (mg)	no	5, 12; 200 mg	no
Cardiomyopathy (n)	no	15	no
dysthyroidism (n)	no	6	no
hypothyroidism (n)	–	4	–
hyperthyroidism (n)	–	2	–
Biological parameters			
urinary creatinine (mmol/L)	9.2 ± 1.9	7.4 ± 0.8	9.3 ± 1.9
BMI (kg/m ²)	nd	27 ± 1 ^a	39 ± 3
plasma AST (U/L)	nd	40 ± 13 ^c	36 ± 7
plasma ALT (U/L)	nd	50 ± 23 ^d	43 ± 11
plasma HbA1c (%)	nd	6.9 ± 0.3 ^d	7.6 ± 0.4
plasma HDL cholesterol (g/L)	nd	0.45 ± 0.04 ^c	0.34 ± 0.05
plasma LDL cholesterol (g/L)	nd	0.97 ± 0.09 ^b	1.0 ± 0.2

Values are mean ± sem for n = 12, control subjects; n = 6, NASH patients; n = 24, amiodarone-treated patients except ^a, n = 22; ^b, n = 20; ^c, n = 19 and ^d, n = 17. nd, not determined. AST aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; BMI, body mass index; HbA1c, glycated hemoglobin.

patients.

Second morning urines were collected and frozen immediately at –80 °C until analysis. The total urine volume was measured and then, an aliquot was centrifuged 10 min at room temperature (800×g, Jouan Centrifuge CR 4–12, swinging rotor 11175338). The supernatant devoid of cells and mineral sediments was processed for lipid extraction. In preliminary experiments, we showed that there was no significant difference in the BMP content from whole urines and urine supernatants, indicating that most of urinary BMP is recovered in the soluble and not cellular fraction.

2.3. Animal study

Three month-old male Wistar rats were purchased from Janvier SA (Le Genest-Saint-Isle, France) and housed in an air-conditioned room with a controlled environment of 21 ± 0.5 °C and 60–70% humidity, under a 12 h light/dark cycle with free access to food and water. All experimental procedures were performed in accordance with the guidelines laid down by the French Ministry of Agriculture (n°2013–118) and the European Union Council Directive for the protection of animals used for scientific purposes of September 22nd, 2010 (2010/63UE). All animal experiments were performed under the authorization DDPP-DSV n°69-266-0501 (INSA-Lyon, November 2017). They were divided into 3 groups of 3 rats each. Amiodarone (Supplemental Fig. S1A) was suspended in an aqueous solution of 5% (w/v) glucose, 0.1% (v/v) Tween 80 and administered daily for 8 days by oral gavage of a single dose of 50 mg/kg/day (A50 group, n = 3) and 150 mg/kg/day (A150 group, n = 3) as previously used [27,42]. The control group (n = 3) only received the aqueous solution of 5% (w/v) glucose solution with 0.1% (v/v) Tween 80. After the last gavage, rats were kept for 24 h in metabolic cages (Charles River, L'Abresle, France) with no food but free access to water. The 24 h-urines were collected in sodium azide-containing vials and the total volume recorded. At the end of the study, rats were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (180 mg/kg ip), blood was drawn by direct intracardiac puncture and collected on ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) tubes. Plasma was collected after centrifugation at room temperature (1600×g, 10 min), aliquoted and stored at –80 °C until analysis. Aliquots of the 24 h-urines were centrifuged 10 min at room temperature (800×g, Jouan Centrifuge CR 4–12, swinging rotor 11175338) then urine supernatants were stored at –80 °C until analysis. Livers were weighted, washed in ice-cold phosphate buffered saline (PBS) and

cut in small pieces. Liver pieces were snap frozen in liquid nitrogen, then crushed and stored at –80 °C until analysis. The clearance of creatinine and BMP expressed in ml/min was calculated according to the formula: $([\text{Urine concentration } \mu\text{mol/ml or pmol/ml}] \times \text{Urine flow}) / [\text{Plasma concentration } \mu\text{mol/ml or pmol/ml}]$ with urine flow (ml/min) evaluated after collection of the 24 h-urines.

2.4. Cell culture

HEK293 human embryonic kidney cells (ATCC CRL-1573) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin in a 5% CO₂-humidified incubator at 37 °C. THP-1 human monocytic cells (ATCC TIB-202) were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, 100U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin in a 5% CO₂-humidified incubator at 37 °C. They were differentiated into macrophages by exposure to 50 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) for 72 h [43,44].

Human buffy coats from healthy volunteers were purchased with the ethics committee approval of the Red Cross Switzerland (project P_103 to René Köffel). Primary human monocytes from buffy coats were isolated as previously described [45] and differentiated to macrophages in RPMI supplemented with 10% FBS and 1% penicillin–streptomycin with M-CSF (75 ng/ml) for 7 days.

2.5. Lipid extraction and mass spectrometry analysis

Lipid extraction was performed according to the Bligh and Dyer method [46] in acidic conditions as previously described [6,8]. Briefly samples (urines 1.6 ml; urinary EVs 10 µl; plasma 1 ml; liver powder 500 mg) containing 2 mM EDTA were extracted by a mixture of chloroform/methanol (1:2 v:v) containing butylated hydroxytoluene (BHT, 25 µM final) and internal standard diC14:0-BMP (urines, 120 pmol; plasma, 240 pmol; liver, 600 pmol; EVs, 30 pmol). The samples were partitioned by addition of chloroform and a solution of 25 mM HCl, 154 mM NaCl. The lower chloroformic phase was collected, then dried under nitrogen flux. This phospholipid extract was reconstituted by methanol for analysis.

The identification of the molecular species of BMP such as the diC22:6-BMP (Supplemental Fig. S1B) by mass spectrometry was done according to Ref. [9,28] with modifications. The analysis was performed by reverse-phase liquid chromatography–tandem mass spectrometry (RPHPLC-MS/MS) using hybrid triple quadrupole

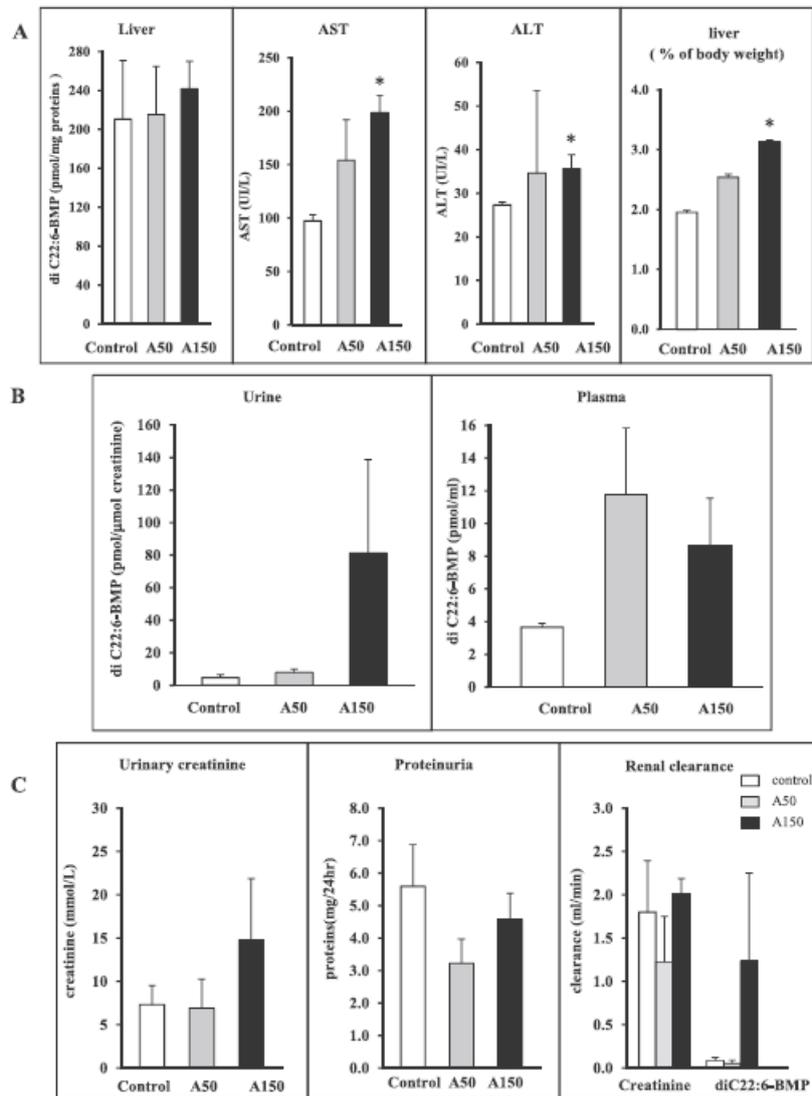


Fig. 1. Amiodarone increases diC22:6-BMP in rat urine and modifies its renal clearance. Male Wistar rats were treated or not with amiodarone (A50 and A150, 50 and 150 mg/kg/day, respectively) and lipid extracts of liver, urine and plasma were analyzed by LC-MS/MS. **A) the effect of amiodarone on liver** was evaluated by diC22:6-BMP liver content (expressed in pmol/mg proteins); levels of hepatic transaminases AST, ALT in plasma (expressed in U/L) and liver weight (expressed in percentage of body weight); **B) diC22:6-BMP content** was analyzed in urine and plasma and is expressed in pmol corrected to μmol of creatinine for urine and in pmol/ml of plasma; **C) the effect of amiodarone on kidney** was evaluated by the content of creatinine and proteins in the 24hr-urine. The renal clearance of creatinine and diC22:6-BMP was calculated as described in Material and Methods and is expressed in ml/min. All values are mean \pm sem of $n = 3$ for control (white bars) and amiodarone-treated (A50, grey bars; A150, black bars) rats. * $p < 0.05$ of unpaired Student's t -test compared to control.

linear ion trap mass spectrometer SCIex 4500 QTRAP LC MS/MS equipped with an HPLC system Shimadzu LC-30AD Nexera and a SIL-30AC. Samples (10 μ l) were injected on an Acquity UPLC[®] BEH C18 column (Waters) equipped with a Vanguard[™] precolumn Acquity UPLC[®] BEH C18. The temperature of the column was maintained at 60 °C. Gradient chromatography to separate BMP from PG was performed with a mixture of solvent B (methanol:acetonitrile:formic acid 70:30:0.1, v/v/v, containing 5 mM ammonium formate) and

aqueous solvent A (water:formic acid 100:0.1, v/v, containing 5 mM ammonium formate) at a flow rate of 500 μ l/min with acquisition during 45 min. Data were acquired in multiple reaction monitoring (MRM) with positive mode electrospray ionization (ESI). The parameters used for mass spectrometry of BMP are: DP depolarization potential: 101V; CE collision energy: 41 V; Output potential of the CXP collision cell: 10 V; Source temperature: 350 °C. Ammonium adducts of di C14:0-BMP and di C14:0-PG have similar precursor ion

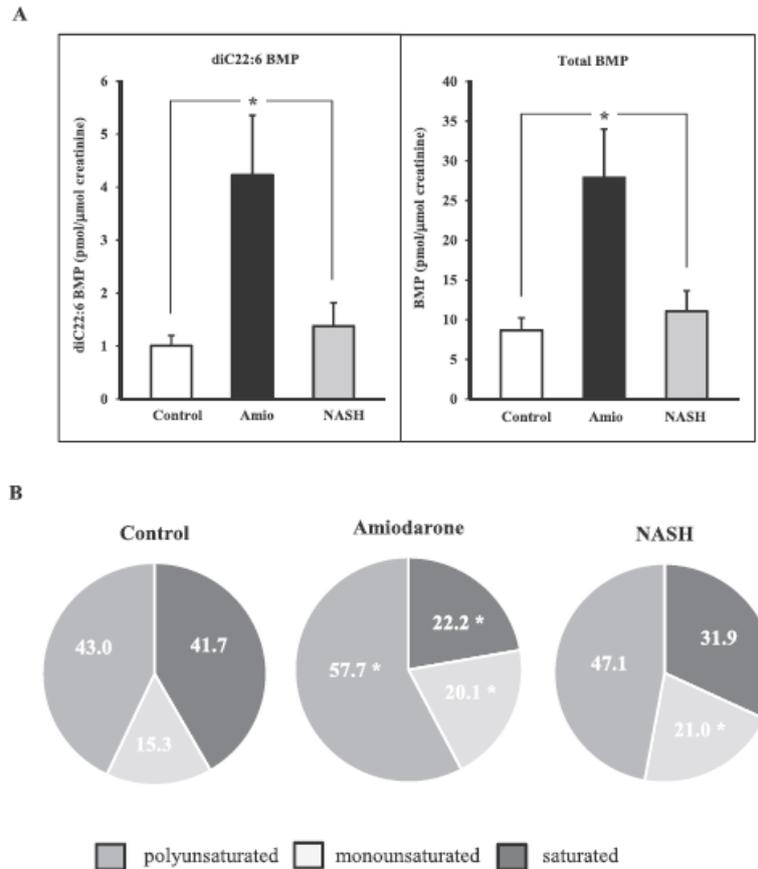


Fig. 2. Amiodarone increases BMP content in human urine. Lipid extracts of urine from control subjects, amiodarone-treated patients and NASH patients were analyzed by LC-MS/MS. diC22:6-BMP species (A) and total BMP (B) content is expressed in pmol corrected to μmol of creatinine and is mean \pm sem of $n = 12$, control subjects (white bars); $n = 24$, amiodarone-treated patients (black bars) and $n = 6$, NASH patients (without amiodarone treatment; grey bars). * $p < 0.05$ of unpaired Student's *t*-test compared to control subjects and to NASH patients. C) Schematic representation of unsaturation degree of BMP molecular species with significant increase of polyunsaturated species after amiodarone treatment content. Saturated species correspond to species with fatty acid without double bond, monounsaturated species to species with fatty acid containing one double bond and polyunsaturated to species with fatty acid containing 2 or more double bonds. Values are expressed as mole% and are mean of the data presented in Table 2. * $p < 0.05$ of unpaired Student's *t*-test compared to control subjects.

$[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ at mass to charge ratio m/z 684.3 and produced respectively, a monoacylglycerol MAG fragment (m/z 285.3) and a diacylglycerol DAG fragment (m/z 495.6) (Supplemental Fig. S1C). In the extracted ion LC chromatograms, the triple peaks observed for BMP are regioisomers with different acylation positions on the glycerol moieties (successively: *sn*-2,2'; *sn*-2,3' or *sn*-3,2'; *sn*-3,3') whereas PG shows a single peak that exhibits a longer retention time than BMP [9,28]. Integration of ion peak area was carried out by Analyst 1.6 software. Lipid concentration was calculated by relating the peak area of each species to the area of the internal standard. Our HPLC-MS/MS analysis allowed us to identify and quantify 20 different molecular species of BMP. The limit of detection per molecular species was about 0.3 or 1.0 pmol/ml for urines and plasma, respectively. BMP content in urines was adjusted to creatinine concentration for sample comparison. Furthermore, the absence of gender difference for urinary BMP secretion allowed us to pool the data from men and women inside each group. Absence of gender-

specificity of diC22:6-BMP levels in plasma and urine of healthy subjects has already been reported [37].

2.6. Isolation of extracellular vesicles

Isolation of EVs from urines was done as described by Gheini et al. [47]. Urine was processed by successive centrifugations as detailed in the summary chart (Supplemental Fig. S2A, plain lines). The final EV pellet (P5) was recovered in PBS and stored at -80°C until Western blot, lipid analysis and transmission electron microscopy analysis. In a second set of experiments (Supplemental Fig. S2A, dotted lines), the $10\,000 \times g$ -pellet (P3) was resuspended in 200 mg/ml dithiothreitol (DTT) 10 min at 37°C to denature the urinary uromodulin or Tamm-Horsfall protein that can lower the final EV yield [48]. The resuspended pellet was processed by successive centrifugations as described (Supplemental Fig. S2A, dotted lines). The final EV pellet (P5_DTT) was stored at -80°C until

Table 2
Variation of BMP molecular species in urine of control, amiodarone-treated and NASH patients.

BMP molecular species (pmol/μmol creatinine)	Control (n = 12)	Amiodarone (n = 24)	NASH (n = 6)
C16:0,C16:0	3.40 ± 0.49	3.89 ± 0.68	3.24 ± 0.62
C18:1n-9,C20:1n-9	0.06 ± 0.01	0.24 ± 0.06 *	0.14 ± 0.04 *
C16:0,C18:1n-9	0.08 ± 0.01	0.34 ± 0.09 *	0.14 ± 0.05
C18:1n-9,C18:1n-9	0.99 ± 0.19	4.49 ± 1.18 *	1.57 ± 0.51
C18:0,C18:1n-9	0.27 ± 0.05	0.90 ± 0.21 *	0.49 ± 0.07 *
C16:0,C18:2n-6	0.02 ± 0.004	0.13 ± 0.04 *	0.04 ± 0.01
C18:2n-6,C18:2n-6	0.08 ± 0.02	0.66 ± 0.22 *	0.10 ± 0.03
C18:1n-9,C18:2n-6	0.54 ± 0.11	3.17 ± 0.95 *	0.75 ± 0.28
C18:0,C18:2n-6	0.05 ± 0.01	0.20 ± 0.06 *	0.06 ± 0.01
C18:2n-6,C22:6n-3	0.36 ± 0.06	1.90 ± 0.48 *	0.44 ± 0.12
C18:1n-9,C22:6n-3	1.05 ± 0.16	4.66 ± 1.13 *	1.66 ± 0.50
C18:0,C22:6n-3	0.10 ± 0.02	0.31 ± 0.07 *	0.17 ± 0.04
C16:0,C20:4n-6	0.03 ± 0.01	0.14 ± 0.03 *	0.05 ± 0.01
C20:4n-6,C22:6n-3	0.07 ± 0.01	0.43 ± 0.10 *	0.09 ± 0.02
C22:6n-3,C22:6n-3	1.01 ± 0.14	4.23 ± 1.13 *	1.38 ± 0.44
C16:0,C22:6n-3	0.38 ± 0.07	1.28 ± 0.34 *	0.50 ± 0.15
C18:1n-9,C20:4n-6	0.06 ± 0.01	0.36 ± 0.10 *	0.07 ± 0.02
C16:0,C22:5n-3/6	0.01 ± 0.004	0.05 ± 0.01 *	0.03 ± 0.01
C18:1n-9,C20:3n-6/9	0.06 ± 0.02	0.35 ± 0.10 *	0.09 ± 0.03
C18:1n-9,C20:2n-6	0.03 ± 0.01	0.15 ± 0.04 *	0.05 ± 0.02
BMP TOTAL	8.64 ± 1.12	27.88 ± 6.13 *	11.05 ± 2.60
saturated (species mole%)	41.7 ± 4.1	22.2 ± 3.0	31.9 ± 5.0
monounsaturated (species mole%)	15.3 ± 1.1	20.1 ± 1.4 *	21.0 ± 1.9 *
polyunsaturated (species mole%)	43.0 ± 3.4	57.1 ± 3.1 *	47.1 ± 3.8

Data analyzed by LC-MS/MS are expressed in pmol/μmol creatinine and are mean ± sem. * indicates significant difference with the control subjects by Student's *t*-test *p* < 0.05.

Western blot and lipid analysis.

Isolation of EVs from conditioned medium of human HEK293 cells was performed as described in Forterre et al. [49]. HEK293 cells were plated in 150 cm² flask (10⁶ cells), grown to about 70% confluence in complete medium (DMEM + 10% FBS). Then, cells were incubated for 48 h in DMEM +10% EV-depleted FBS. EV-depleted medium was prepared by ultracentrifugation of DMEM +20% FBS at 100 000×g for 18 h at 4 °C. The resulting EV-depleted supernatant was filtered at 0.2 μm and diluted to 10% with sterile DMEM. HEK293-conditioned medium was centrifuged for EV isolation at 4 °C as described above for urinary EV isolation (Supplemental Fig. S2A, plain lines). The EV pellet recovered in PBS was stored at –80 °C until analysis.

2.7. Immunofluorescence

Primary human monocytes or human THP-1 cells were plated on glass coverslips in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS and differentiated into macrophages as indicated above. They were not treated (=control cells) or treated with 10 μM amiodarone for 24 h. At the end of the treatment, Lyso Tracker DND99 Red (Invitrogen Molecular Probes, ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) (67 nM) was added in the medium for 30 min to label the acidic organelles. Then, cells were fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde for 15 min at room temperature and blocked in 1% (w/v) bovine serum albumin BSA-PBS for 30 min. They were incubated with primary antibody: anti-BMP (6C4) 1/10 in 0.1% (w/v) saponin, 1% (w/v) BSA-PBS for 2 h, then with secondary antibody labeled with Alexa488 (Jackson ImmunoResearch Labs, ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) in 1% (w/v) BSA-PBS for 1 h at room temperature. They were mounted in Prolong Gold antifade medium (Invitrogen Molecular Probes P36935) and analyzed with a Zeiss LSM 880 confocal scanning microscope (objective Plan-Apochromat 63x/1.4 oil DICM27).

2.8. Transmission electron microscopy (TEM)

Purified EVs from human urines or from conditioned medium of

human HEK293 cells were imaged by TEM after immunogold staining as previously described [49,50]. Briefly, purified EVs (5 μl) were absorbed on 200 mesh nickel grids coated with formvar-C for 2 min at RT. Immunogold labeling performed by flotation of grids on drops of reaction media. Non-specific labeling was blocked with 1% (w/v) BSA and 1% (v/v) normal goat serum in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 for 10 min at RT. Primary antibody incubation was performed for 1 h at RT in a wet chamber with mouse monoclonal antibodies against BMP or CD63 diluted 1/10 or 1/50, respectively in 1% BSA, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4. Grids were successively washed at RT with 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, and then pH 8.2. Then, they were incubated in a wet chamber in 1% BSA, 50 mM Tris-HCl, pH 8.2 for 10 min at RT and labeled for 45min in a wet chamber with goat anti-mouse IgG gold-conjugated (10 nm) (Tebu-Bio, Le Perray-en-Yvelines, France) diluted 1/50 in 1% (w/v) BSA, 50 mM Tris-HCl, pH 8.2. Grids were successively washed at RT with 50 mM Tris-HCl pH 8.2, and pH 7.4.

For immune-double labeling after blocking nonspecific labeling as above, grids with EV suspensions were first incubated with primary antibody against EV protein marker CD63 (diluted 1/50), then with secondary goat anti-mouse IgG antibody labeled with 5 nm gold particles (1/50) as described above. After blocking nonspecific labeling as above, grids were incubated with mouse primary antibody against BMP (diluted 1/10), then with 15 nm gold-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (1/50).

The immunocomplex was fixed with 2% (w/v) glutaraldehyde for 2min. Then grids with EV suspensions were colored with 2% (w/v) phosphotungstic acid for 2 min and observed with TEM (Jeol 1400 JEM, Tokyo, Japan) equipped with a Gatan camera (Orius 600) and Digital Micrograph Software. Gold particle was assigned to a vesicle when lying within a distance of 20–40 nm from its limiting membrane.

2.9. Western Blot analysis

Western Blot analysis was performed as previously described [14,49]. Proteins were electrophoresed on 11% SDS-PAGE gels and transferred on PVDF membranes. Unspecific binding was blocked

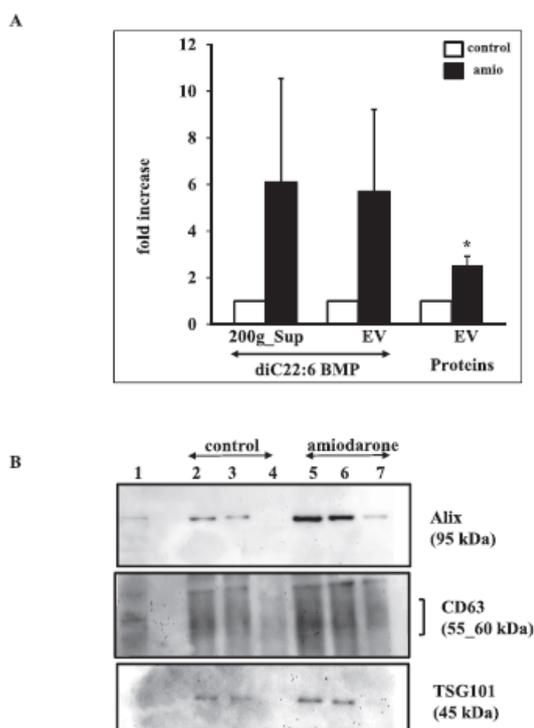


Fig. 3. Amiodarone increases the secretion of BMP-containing extracellular vesicles into human urine. Extracellular vesicles (EVs) were purified from 50 ml urines of control subjects ($n = 3$) and amiodarone-treated patients ($n = 3$) as described in Material and Methods and recovered by 100 μ l PBS. **A**) The total protein content (quantified by Bradford assay) of EVs and diC22:6-BMP content (analyzed by LC-MS/MS) in the 200 \times g-urine supernatant and urinary EVs from amiodarone-treated patients (black bars) are expressed in fold increase of the control subjects (white bars) (mean \pm sem, $n = 3$). * $p < 0.05$ of unpaired Student's t -test compared to control subjects. **B**) Equal volume of each purified EV corresponding to 2–5 μ g of EV proteins was analyzed by Western blot with antibodies against classical EV protein markers ALIX, CD63 and TSG101: EVs from three control subjects (lane 2 to 4) and three amiodarone-treated patients (lane 5 to 7). Human embryonic kidney HEK293 cell extract (lane 1) corresponding to 24 μ g proteins was used as positive standard.

with 5% (w/v) fat-free powdered milk in Tris-buffered saline containing 0.03% (v/v) Tween 20 (TBST). Then, primary antibody was incubated overnight at 4 $^{\circ}$ C in blocking buffer (4% (w/v) BSA in TBST). Mouse monoclonal antibodies against ALIX, CD81, CD63 and TSG101 were used at 1:5000, 1:2000, 1:500 and 1:2000 dilution, respectively. They were detected with peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Labs), revealed with ECL system (Immobilon Forte, MerckMillipore, Molsheim, France) and observed with an Image Master VDS-CL bio-imaging system (GE Healthcare Life Sciences_Amersham Biosciences, Little Chalfont, England).

2.10. Biological and biochemical analyses

Creatinine was quantified in urine supernatants and plasma using the Multigent Creatinine kit (Enzymatic_B81242, Abbott) on Architect[®] Analyzer (Abbott, Wiesbaden, Germany). Plasma alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase

(AST) were analyzed by routine methods on Architect[®] Analyzer (Wiesbaden, Germany). Two different assays were used for protein quantification with bovine serum albumin as standard: Bradford Reagent (ref B6916) from Sigma-Aldrich (MERCK/Germany) for urine samples and urinary EVs; and Pierce[™] BCA Protein assay kit (ref 23 225) from Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA) for cell samples.

2.11. Statistical analysis

Unpaired two-tailed Student's t -test was used to determine significant differences between patients versus controls. Significant change was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Increase of diC22:6-BMP in the urine of amiodarone-treated rats without any change in renal function

We first explored the link between urinary BMP and the renal function using rats treated with amiodarone as previously reported [51] and quantified selectively the diC22:6-BMP species in liver, urine and plasma. After 8 day-treatment with amiodarone, diC22:6-BMP a major BMP molecular species of rat liver [52] was barely increased in the liver of both amiodarone-treated groups compared to the control group (Fig. 1A). However, amiodarone treatment induced a dose-dependent increase of the hepatic transaminases AST and ALT in the plasma as well as of the liver weight compared to the control group (Fig. 1A) suggesting that oral administration of amiodarone induced a toxic dose-dependent hepatitis. DiC22:6-BMP content displayed a two-fold and seventeen-fold increase, respectively in the urine of rats treated with 50 and 150 mg/kg of amiodarone compared to the control group (Fig. 1B). In addition, plasma diC22:6-BMP levels showed a two to three-fold increase in both amiodarone-treated groups compared to the control group (Fig. 1C) suggesting a systemic effect of amiodarone associated with phospholipidosis as previously reported [51].

We then evaluated the renal function after amiodarone treatment. The urinary creatinine concentration as well as the proteinuria were not significantly changed in both amiodarone-treated groups compared to the control group (Fig. 1C). In addition, the creatinine clearance was not modified by amiodarone treatment (Fig. 1C), indicating that the renal function was maintained. Interestingly whereas the diC22:6-BMP clearance was barely detectable in the control group and the lower dose of amiodarone group, its clearance increased in the higher dose of amiodarone group reaching levels close to the creatinine clearance (Fig. 1C). These results suggest that high dose or accumulation of amiodarone is favoring the secretion of diC22:6-BMP into urine without apparent modification of the renal function.

3.2. Specific increase of all the docosahexaenoyl BMP species in the urine of amiodarone-treated patients

We then analyzed the BMP molecular species variations in urine of human patients treated with amiodarone. All the selected subjects had urinary creatinine concentrations in the normal range without statistically significant difference to the control subjects (Table 1, Supplemental Fig. S3A) indicating a normal renal function. A significant four fold-increase of the diC22:6-BMP species as well as the total BMP content was found in urine of amiodarone-treated patients compared to the control subjects (Fig. 2A). Interestingly, detailed analysis of the BMP molecular species showed that all the docosahexaenoyl species of BMP increased significantly in the urine of amiodarone-treated patients compared to the controls

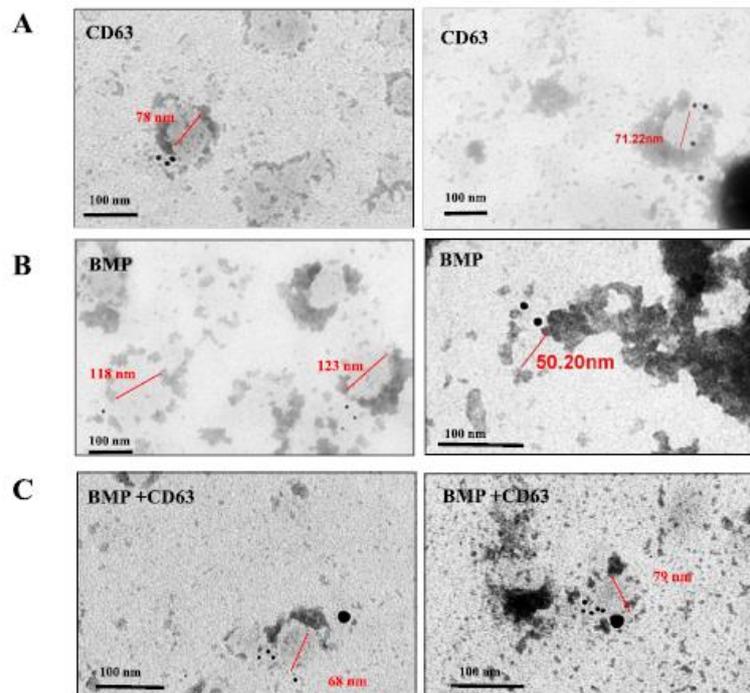


Fig. 4. BMP co-localizes with exosome protein marker CD63 in EVs isolated from human urine: EVs purified from urine of control subject were analyzed by immunogold electron microscopy with primary antibodies against the exosome protein marker CD63 (A, both panels) or the endolysosomal lipid BMP (B, both panels), then with 10 nm gold-conjugated secondary antibodies. Immuno-double labeling (C, both panels) was performed with CD63 (5 nm-conjugated secondary antibody) and BMP (15 nm gold-conjugated secondary antibody). Scale bar, 100 nm (red values indicate the vesicle diameter in nm).

(Table 2). The docosahexaenoyl species represented about 33% of the BMP molecular species of the controls and increased to 42% in the amiodarone-treated patients. Besides this enrichment in unsaturated species, diC16:0-BMP species was also present. Significant amounts of diC16:0-BMP were previously reported in human plasma [28]. Interestingly, diC16:0-BMP species represented approximately 41% of the BMP molecular species of the control subjects and decreased to 22% in the amiodarone-treated patients. The schematic representation of the overall amiodarone-induced increase of BMP polyunsaturation is displayed in Fig. 2B.

This observation led us to seek for a possible link with a tissue origin of the amiodarone-induced dysfunction focusing on the well-reported side effects of the drug on thyroid [40] as well as on liver [41]. We first compared the urinary BMP content of patients displaying or not an amiodarone-induced dysthyroidism (see Table 1, $n = 6$ and $n = 18$, respectively). diC22:6-BMP species as well as total BMP content were significantly increased in amiodarone-treated patients regardless of their dysthyroidism compared to control subjects (Supplemental Fig. S3B). These results suggest that the urinary increase of BMP was not selective for the amiodarone-induced thyroid dysfunction. To evaluate the role of hepatic dysfunction, we quantified BMP content in urine of NASH patients not treated with amiodarone (see Table 1, $n = 6$). Both diC22:6-BMP and the total BMP amounts displayed only a mild insignificant increase in urine of NASH patients compared to control subjects whereas they were significantly different between amiodarone-treated patients and NASH patients (Fig. 2A). Furthermore, detailed

analysis of the BMP molecular species showed a significant increase of BMP monounsaturated species in NASH patients compared to control subjects whereas change in the BMP docosahexaenoyl species was insignificant (Table 2 and Fig. 2A). These results indicate that modification of hepatic function linked to a liver metabolic disorder does not significantly increase diC22:6-BMP as well as total BMP content in the urine. All these results suggest that amiodarone treatment specifically increases diC22:6-BMP as well as all the docosahexaenoyl species of BMP in human urine, results in good agreement with previously reported results in rat including those from our present rat study (Fig. 1).

3.3. Urinary extracellular vesicles contained the late endosome lipid marker BMP

In order to characterize the carrier of BMP in urine, we purified urinary EVs and analyzed their BMP content. In preliminary experiments, we successfully isolated EVs from urine after successive centrifugations coupled with 0.2 μm filtration and use of the reducing agent DTT (see Supplemental Fig. S2A for purification procedure). The last ultracentrifugation pellet (P5) contains vesicles characterized by Western blot analysis with antibodies against classical EV protein markers CD63, CD81 and ALIX (Supplemental Fig. S2B) and by Zetasizer Nano analysis displaying an expected size around 77 nm (data not shown). We also confirmed that DTT treatment used to increase the EV yield did not modify BMP detection by LC-MS/MS analysis (data not shown).

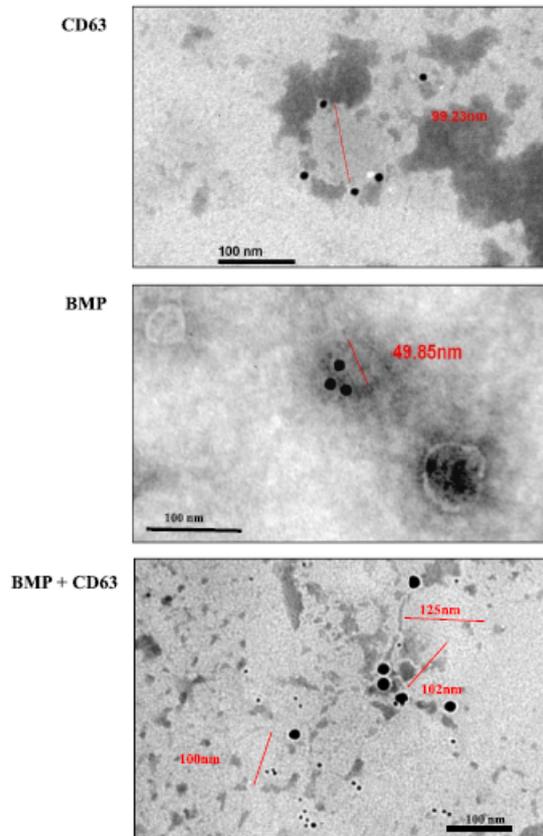


Fig. 5. BMP co-localizes with exosome protein marker CD63 in EVs isolated from conditioned medium of HEK293 cells: EVs purified from the conditioned medium of human embryonic kidney HEK293 cells were labeled with primary antibodies against the exosome protein marker CD63 (upper panel) or with BMP (middle panel), then with 10 nm gold-conjugated secondary antibodies. Co-labeling (lower panel) was performed with CD63 (5 nm-conjugated secondary antibody) and BMP (15 nm gold-conjugated secondary antibody). Scale bar, 100 nm (red values indicate the vesicle diameter in nm).

We then purified EVs from the urine (50 ml) of 3 control subjects and 3 amiodarone-treated patients previously analyzed for their BMP content (Fig. 2 and Table 2). Interestingly, amiodarone treatment induced a significant 2-fold increase of total EV proteins released into the urine compared to control subjects (Fig. 3A). Western blot analysis using antibodies against CD63, ALIX and TSG101 detected these classical EV markers in the urinary EVs in both types of samples and confirmed the increased release of EVs after amiodarone treatment (Fig. 3B). Noteworthy, LC-MS/MS analysis of the EV lipid extracts showed that diC22:6-BMP was present in EVs with a 6-fold increase in amiodarone-treated patients compared to control subjects. Similar fold increase of diC22:6-BMP was observed in the 200 x g-urine supernatants (Fig. 3A). Despite the small number of samples and the quite large variations between them for statistically significant difference, we observed a diDHA-BMP enrichment of EVs in amiodarone-treated patients that displays an average of 2.7 pmol/ μ g proteins compared to 0.35 pmol/ μ g proteins in EVs of control subjects.

To confirm the presence of BMP in urinary EVs, we performed immuno-electron microscopy analysis. Fig. 4 shows that urinary EVs were nanovesicles at the expected size between 50 and 120 nm and contained the EV protein marker CD63 (Fig. 4A) as well as the late endosome lipid marker BMP (Fig. 4B). Furthermore, these vesicles were co-labeled by BMP and CD63 (Fig. 4C). Then, we used human embryonic kidney 293 cells (HEK293) known to release EVs in cultured medium as a model of renal cells [24,53]. Interestingly, immuno-electron microscopy analysis performed on vesicles purified from the conditioned medium of HEK293 cells showed nanovesicles at the expected size for EVs and labeled with the EV protein marker CD63 and BMP (Fig. 5). Furthermore, co-labeling for BMP and CD63 was seen in the same vesicles as observed previously with EVs from human urine. Similar results were observed with EVs isolated from the conditioned medium of HEK293 treated for 24hr with 10 μ M Amiodarone (data not shown). Therefore, our results confirm that a substantial amount of BMP is associated with EVs isolated from human urine as well as culture medium of human embryonic kidney cells. Our co-labelling results as well as the concomitant increase of Alix and CD63 with BMP suggest an endosomal origin of these EVs.

3.4. Amiodarone modifies the endolysosomal compartment of human macrophages

To investigate a possible link between the amiodarone effect on EV secretion and the endosomal compartment, we studied the drug effect in human macrophages. This type of cells are known to be enriched in BMP [7], to secrete EVs [54] and to be sensitive to cationic drugs such as amiodarone [15,36]. Primary human monocytes and cultured human monocytic THP-1 cells were differentiated into macrophages and treated with 10 μ M amiodarone for 24 h. In Fig. 6A, fluorescent confocal microscopy analysis showed that primary human macrophages treated with amiodarone (lower panels) displayed an enlargement of BMP-positive and LysoTracker-positive structures, as compared to control cells (upper panels). A similar size increase of BMP-positive and LysoTracker-positive organelles was observed after incubation of human THP-1 macrophages with amiodarone (Fig. 6B, lower panels). Interestingly, amiodarone induced not only the enlargement of the acidic organelles but also a change in their intracellular distribution from a more juxtannuclear to a peripheral distribution. These results suggest that amiodarone interferes with the acidic endosomal compartment and might thus impact EV formation.

4. Discussion

Here we demonstrated that the endolysosomal phospholipid BMP is increased in the urine of amiodarone-treated patients and is associated with endosome-derived EVs characterized as exosomes. To our knowledge, this is the first human study that evaluated the occurrence of BMP in the urine of amiodarone-treated patients and analyzed its different molecular species. Our LC-MS/MS method allowed us to identify 20 different molecular species of BMP. Interestingly, all the docosahexaenoyl-containing species and particularly the diC22:6-BMP were increased in the urine of amiodarone-treated patients as observed also in urine and plasma of amiodarone-treated rats. This di-polyunsaturated species exhibits two advantages for quick and reliable detection, due to its early elution time on C18 column before the bulk of the other lipid species and its specific MAG fragment species. This is an important criterion for considering diC22:6-BMP as a convenient biomarker of drug-induced endolysosomal storage disorder.

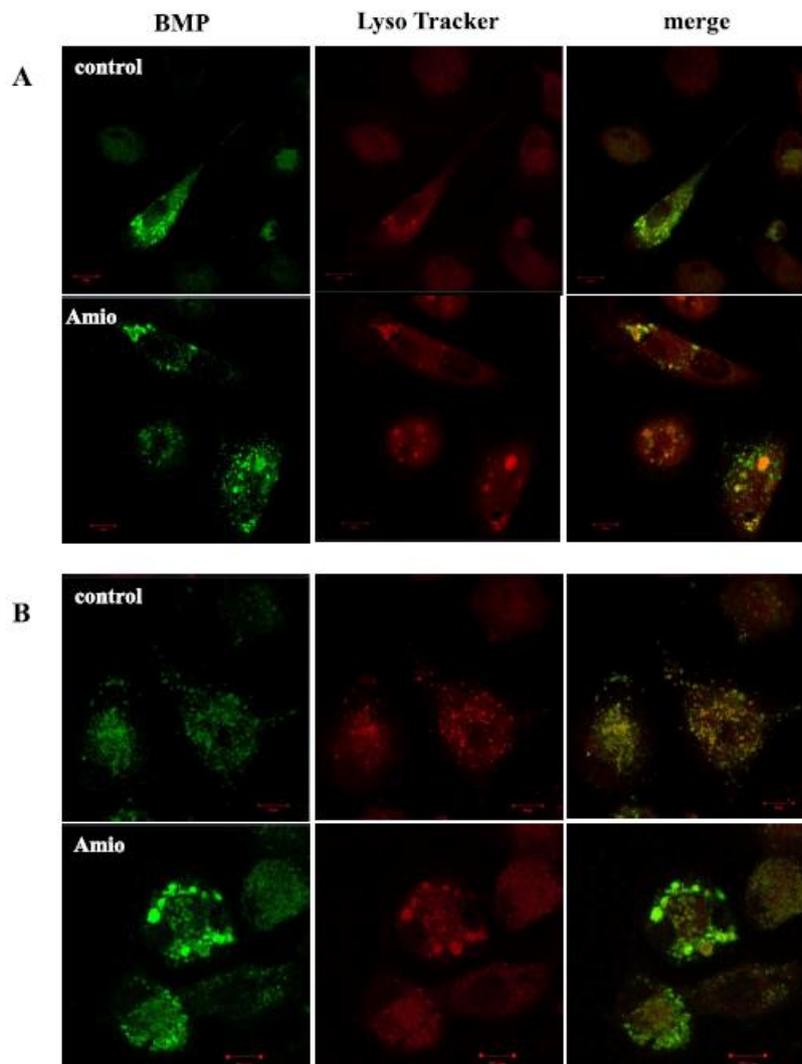


Fig. 6. Amiodarone modifies the acidic endolysosomal compartment of human macrophages. Primary human monocytes (A) and human THP-1 cells (B) differentiated into macrophages were non-treated (–control) or treated with 10 μ M of amiodarone (–Amio) for 24hr. At the end of the treatment, they were incubated with LysoTracker DND99 (red) to label the acidic organelles. After fixation, they were successively incubated with the primary antibody against the late endosomal lipid, BMP and A488-conjugated secondary antibody (green). Slides were analyzed by fluorescent confocal microscopy. Bar = 10 μ m.

4.1. BMP, an urinary biomarker of amiodarone-induced endolysosomal dysfunction in humans without renal dysfunction

Amiodarone is one of the reference compound among the CADs inducing phospholipidosis characterized by drug and lipid accumulation in the endolysosome leading progressively to liver, kidney or lung failure [41,51,55]. Previous studies in rodents identified BMP and especially the diC22:6 BMP species as a potential biomarker of phospholipidosis induced by various CADs such as amiodarone, chloroquine or azithromycin [27,36,37,51]. In rat, urinary diC22:6-

BMP was considered as a better predictor of CAD-induced phospholipidosis compared to other phospholipid species that are increased in urine in case of nephrotoxicity [33]. On the other side, serum levels of diC22:6-BMP in rats displayed a higher correlation with a generalized phospholipidosis, especially in case of amiodarone-induced liver necrosis [27]. In mice, amiodarone treatment increased the total BMP content in liver without significant change of diC22:6-BMP, whereas this species as well as total BMP were increased in plasma [56]. In agreement with those studies, we also found that diC22:6-BMP increased in both plasma

and urine, but not in liver of amiodarone-treated rats. Nonalcoholic fatty liver is considered as a risk factor for drug-induced hepatotoxicity [57]. However, our results with NASH patients suggest that modification of hepatic function linked to metabolic syndrome did not significantly increase diC22:6-BMP nor total BMP content in the human urine. This is consistent with recent results reporting unchanged BMP concentration in the serum of NASH patients [56]. Overall, urinary diC22:6-BMP appears useful to monitor the onset and the progression of amiodarone-induced phospholipidosis in rats before any nephrotoxicity or liver necrosis. From our present human pilot study, this may be extrapolated to humans as the increase of diC22:6-BMP in the urine of amiodarone-treated patients was observed in absence of renal dysfunction while this increase was not detected in the urine of NASH patients with hepatic dysfunction and without amiodarone treatment.

Since we did not have access to the blood of the amiodarone-treated patients, we can only speculate on the possible link between the amiodarone-induced increase of BMP in the circulation and in the urine. Presence of BMP in high density lipoproteins (HDLs) was recently demonstrated in mice plasma [56]. In human plasma, BMP was detected partly (40% of plasma BMP in control subjects) or primarily (80% in certain LSDs such as Gaucher disease) associated with lipoproteins (HDLs and very low density lipoproteins VLDLs) [28]. This suggests that BMP found in the circulation may be released by macrophages and liver cells. As a lipophilic cationic drug, amiodarone is sequestered after multiple cycles of macroautophagy in the acidic organelles, especially in macrophages possessing numerous endolysosomes [32,58,59]. Our *in vitro* observations that amiodarone modifies the endolysosomal compartment of human primary macrophages suggest that the BMP increase in urine of amiodarone-treated patients could reflect the drug-induced perturbation of this compartment involved in EV biogenesis. Whatever the BMP carrier in the blood (lipoproteins, albumin or perhaps EVs), we know that filterability of molecules through the glomerular capillary wall is mainly based on their size and their electrical charges [60]. We can thus assume that in basal conditions, circulating BMP should not be filtered through the glomerular filtration barrier thus explaining the lower BMP renal clearance compared to that of creatinine, observed in our control rats. After amiodarone treatment and before any kidney damage, BMP increase in the circulation would favor its renal secretion explaining the increased BMP renal clearance noticed in our rat study.

4.2. Amiodarone-induced increase of BMP-containing EVs in human urine

Our human study shows for the first time that amiodarone treatment increased the urinary release of EVs identified by the canonical EV protein markers CD63, ALIX and TSG101 [61,62]. Noteworthy, part of BMP was associated with EVs in the urine. Urinary EVs have recently gained increasing interest using them as disease biomarkers, mainly in the context of kidney diseases [47,63–66]. They seemed released by all the epithelial cells lining the urinary tract [64,67]. Although presence of diC22:6-BMP in urines was already reported in rodents [27,36,37,51], the carrier of BMP has never been identified. EVs are reported in various biological fluids but they represent a heterogeneous group of membrane vesicles of variable sizes (nano to micrometer of diameter) and origins (from endosome or plasma membrane origin) [19]. However, this nomenclature was recently questioned since their biogenesis may differ according to cell type and common intracellular mechanisms and sorting machineries are shared for the formation of the different EV subpopulations [68]. Classically, the term “exosomes” refers to extracellular ILVs released after MVE

fusion with the plasma membrane. Whereas intensive research was performed to identify the various EV protein markers, less work was done on their specific lipid analysis [69,70]. Based on the specific endolysosomal localization of BMP and its absence in plasma membrane, we can speculate that BMP could be used as a new exosome lipid marker discriminating their endosomal origin. This will require further analysis in EVs isolated from various extracellular biofluids. The role of BMP in EV biogenesis and secretion was already suggested mainly due to its interaction with the endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT)-associated protein ALIX [4,71] and its specific localization in ILVs [8,72]. Furthermore, the amiodarone-induced enrichment of urinary BMP with docosahexaenoyl species suggests that such polyunsaturation could participate in the BMP secretion. Phospholipids with C22:6 render membrane more flexible and facilitate membrane fission participating in the formation of vesicles [73,74]. The BMP polyunsaturation coupled to its cone-shape structure is considered to be crucial for the dynamic of endolysosomal membranes and the formation of ILVs [18]. All these elements could explain the increase of BMP docosahexaenoyl species in urinary endosome-derived EVs of our study.

5. Conclusions

In summary, current knowledge on the unconventional lipid BMP outlines its crucial intracellular role to control the trafficking and degradation of proteins and lipids through the acidic endolysosomal compartment. Its accumulation in cells and tissues appeared as a cellular adaptation of the endosomal system to compensate for the increase of undigested material during various drug-induced and genetic LSDs such as Niemann Pick diseases, neuronal ceroid lipofuscinoses, mucopolysaccharidoses as well as recently with atherogenic-inducing diet [56,75–78]. In addition, BMP release in biological fluids suggested its importance as a diagnostic biomarker of endolysosomal dysfunction during these diseases [28,37,56,79]. Our present work confirmed this role for the first time in amiodarone-treated patient urines. Furthermore, the increased release of BMP-containing exosomes in urines could appear as an alternative to remove quickly excess of undigested material before irreversible toxicity as it was recently suggested for the clearance of toxic aggregates in neurodegenerative diseases [23]. Finally due to its ubiquitous distribution in most mammalian cells and its selective subcellular localization in the endolysosome, it can be speculated that BMP could be a specific lipid marker of endosome-derived EVs. However, this will require further analysis in EVs isolated from various extracellular biofluids. Thus, our present data could have implications not only in the field of all the disorders associated with endolysosomal dysfunction, but also in the growing field of EV research.

Funding

MR is supported by a PhD fellowship from the French Ministry of education. Financial supports were from INSERM; the University of Bern; SFD (Société Francophone du Diabète_AE 2016) and VML (Vaincre les Maladies Lysosomales_convention AO2018-6) to FHM.

Author contributions

MR performed most experiments; VL carried out lipid analysis of rat samples; FHM, AD and EEC performed microscopy analysis; AJ and PC helped for exosome purification; FHM and BF developed LC-MS/MS analysis; AV, PM and CB collected the patients samples; CS performed animal experiment; MdF performed biological analysis; RK and ADr helped for primary human macrophage

isolation and confocal microscopy analysis; FHM designed the research project with contribution of ID, PM, CC and SR, and wrote the manuscript. All the authors discussed the data and agreed with the manuscript.

Declaration of competing interest

The authors declared no competing financial interest.

Acknowledgements

The authors thank all the clinical staff of the endocrinology-cardiology ward for help in collecting urines. The authors are also thankful to Dr Harout Illozer for clinical information, to members of the Draeger laboratory for help and to Mr A. Debein for animal feeding.

Appendix A. Supplementary data

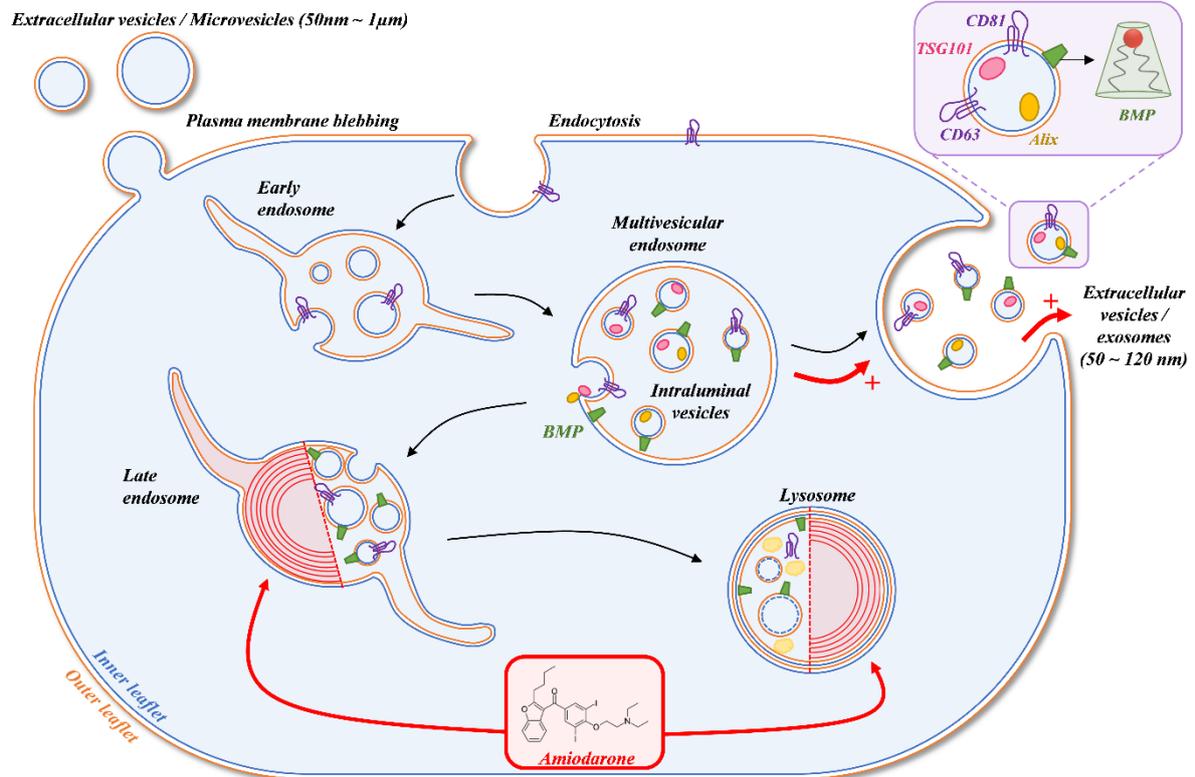
Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.07.005>.

References

- [1] T. Kobayashi, M.H. Beuchat, M. Lindsay, S. Frias, R.D. Palmiter, H. Sakuraba, R.G. Parton, J. Gruenberg, Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport, *Nat. Cell Biol.* 1 (1999) 113–118.
- [2] F. Hullin-Matsuda, C. Luquin-Costaz, J. Bouvier, I. Delton-Vandenbroucke, Bis(monoacylglycerol)phosphate, a peculiar phospholipid to control the fate of cholesterol: implications in pathology, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 81 (2009) 313–324.
- [3] H.D. Gallala, K. Sandhoff, Biological function of the cellular lipid BMP-BMP as a key activator for cholesterol sorting and membrane digestion, *Neurochem. Res.* 36 (2011) 1594–1600.
- [4] J. Gruenberg, Life in the lumen: the multivesicular endosome, *Traffic* 21 (2020) 76–93.
- [5] M. Waite, V. Roddick, T. Thornburg, L. King, F. Cochran, Conversion of phosphatidylglycerol to lyso(bis)phosphatidic acid by alveolar macrophages, *Faseb. J.* 1 (1987) 318–325.
- [6] F. Hullin-Matsuda, K. Kawasaki, I. Delton-Vandenbroucke, Y. Xu, M. Nishijima, M. Lagarde, M. Schlame, T. Kobayashi, De novo biosynthesis of the late endosome lipid, bis(monoacylglycerol)phosphate, *J. Lipid Res.* 48 (2007) 1997–2008.
- [7] J. Bouvier, K.A. Zemski Berry, F. Hullin-Matsuda, A. Makino, S. Michaud, A. Gelson, R.C. Murphy, T. Kobayashi, M. Lagarde, I. Delton-Vandenbroucke, Selective decrease of bis(monoacylglycerol)phosphate content in macrophages by high supplementation with docosahexaenoic acid, *J. Lipid Res.* 50 (2009) 243–255.
- [8] T. Kobayashi, M.H. Beuchat, J. Chevallier, A. Makino, N. Mayran, J.M. Escola, C. Lebrand, P. Cosson, J. Gruenberg, Separation and characterization of late endosomal membrane domains, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 32157–32164.
- [9] H.H. Tan, A. Makino, K. Sudesh, P. Greimel, T. Kobayashi, Spectroscopic evidence for the unusual stereochemical configuration of an endosome-specific lipid, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 51 (2012) 533–535.
- [10] B. Breiden, K. Sandhoff, Lysosomal glycosphingolipid storage diseases, *Annu. Rev. Biochem.* 88 (2019) 461–485.
- [11] T. Kobayashi, E. Stang, K.S. Fang, P. de Moerloose, R.G. Parton, J. Gruenberg, A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function, *Nature* 392 (1998) 193–197.
- [12] C.J. Luquin-Costaz, E. Lefai, M. Arnal-Levron, D. Markina, S. SakaÅ, V. Euthine, A. Makino, M. Guichardant, S. Yamashita, T. Kobayashi, M. Lagarde, P. Moulin, I. Delton-Vandenbroucke, Bis(Monoacylglycerol)Phosphate accumulation in macrophages induces intracellular cholesterol redistribution, attenuates liver-X receptor/ATP-binding cassette transporter A1/ATP-binding cassette transporter G1 pathway, and impairs cholesterol efflux, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33 (2013) 1803–1811.
- [13] H. Schulze, T. Kolter, K. Sandhoff, Principles of lysosomal membrane degradation Cellular topology and biochemistry of lysosomal lipid degradation, *Biochim. Biophys. Acta* 1793 (2009) 674–683.
- [14] M. Amal-Levron, Y. Chen, P. Greimel, F. Calevro, K. Gaget, F. Riols, A. Batut, J. Bertrand-Michel, F. Hullin-Matsuda, V.M. Olkkonen, I. Delton, C. Luquin-Costaz, Bis(monoacylglycerol)phosphate regulates oxysterol binding protein-related protein 11 dependent sterol trafficking, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1864 (2019) 1247–1257.
- [15] K. Stadler, H.R. Ha, V. Cminale, C. Spirli, G. Saletti, M. Schiavon, D. Buttomo, L. Bigler, F. Follath, A. Pettenazzo, A. Baruffisso, Amiodarone alters late endosomes and inhibits SARS coronavirus infection at a post-endosomal level, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 39 (2008) 142–149.
- [16] E. Zaitseva, S.-T. Yang, K. Melikov, S. Pournmal, L.V. Chernomordik, Dengue virus ensures its fusion in late endosomes using compartment-specific lipids, *PLoS Pathog.* 6 (2010), e1001131.
- [17] C. Luquin, R. Dolmazon, J.M. Enderlin, C. Laugier, M. Lagarde, J.F. Pageaux, Bis(monoacylglycerol) phosphate in rat uterine stromal cells: structural characterization and specific esterification of docosahexaenoic acid, *Biochem. J.* 351 Pt 3 (2000) 795–804.
- [18] H. Matsuo, J. Chevallier, N. Mayran, I. Le Blanc, C. Ferguson, J. Faure, N.S. Blanc, S. Matile, J. Dubochet, R. Sadou, R.G. Parton, F. Vilbois, J. Gruenberg, Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization, *Science* 303 (2004) 531–534.
- [19] G. van Niel, G. D'Angelo, G. Raposo, Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19 (2018) 213–228.
- [20] M. Record, K. Carayon, M. Poirot, S. Silvente-Poirot, Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological, *Biochim. Biophys. Acta* 1841 (2014) 108–120.
- [21] R. Wubbolts, R.S. Leckie, P.T. Veenhuizen, G. Schwarzmann, W. Mobius, J. Hoemschemeyer, J.W. Slot, H.J. Geuze, W. Stoorvogel, Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 10963–10972.
- [22] K. Lualagnier, C. Motta, S. Hamdi, S. Roy, F. Fauvel, J.F. Pageaux, T. Kobayashi, J.P. Sallès, B. Perret, C. Bonnerot, M. Record, Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization, *Biochem. J.* 380 (2004) 161–171.
- [23] A.M. Miranda, Z.M. Lasiecka, Y. Xu, J. Neufeld, S. Shahriar, S. Simoes, R.B. Chan, T.G. Oliveira, S.A. Small, G. Di Paolo, Neuronal lysosomal dysfunction releases exosomes harboring APP C-terminal fragments and unique lipid signatures, *Nat. Commun.* 9 (2018) 291.
- [24] N.P. Hestvik, A. Lorente, Current knowledge on exosome biogenesis and release, *Cell. Mol. Life Sci. : CM* 75 (2018) 193–208.
- [25] M. Mathieu, L. Martin-Jaular, G. Lavieu, C. Thery, Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication, *Nat. Cell Biol.* 21 (2019) 9–17.
- [26] S. Rome, A. Forterre, M.L. Mizgier, K. Bouzakri, Skeletal muscle-released extracellular vesicles: state of the art, *Front. Physiol.* 10 (2019) 929.
- [27] K.L. Thompson, J. Zhang, S. Stewart, B.A. Rosenzweig, K. Shea, D. Mans, T. Colatsky, Comparison of urinary and serum levels of di-22:6-bis(monoacylglycerol)phosphate as noninvasive biomarkers of phospholipidosis in rats, *Toxicol. Lett.* 213 (2012) 285–291.
- [28] P.J. Melkic, S. Duplock, D. Blacklock, P.D. Whitfield, G. Macintosh, J.J. Hopwood, M. Fuller, Effect of lysosomal storage on bis(monoacylglycerol)phosphate, *Biochem. J.* 411 (2008) 71–78.
- [29] H. Sawada, K. Takami, S. Asahi, A toxicogenomic approach to drug-induced phospholipidosis: analysis of its induction mechanism and establishment of a novel in vitro screening system, *Toxicol. Sci.* 83 (2005) 282–292.
- [30] Borlak Anderson, Drug-induced phospholipidosis, *FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett.* 580 (2006) 5533–5540.
- [31] N. Bocchini, M. Giantin, F. Crivellente, S. Ferrareso, I. Faustinielli, M. Dacasto, P. Cristofori, Molecular biomarkers of phospholipidosis in rat blood and heart after amiodarone treatment, *J. Appl. Toxicol.* 35 (2015) 90–103.
- [32] M.J. Reaser, A review of the biology and toxicologic implications of the induction of lysosomal lamellar bodies by drugs, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 97 (1989) 47–56.
- [33] K.L. Thompson, K. Haskins, B.A. Rosenzweig, S. Stewart, J. Zhang, D. Peters, A. Knapp, R. Rouse, D. Mans, T. Colatsky, Comparison of the diagnostic accuracy of di-22:6-bis(monoacylglycerol)phosphate and other urinary phospholipids for drug-induced phospholipidosis or tissue injury in the rat, *Int. J. Toxicol.* 31 (2012) 14–24.
- [34] M. Wang, J.P. Palavicini, A. Cseresznye, X. Han, Strategy for quantitative analysis of isomeric bis(monoacylglycerol)phosphate and phosphatidylglycerol species by shotgun lipidomics after one-step methylation, *Anal. Chem.* 89 (2017) 8490–8495.
- [35] M. Scherer, G. Schmitz, G. Liebisch, Simultaneous quantification of cardiolipin, bis(monoacylglycerol)phosphate and their precursors by hydrophilic interaction LC-MS/MS including correction of isotopic overlap, *Anal. Chem.* 82 (2010) 8794–8799.
- [36] E.A. Tengstrand, G.T. Miwa, F.Y. Hsieh, Bis(monoacylglycerol)phosphate as a non-invasive biomarker to monitor the onset and time-course of phospholipidosis with drug-induced toxicities, *Exp. Opin. Drug Metabol. Toxicol.* 6 (2010) 555–570.
- [37] N. Liu, E.A. Tengstrand, L. Chourb, F.Y. Hsieh, Di-22:6-bis(monoacylglycerol) phosphate: a clinical biomarker of drug-induced phospholipidosis for drug development and safety assessment, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 279 (2014) 467–476.
- [38] S. Basaria, D.S. Cooper, Amiodarone and the thyroid, *Am. J. Med.* 118 (2005) 706–714.
- [39] P. Zimetbaum, Amiodarone for atrial fibrillation, *N. Engl. J. Med.* 356 (2007) 935–941.
- [40] W. Tsang, R.L. Houlden, Amiodarone-induced thyrotoxicosis: a review, *Can. J. Cardiol.* 25 (2009) 421–424.
- [41] P. Vassallo, R.G. Trohman, Prescribing amiodarone: an evidence-based review of clinical indications, *J. Am. Med. Assoc.* 298 (2007) 1312–1322.

- [42] N. Mesens, M. Desmidt, G.R. Verheyen, S. Starckx, S. Damsch, R. De Vries, M. Verhemeidonck, J. Van Gompel, A. Lampo, L. Lammens, Phospholipidosis in rats treated with amiodarone: serum biochemistry and whole genome microarray analysis supporting the lipid traffic jam hypothesis and the subsequent rise of the biomarker BMP, *Toxicol. Pathol.* 40 (2012) 491–503.
- [43] Y. Chen, M. Arnal-Levron, M. Lagarde, P. Moulin, C. Luquin-Costaz, I. Delton, THP1 macrophages oxidized cholesterol, generating 7-derivative oxysterols specifically released by HDL, *Steroids* 99 (2015) 212–218.
- [44] Y. Larpin, H. Besancon, M.J. Iacovache, V.S. Babiychuk, E.B. Babiychuk, B. Zuber, A. Draeger, R. Koffel, Bacterial pore-forming toxin pneumolysin: cell membrane structure and microvesicle shedding capacity determines differential survival of cell types, *Faseb. J.* 34 (2020) 1665–1678.
- [45] R. Koffel, A. Meshcheryakova, J. Warsawska, A. Hennig, K. Wagner, A. Jorgl, D. Gubi, D. Moser, A. Hladik, U. Hoffmann, M.B. Fischer, W. van den Berg, M. Koenders, C. Scheinecker, B. Gesslbauer, S. Knapp, H. Strobl, Monocytic cell differentiation from band-stage neutrophils under inflammatory conditions via MKK6 activation, *Blood* 124 (2014) 2713–2724.
- [46] E.G. Bligh, W.J. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (1959) 911–917.
- [47] A.H. Gheini, M. Vogeli, U. Baumgartner, E. Vassella, A. Draeger, F.C. Burkhard, K. Monastyrskaya, Improved isolation strategies to increase the yield and purity of human urinary exosomes for biomarker discovery, *Sci. Rep.* 8 (2018) 3945.
- [48] P. Fernandez-Llama, S. Khosrith, P.A. Gonzales, R.A. Star, T. Pisitkun, M.A. Knepper, Tamm-Horsfall protein and urinary exosome isolation, *Kidney Int.* 77 (2010) 736–742.
- [49] A. Forterre, A. Jalabert, E. Berger, M. Baudet, K. Chikh, E. Errazuriz, J. De Larichaudy, S. Chanon, M. Weiss-Gayet, A.M. Hesse, M. Record, A. Geloën, E. Lefai, H. Vidal, Y. Couté, S. Rome, Proteomic analysis of C2C12 myoblast and myotube exosome-like vesicles: a new paradigm for myoblast-myotube cross talk? *PLoS One* 9 (2014), e84153.
- [50] A. Forterre, A. Jalabert, K. Chikh, S. Pesenti, V. Euthine, A. Granjon, E. Errazuriz, E. Lefai, H. Vidal, S. Rome, Myotube-derived exosomal miRNAs downregulate Sirtuin1 in myoblasts during muscle cell differentiation, *Cell Cycle* 13 (2014) 78–89.
- [51] E.T. Baronas, J.W. Lee, C. Alden, F.Y. Hsieh, Biomarkers to monitor drug-induced phospholipidosis, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 218 (2007) 72–78.
- [52] J.R. Wherrett, S. Huterer, Bis-(monoacylglycerol)-phosphate of rat and human liver: fatty acid composition and NMR spectroscopy, *Lipids* 8 (1973) 531–533.
- [53] Q. Chen, R. Takada, C. Noda, S. Kobayashi, S. Takada, Different populations of Wnt-containing vesicles are individually released from polarized epithelial cells, *Sci. Rep.* 6 (2016) 35562.
- [54] J. Wang, Y. Yao, J. Wu, G. Li, Identification and analysis of exosomes secreted from macrophages extracted by different methods, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8 (2015) 6135–6142.
- [55] K. Kumar, P.J. Zimetbaum, Antiarrhythmic drugs 2013: state of the art, *Curr. Cardiol. Rep.* 15 (2013) 410.
- [56] G.F. Grabner, N. Fawzy, M.A. Pribasniq, M. Trieb, U. Taschler, M. Holzer, M. Schweiger, H. Wolinski, D. Kolb, A. Horvath, R. Breinbauer, T. Rülcke, R. Rabl, A. Lass, V. Stadlbauer, B. Hutter-Paier, R.E. Stauber, P. Fickert, R. Zechner, G. Marsche, T.O. Eichmann, R. Zimmermann, Metabolic disease and ABHD6 alter the circulating bis(monoacylglycerol)phosphate profile in mice and humans, *JLR (J. Lipid Res.)* 60 (2019) 1020–1031.
- [57] J. Masart, K. Begriche, C. Moreau, B. Fromenty, Role of nonalcoholic fatty liver disease as risk factor for drug-induced hepatotoxicity, *J. Clin. Transl. Res.* 3 (2017) 212–232.
- [58] G. Morissette, A. Ammoury, D. Rusu, M.C. Marguery, R. Lodge, P.E. Poubelle, F. Marceau, Intracellular sequestration of amiodarone: role of vacuolar ATPase and macroautophagic transition of the resulting vacuolar cytopathology, *Br. J. Pharmacol.* 157 (2009) 1531–1540.
- [59] E. Piccoli, M. Nadai, C.M. Caretta, V. Bergonzini, C. Del Vecchio, H.R. Ha, L. Bigler, D. Dal Zoppo, E. Faggini, A. Pettenazzo, R. Orlando, C. Salata, A. Calistri, G. Palu, A. Bantussio, Amiodarone impairs trafficking through late endosomes inducing a Niemann-Pick C-like phenotype, *Biochem. Pharmacol.* 82 (2011) 1234–1249.
- [60] W.H. Fissell, J.H. Miner, What is the glomerular ultrafiltration barrier? *J. Am. Soc. Nephrol. : JASN (J. Am. Soc. Nephrol.)* 29 (2018) 2262–2264.
- [61] F.J. Verweij, C. Revenu, G. Arras, F. Dingli, D. Loew, D.M. Pegtel, G. Follain, G. Allio, J.C. Goetz, P. Zimmermann, P. Herbomel, F. Del Bene, G. Raposo, G. van Niel, Live tracking of inter-organ communication by endogenous exosomes in vivo, *Dev. Cell* 48 (2019) 573–589 e574.
- [62] D.K. Jeppesen, A.M. Fenix, J.L. Franklin, J.N. Higginbotham, Q. Zhang, L.J. Zimmernan, D.C. Liebler, J. Ping, Q. Liu, R. Evans, W.H. Fissell, J.G. Patton, L.H. Rome, D.T. Bumette, R.J. Coffey, Reassessment of exosome composition, *Cell* 177 (2019) 428–445 e418.
- [63] J.W. Dear, J.M. Street, M.A. Bailey, Urinary exosomes: a reservoir for biomarker discovery and potential mediators of intrarenal signalling, *Proteomics* 13 (2013) 1572–1580.
- [64] M.L. Merchant, I.M. Rood, J.K.J. Deegens, J.B. Klein, Isolation and characterization of urinary extracellular vesicles: implications for biomarker discovery, *Nat. Rev. Nephrol.* 13 (2017) 731–749.
- [65] L. Wang, T. Skotland, V. Berge, K. Sandvig, A. Llorente, Exosomal proteins as prostate cancer biomarkers in urine: from mass spectrometry discovery to immunoassay-based validation, *Eur. J. Pharmaceut. Sci.* 98 (2017) 80–85.
- [66] A.L. Stahl, K. Johansson, M. Mossberg, R. Kahn, D. Karpman, Exosomes and microvesicles in normal physiology, pathophysiology, and renal diseases, *Pediatr. Nephrol.* 34 (2019) 11–30.
- [67] T. Pisitkun, R.F. Shen, M.A. Knepper, Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 13368–13373.
- [68] C. Thery, K.W. Witwer, et al., Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines, *J. Extracell. Vesicles* 7 (2018), 1535750.
- [69] T. Skotland, K. Sandvig, A. Llorente, Lipids in exosomes: current knowledge and the way forward, *Prog. Lipid Res.* 66 (2017) 30–41.
- [70] M. Record, S. Silvente-Poirot, M. Poirot, M.J.O. Wakelam, Extracellular vesicles: lipids as key components of their biogenesis and functions, *J. Lipid Res.* 59 (2018) 1316–1324.
- [71] C. Bissig, M. Lenoir, M.C. Velluz, I. Kufareva, R. Abagyan, M. Overduin, J. Gruenberg, Viral infection controlled by a calcium-dependent lipid-binding module in ALIX, *Dev. Cell* 25 (2013) 364–373.
- [72] W. Mobius, E. van Donselaar, Y. Ohno-Iwashita, Y. Shimada, H.F. Heijnen, J.W. Slot, H.J. Geuze, Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway, *Traffic* 4 (2003) 222–231.
- [73] M. Pinot, S. Vanni, S. Pagnotta, S. Lacas-Gervais, L.-A. Payet, T. Ferreira, R. Gautier, B. Goud, B. Antonny, H. Barelli, Polyunsaturated phospholipids facilitate membrane deformation and fission by endocytic proteins, *Science* 345 (2014) 693–697.
- [74] M.M. Manni, M.L. Tiberti, S. Pagnotta, H. Barelli, R. Gautier, B. Antonny, Acyl Chain Asymmetry and Polyunsaturation of Brain Phospholipids Facilitate Membrane Vesiculation without Leakage, *Elife* vol. 7 (2018).
- [75] M.T. Vanier, Complex lipid trafficking in Niemann-Pick disease type C, *J. Inher. Metab. Dis.* 38 (2015) 187–199.
- [76] Z. Akgoç, M. Sena-Esteves, D.R. Martin, X. Han, A. d’Azzo, T.N. Seyfried, Bis-(monoacylglycerol)phosphate: a secondary storage lipid in the gangliosidosis, *J. Lipid Res.* 56 (2015) 1006–1013.
- [77] K. Kitakaze, Y. Mizutani, E. Sugiyama, C. Tasaki, D. Tsuji, N. Maita, T. Hirokawa, D. Asanuma, M. Kamiya, K. Sato, M. Setou, Y. Urano, T. Togawa, A. Otaka, H. Sakuraba, K. Itoh, Protease-resistant modified human beta-hexosaminidase B ameliorates symptoms in GM2 gangliosidosis model, *J. Clin. Invest.* 126 (2016) 1691–1703.
- [78] F.M. Platt, Emptying the stores: lysosomal diseases and therapeutic strategies, *Nat. Rev. Drug Discov.* 17 (2018) 133–150.
- [79] M.T. Vanier, P. Gissen, P. Bauer, M.J. Coll, A. Burlina, C.J. Hendriks, P. Latour, C. Goletz, R.W. Welford, T. Marquardt, S.A. Kolb, Diagnostic tests for Niemann-Pick disease type C (NP-C): a critical review, *Mol. Genet. Metab.* 118 (2016) 244–254.

Graphical abstract



Drug-induced endolysosome dysfunction favors release of exosomes containing the cone-shape endosomal lipid BMP

Données supplémentaires :

Legends of supplemental figures

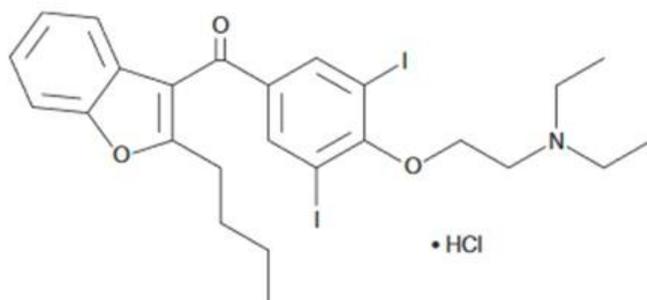
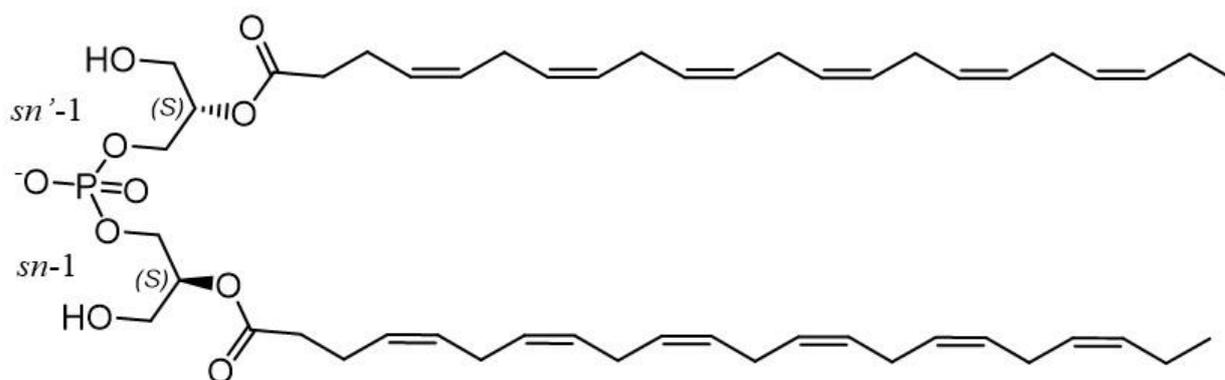
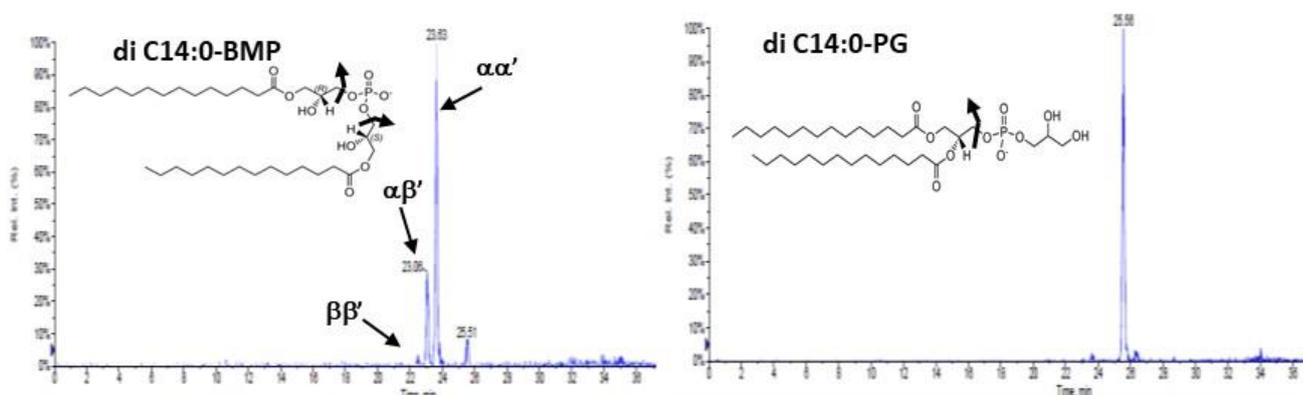
Rabia

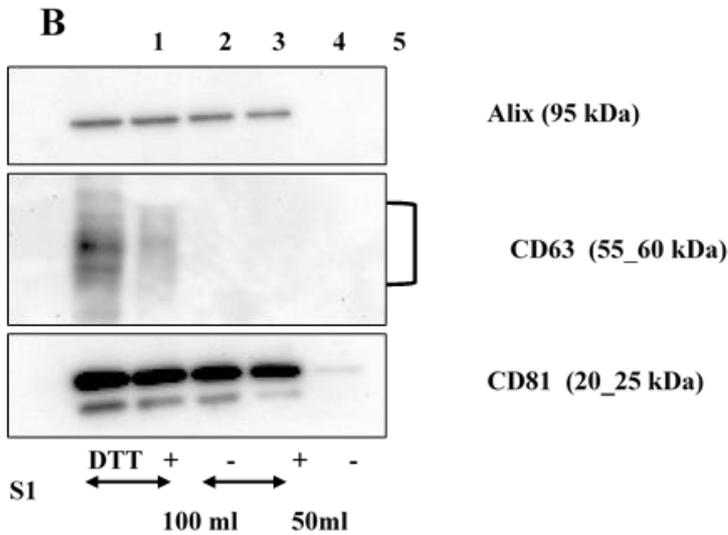
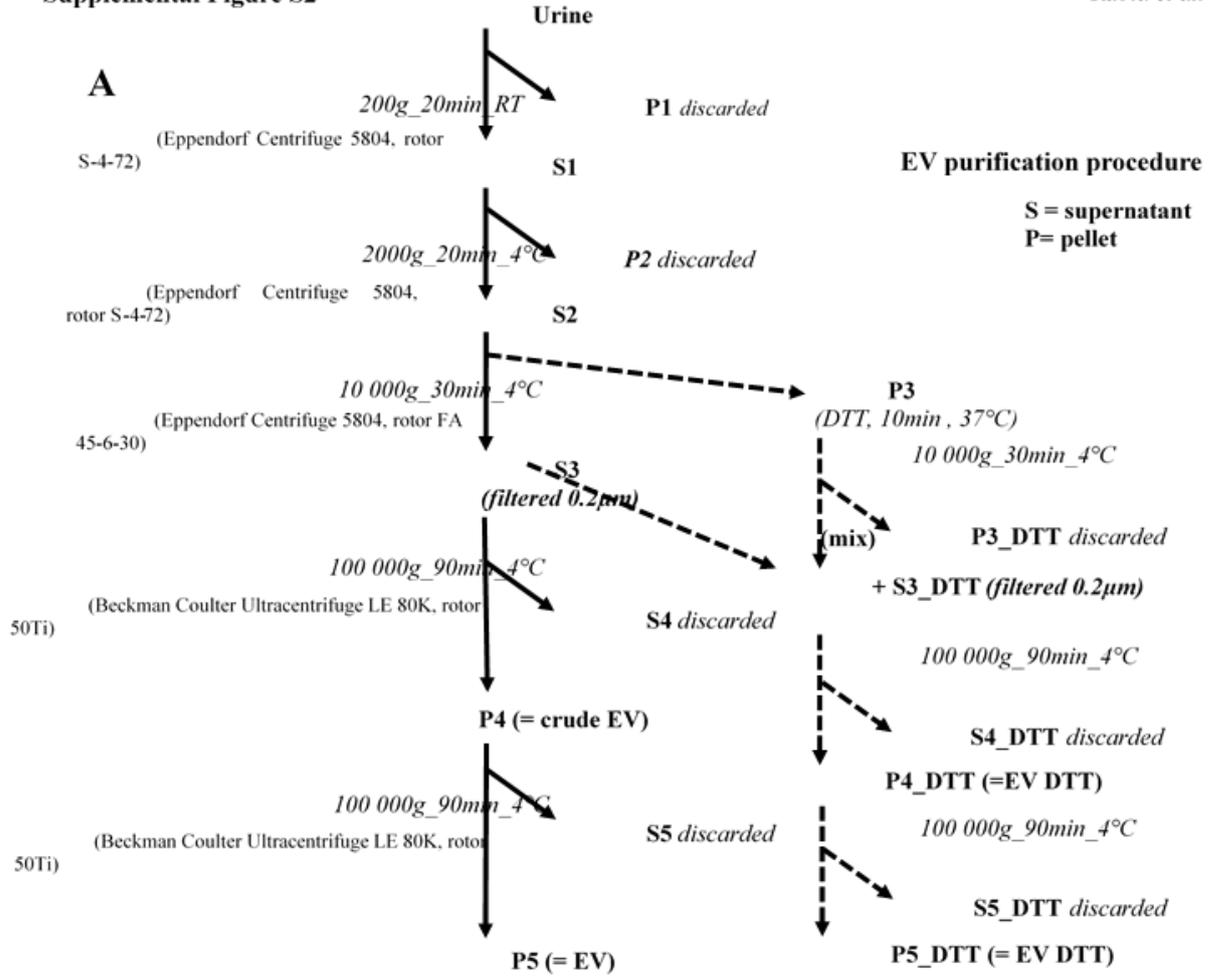
et al.

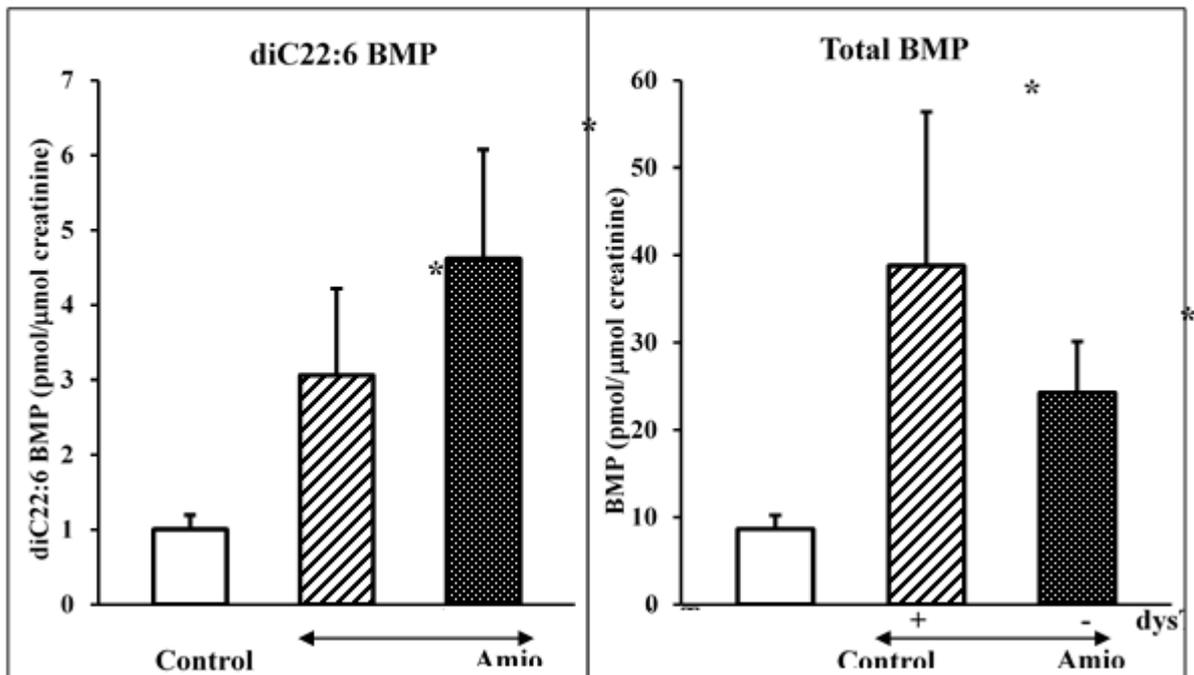
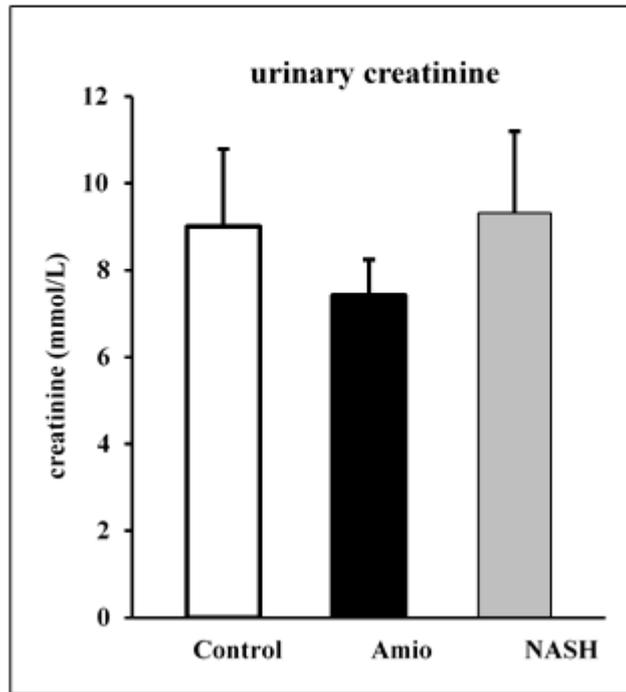
Supplemental figure S1: A) Structure of amiodarone (hydrochloride) consisting of an hydrophobic moiety (benzofuran and diiodinated benzene ring) and an hydrophilic moiety with amine group characteristic of cationic amphiphilic drugs; **B) Structure of diC22:6-BMP** showing the unusual *sn*-1, *sn*-1' stereoconfiguration of the glycerophospho-glycerol backbone (here with an S/S' conformation) and the *sn*-2, *sn*-2' position of the acyl chains; **C) Extracted ion chromatogram of BMP and PG internal standards** showing the separation of the 3 regioisomers of di C14:0-BMP ($\beta\beta'$, $\alpha\beta'$ and $\alpha\alpha'$) and C14:0-PG that display similar precursor ion $[M+NH_4]^+$ at *m/z* 684.3 but resulting respectively in the formation of monoacylglycerol MAG fragment (*m/z* 285.3) and diacylglycerol DAG fragment (*m/z* 495.6).

Supplemental figure S2: Isolation and characterization of urinary extracellular vesicles. **A)** Schematic procedure of urinary EV purification using two-step ultracentrifugation without (plain lines) or with the reducing compound DTT (dotted lines); **B)** Western blot analysis of EV (lanes 1-4) and 200g-supernatant (S1, lane 5) from control urines using antibodies against EV protein markers ALIX, CD63 and CD81. Equal volumes of EV purified from 100ml (lanes 1-2) and 50ml (lanes 3-4) of urines pre-treated (lanes 1, 3) or not (lanes 2, 4) with DTT were loaded on 11 % SDS-PAGE.

Supplemental figure S3: A) Amiodarone treatment does not modify the renal function. Urinary creatinine expressed in mmol/L is mean \pm sem of n=12, control subjects; n=24, amiodarone-treated patients and n=6, NASH patients. No statistical difference with the control subjects by unpaired Student's t test; **B) Similar increase of BMP in urine of amiodarone-treated patients without or with dysthyroidism.** DiC22:6-BMP species and total BMP content were analyzed by LC-MS/MS and are expressed in pmol corrected to μ mol of creatinine. They are mean \pm sem of n=12, control subjects; n=6, amiodarone-treated patients with thyroid dysfunction (=dysT+) and n=18, amiodarone-treated patients with no sign of dysthyroidism (=dysT-). * $p < 0.05$ of unpaired Student's t test compared to control subjects.

A**B****C**





Annexe 2: Article 2 : Bis(monoacylglycero)phosphate, an important actor in the host endocytic machinery hijacked by SARS-CoV-2 and related viruses

Biochimie 179 (2020) 247–256



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi



Bis(monoacylglycero)phosphate, an important actor in the host endocytic machinery hijacked by SARS-CoV-2 and related viruses



Céline Luquain-Costaz, Maxence Rabia, Françoise Hullin-Matsuda*, Isabelle Delton**

Univ-Lyon, CarMeN Laboratory, Inserm U1060, INRAE U1397, INSA Lyon, Villeurbanne, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 16 July 2020
Received in revised form 28 October 2020
Accepted 29 October 2020
Available online 5 November 2020

Keywords:
Bis(monoacylglycero)phosphate
Cholesterol
Extracellular vesicles
Oxysterol-binding protein (OSBP)-Related proteins ORP
Niemann pick type C disease NPC
SARS-CoV-2

ABSTRACT

Viruses, including the novel coronavirus SARS-CoV-2, redirect infected cell metabolism to their own purposes. After binding to its receptor angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) on the cell surface, the SARS-CoV-2 is taken up by receptor-mediated endocytosis ending in the acidic endolysosomal compartment. The virus hijacks the endosomal machinery leading to fusion of viral and endosomal membranes and release of the viral RNA into the cytosol. This mini-review specifically highlights the membrane lipid organization of the endosomal system focusing on the unconventional and late endosome/lysosome-specific phospholipid, bis(monoacylglycero)phosphate (BMP). BMP is enriched in alveolar macrophages of lung, one of the target tissue of SARS-CoV-2. This review details the BMP structure, its unsaturated fatty acid composition and fusogenic properties that are essential for the highly dynamic formation of the intraluminal vesicles inside the endosomes. Interestingly, BMP is necessary for infection and replication of enveloped RNA virus such as SARS-CoV-1 and Dengue virus. We also emphasize the role of BMP in lipid sorting and degradation, especially cholesterol transport in cooperation with Niemann Pick type C proteins (NPC 1 and 2) and with some oxysterol-binding protein (OSBP)-related proteins (ORPs) as well as in sphingolipid degradation. Interestingly, numerous virus infection required NPC1 as well as ORPs along the endocytic pathway. Furthermore, BMP content is increased during pathological endosomal lipid accumulation in various lysosomal storage disorders. This is particularly important knowing the high percentage of patients with metabolic disorders among the SARS-CoV-2 infected patients presenting severe forms of COVID-19.

© 2020 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

Contents

1. Introduction	248
2. Bis(monoacylglycero)phosphate, an unusual endolysosomal phospholipid to control the fate of endocytosed compounds	248
2.1. Structure, biosynthesis and metabolism of BMP	248
2.2. Localization and tissue distribution of BMP	249
2.3. Dynamics of ILVs and BMP membrane domains	249
2.4. Hijacking of ILVs and EVs by viruses and role of BMP	250
3. Bis(monoacylglycero)phosphate and cholesterol homeostasis	250
3.1. Cholesterol transporter proteins: focus on NPC and ORP	250
3.2. BMP modulation of NPC and ORP activities	251

Abbreviations: ACE2, angiotensin-converting enzyme 2; BMP, bis(monoacylglycero)phosphate [also known as lysobisphosphatidic acid (LBPA)]; diC22:6-BMP, di-docosahexaenoyl BMP; CAD, cationic amphiphilic drug; CME, clathrin-mediated endocytosis; CoV, coronavirus; COVID-19, coronavirus disease-19; ESCRT, endosomal sorting complexes required for transport; ILV, intraluminal vesicle; LE/Lys, late endosome/lysosome; LSD, lysosomal storage disorder/disease; MCS, membrane contact sites; MERS, Middle East Respiratory Syndrome; MVE, multivesicular endosome; NPC, Niemann Pick type C; OSBP, oxysterol binding protein; ORP, OSBP-related protein; SARS, severe acute respiratory syndrome; TMPRSS2, transmembrane serine protease 2; VSV, vesicular stomatitis virus.

* Corresponding author. Inserm UMR 1060, CarMeN laboratory, IMBL building, 69621, Villeurbanne cedex, France.

** Corresponding author.

E-mail addresses: francoise.hullin-matsuda@inserm.fr (F. Hullin-Matsuda), isabelle.delton@insa-lyon.fr (I. Delton).

<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.10.018>

0300-9084/© 2020 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

3.3. Role of NPC and ORP in virus infection	252
3.4. BMP regulation of viral infection via other cholesterol pools	252
4. Conclusion	253
Funding	253
Author contributions	253
Declaration of competing interest	253
Acknowledgements	253
References	253

1. Introduction

Coronaviruses are a group of enveloped, single-stranded positive genomic RNA viruses known to cause severe respiratory diseases in human, such as Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS), Middle East Respiratory Syndrome (MERS) and the ongoing coronavirus disease-19 (COVID-19) due to the SARS-CoV-2 [1]. In order to treat and/or prevent the actual SARS-CoV-2 infection, a better understanding of the molecular mechanism used by this new virus is required. After binding to its receptor angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) found on the surface of cells lining the respiratory tract and lung [2], the virus is taken up by clathrin-mediated endocytosis (CME) and transported to the acidic endolysosomal compartment. The virus hijacks the endosomal machinery leading to fusion of viral and endosomal membranes and release of viral factors into the cytosol to infect the targeted cells. Noteworthy, viral proteins mediating this fusion usually require a specific lipid composition of the host cell membrane [3,4]. In fact, the virus is exploiting the different lipid composition of the various host cell organelles it travels through to control the intracellular location of its fusion process and thus, where its RNA will be released. These interactions between the virus and the host cell lipids can become useful therapeutic targets.

Using various viruses like the vesicular stomatitis virus (VSV) as tool has been fruitful and informative to better understand the successive steps of the endocytic pathway and the dynamic membrane traffic occurring from the early endosome to the late endosome/lysosome (LE/Lys) [5–9]. In addition, the host cell lipids are not distributed equally among the organelles. Sphingolipids and cholesterol display a gradual distribution with the highest concentration in the plasma membrane and the lowest concentration in the endoplasmic reticulum (ER) [10]. Furthermore, lipids form specific membrane domains in the plasma membrane (PM) as well as in organelle membranes. Sphingolipid- and cholesterol-enriched domains known as lipid rafts, are found on the outer leaflet of the PM and on the luminal side of the endosome [11–14]. At the PM, these lipid domains in association with proteins play an essential role to form signaling platforms and to drive their subsequent internalization through the endosomal system [15]. In parallel to the sphingolipid- and cholesterol-enriched domains, different polyphosphoinositides enriched in the inner leaflet of the PM and in endosomes play important roles in various stages of endocytosis [9,16]. Another key anionic glycerophospholipid bis(monoacylglycerophosphate) (BMP), also named as lysobisphosphatidic acid (LBPA) is found specifically enriched in the internal membranes of the acidic LE/Lys compartment [16,17]. Interestingly, BMP and other anionic phospholipids are necessary for infection and replication of enveloped RNA virus such as SARS-CoV-1 and Dengue virus [4,18,19].

While the involvement of BMP as a key player of the anti-viral effect of chloroquine and derivatives is discussed by Carrière et al. in this special issue [20], this review will focus on the role of BMP in

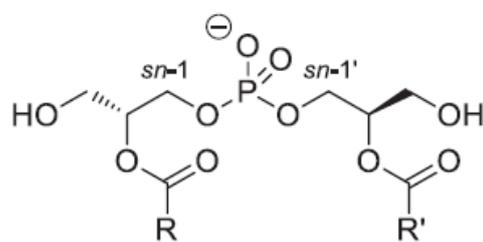
lipid sorting and degradation along the endocytic pathway potentially affecting virus infection. A specific focus is put on the effect of BMP on cholesterol transport regulated by Niemann Pick type C proteins (NPC 1 and 2) and some oxysterol-binding protein (OSBP)-related proteins (ORPs). This unusual endosomal phospholipid is crucial to maintain endosomal lipid storage capacity and trafficking as well as the fine-tuning of cholesterol domains at the PM known to control receptor signaling and cholesterol efflux [21–23]. Interestingly, the importance of the host cholesterol pools in viral fusion and replication was recently pointed out [24,25]. Since genetic NPC1 defect or drug (U18666A)-induced endosomal cholesterol accumulation were shown to inhibit Ebola virus and VSV infection [5,26], this review will provide some useful clues for the development of drugs against COVID-19, especially in the context of the fast drug repurposing occurring recently [25,27,28].

2. Bis(monoacylglycerophosphate), an unusual endolysosomal phospholipid to control the fate of endocytosed compounds

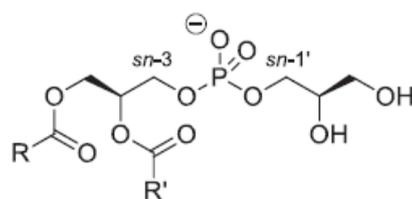
BMP is specifically enriched in the LE/Lys compartment where it controls in particular the fate of sphingolipids and cholesterol. In fact, the late endosome is a strategic sorting station for various materials (including viruses) arriving from the endocytic, biosynthetic and autophagic pathways as well as outgoing to the lysosome for degradation, the Golgi complex, the ER or the PM. By controlling the reutilization or the degradation of endocytosed components, the LE/Lys compartment is important to inform the cell of its metabolic status.

2.1. Structure, biosynthesis and metabolism of BMP

BMP is a structural isomer of phosphatidylglycerol (PG) where in contrast to PG, the two acyl chains (often identical) are not linked to the same glycerol (Fig. 1). It is considered as an unusual polyglycerophospholipid due to the *sn*-1 position of the phosphate moiety on the glycerol backbone found exclusively in the Archaea domain whereas it is linked to the *sn*-3 position in all the glycerophospholipids of Eukarya and Bacteria domains [22,29]. The exact position of the acyl chains on the glycerol moieties has been a matter of debate. However it seems that the native BMP *in vivo* is *sn*-2, *sn*-2' acylated compared to the thermodynamically more stable *sn*-3, *sn*-3' acylated BMP that could be formed *in vitro* during the purification procedure [30–32]. Furthermore, *sn*-2, *sn*-2' acylated BMP and not the *sn*-3, *sn*-3' acylated BMP is able to form multivesicular liposomes *in vitro* in a pH-dependent manner [33]. The other polyglycerophospholipids, PG and cardiolipin (CL), were shown as exogenous sources *in vivo* [22]. In addition, PG and not CL, was identified as the primary precursor of the *de novo* biosynthesis of BMP in CHO cells mutated for the PG phosphate synthase [34]. It was proposed that the stereoconversion of PG to BMP requires complex successive reactions involving transacylases and



Bis(monoacylglycero)phosphate (BMP)



Phosphatidylglycerol (PG)

Fig. 1. Structure of bis(monoacylglycero)phosphate BMP and its structural isomer phosphatidylglycerol PG. BMP exhibits an unusual *sn*-1, *sn*-1' stereoconfiguration based on the position of the phosphate on each glycerol moiety, different from the *sn*-3, *sn*-1' configuration of its precursor PG. In native BMP, the acyl chains R and R' are esterified on the *sn*-2, *sn*-2' positions whereas in PG, they are in *sn*-1 and *sn*-2 of the same glycerol molecule.

phospholipases [35,36]. BMP appears progressively during the maturation of the endosome visualized by a multivesicular appearance due to inward budding of the organelle limiting membrane towards its lumen leading to the formation of intraluminal vesicles (ILVs) (Fig. 2). The location of its biosynthesis was postulated to occur in the LE/Lys compartment [37,38]. However, it was also suggested that crosstalk through membrane contact sites (MCS) might be required for its *de novo* synthesis between LE/Lys and mitochondria - ER where PG and lysoPG are synthesized [39]. Due to its stereoconfiguration, BMP is resistant to the phospholipase activity present in the lysosome explaining its extended lifetime [40]. However, acyl chain turnover was demonstrated comparable to other phospholipids [41]. Phospholipase activities able to metabolize BMP have been described depending on the acidic environment and substrate presentation [42,43], including a pancreatic-lipase related protein 2 (PLRP2) also found in lysosome [44,45] and recently the monoacylglycerol hydrolase α/β hydrolase domain-containing 6 ABHD6 [46,47].

2.2. Localization and tissue distribution of BMP

BMP is found in most mammalian cells and tissues. It was also found in some strains of alkalophilic bacteria and in the amoeba

Dictyostelium discoideum [55,56]. It is not detected in lower Eukaryotes such as yeast, but the improvement of recent analytical methods could be very useful to detect subminimal levels. Most human and animal cells or tissues contain relatively low amounts of BMP, not exceeding 1–2% of their total phospholipids. In the LE/Lys compartment, BMP amounts to 15% of the phospholipids and constitutes up to 70% of their internal membrane phospholipids, including ILVs [17]. In both humans and animal models, BMP was shown to dramatically increase in cationic amphiphilic drugs (CAD)-induced phospholipidosis and in inherited lysosomal storage disorders (LSD) characterized by accumulated materials in LE/Lys due to alteration of degradative pathways [57,58]. During these disorders, increasing BMP levels were detected also in extracellular biofluids (plasma, urines...) particularly docosahexaenoic acid (C22:6n-3) containing species such as diC22:6-BMP. Thus, BMP is considered as a possible biomarker to follow disease progression [59,60]. We recently showed that BMP was increased in the urines of amiodarone-treated patients, a CAD antiarrhythmic drug, and was associated with extracellular vesicles (EVs) characterized as exosomes [49]. EVs form a heterogeneous group of membrane vesicles of variable sizes: "exosomes" of about 50–120 nm in diameter, originated from the ILVs after fusion of the multivesicular endosomes (MVEs) with the PM or "microvesicles" of about 50 nm to 1 μ m in diameter, obtained from shedding of the PM [50]. Presence of BMP in EVs seems to vary according to the cell type or the endolysosomal dysfunction. Due to its ubiquitous distribution in most mammalian cells and its selective localization in the endolysosome, we speculated that BMP could be a specific lipid signature of endosome-derived EVs in human urines [49]. However, this will require more analysis of EVs isolated from other extracellular biofluids. Furthermore, the precise role of BMP to control exosome biogenesis and secretion is still unclear but could be linked to its biophysical properties as detailed below.

2.3. Dynamics of ILVs and BMP membrane domains

In most cell types, BMP is characterized by a high proportion of unsaturated fatty acids, such as oleic acid. Also polyunsaturated fatty acids, such as docosahexaenoic acid, are enriched in BMP of rat uterine stromal cells, macrophages, liver and brain [31,41,47,61–64]. The BMP polyunsaturation coupled to its cone-shape structure and its negative charge are crucial for the dynamic of endolysosomal membranes, favoring membrane invagination and the formation of ILVs. This fusion process depends also on the interaction of BMP with the endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT)-associated protein ALIX via the exposed loop at its N-terminus exhibiting a BRO1 domain. Moreover, ALIX via its C-terminal proline-rich region binds the ESCRT-1 subunit protein, TSG101 [65]. Both proteins ALIX and TSG101 are also found in exosomes and play a role in EV biogenesis [50]. The role of BMP in EV biogenesis and secretion is thus suggested not only due to its biophysical properties [33] but also to its interaction with ALIX and its specific localization in ILVs. In addition to its role in cholesterol transport (developed below), negatively-charged BMP is considered as a stimulator of sphingolipid degradative enzymes directly for the acid sphingomyelinase or acid ceramidase, or indirectly by increasing the efficiency of their cofactors saposins [40,66]. Change in the fatty acid composition or content of BMP will alter the metabolic activity in the endolysosome compartment. Recent studies have highlighted the role of BMP for the maintenance of metabolic homeostasis and the importance of its physiological regulation. Fasting stimulates lysosomal biogenesis and BMP content [62] whereas high fat diet increases hepatic and circulating BMP concentrations [47]. All these active membrane exchanges and trafficking can be hijacked by

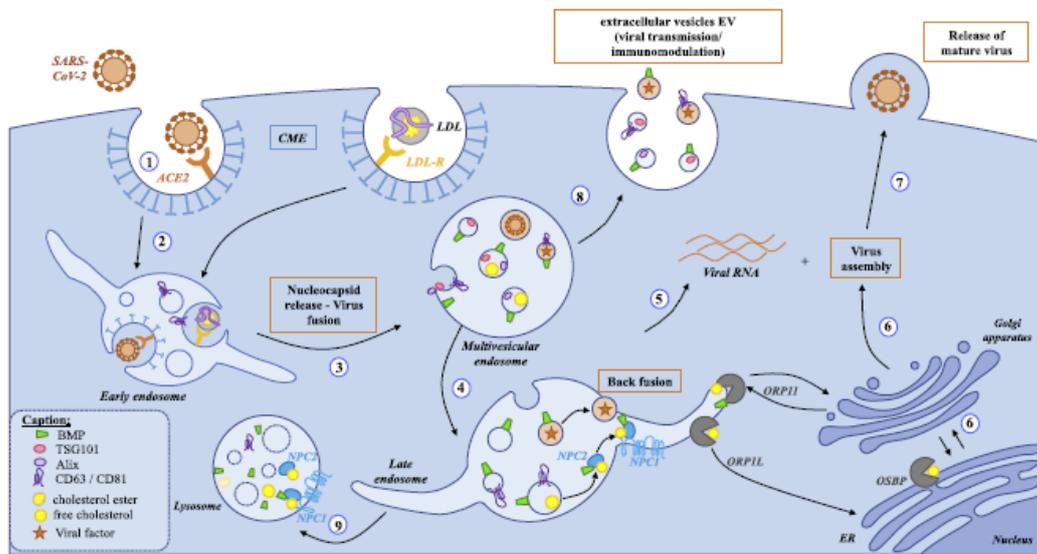


Fig. 2. Schema of the endocytic pathway involving the endolysosomal lipid BMP and putative relation to SARS-CoV-2 infection steps. (1) **binding step**: SARS-CoV-2 binds through its spike S protein to its receptor angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) located in lipid rafts on the host cell plasma membrane. (2) **internalization step**: then SARS-CoV-2 is internalized by clathrin-mediated endocytosis (CME) and undergoes **intracellular trafficking through the endocytic pathway**; (3) from early endosome and multivesicular endosome to (4) late endosome/lysosome. The same endocytic route is used by low density lipoproteins (LDL) for cholesterol entry into mammalian cells after binding to the LDL receptor. The virus uncoating and fusion step are strongly dependent of the acidic pH of the endolysosomal compartment enriched in BMP (green conical cylinder); enzymatic cleavage by cathepsin L is crucial for subsequent **release of the viral RNA genome** (5) into the host cytosol. (6) Newly made viral S protein and other membrane proteins enter the **secretory pathway** via the endoplasmic reticulum (ER) whereas viral RNA genome and nucleocapsid protein are assembled to form the previral particles into the lumen of the ERGIC (ER-Golgi intermediate compartment). (7) Then, **matured viruses** are released via transport from the trans-Golgi (TGN) network **to the cell surface**. (8) Virus factors can also **hijack the extracellular vesicle EV secretory pathway** to exit infected cells [48]. Recently, BMP (green conical cylinder) was considered as a new lipid signature of endosome-derived EVs characterized by the EV protein markers ESCRT protein TSG101, associated protein Alix, and the tetraspanins CD63 and CD81 [49,50]. The cholesterol transfer between NPC2 and membrane vesicles including between inner membranes of the LE/Lys compartment is favored by BMP [51]. This occurs through the direct interaction of BMP with a domain of NPC2 [52]. This region is also involved in the interaction between the soluble intraendolysosomal NPC2 and the transmembrane protein NPC1 in the limiting membrane of the LE/Lys. This highlights the importance of BMP in NPC2-dependent cholesterol binding at inner membranes of LE/Lys and in NPC2-dependent cholesterol transfer to the N-terminal domain of NPC1. NPC1 has been proposed to be involved in infectivity of SARS-CoV-2 [25]. ORP1L as well as OSBP are required at the replication organelle for viral infection by regulating cholesterol homeostasis [53,54]. We can speculate that ORP1L, by interacting with both BMP and cholesterol into late endosome, would be implicated in virus infection.

viruses.

2.4. Hijacking of ILVs and EVs by viruses and role of BMP

During VSV infection, the release of viral RNA in the cytosol depends of BMP [6], Alix [8], and other ESCRT proteins through a mechanism of back-fusion, i.e upon fusion of the ILV membrane with the limiting membrane of the LE [9]. First, the viral envelope undergoes fusion with the ILV membrane or directly with the LE membrane [5]. It is not known yet if SARS-CoV-2 is using a similar pathway for cell infection and the role of BMP in this context (Fig. 2). In addition, some viruses and viral particles can be released in exosomes. Interestingly in parallel to the classical exosome formation, ceramide produced after hydrolysis of sphingomyelin by neutral sphingomyelinase was shown to favor formation of exosomes containing cholesterol [67]. By hijacking the EV secretory pathway, the viruses can, not only exit infected cells, but EVs can also play a role in immune response by spreading viral and host cell components [48] (Fig. 2). The importance of this pathway for SARS-CoV-2 infection is not known yet as well as the role of BMP. Targeting the endolysosomal function that can be hijacked by the SARS-CoV-2 and particularly using drugs modifying transiently this compartment enriched in BMP has started to be evaluated [25]. But we have to keep in mind that targeting such important intracellular

trafficking could have deleterious effects on lipid metabolism. This is particularly important knowing the high percentage of patients with metabolic disorders among the SARS-CoV-2 infected patients presenting severe forms of COVID-19 [68].

3. Bis(monoacylglycerol)phosphate and cholesterol homeostasis

Cholesterol is a dynamic lipid that moves quickly between membranes of cell organelles. Cells have developed complex pathways to maintain cholesterol homeostasis, including vesicular and non-vesicular processes. Cholesterol traffic and distribution inside cells are mainly maintained by non-vesicular mechanisms [69]. Several families of proteins function as sterol transporters to maintain cholesterol homeostasis [70].

3.1. Cholesterol transporter proteins: focus on NPC and ORP

Among all cholesterol transport proteins, Niemann-Pick C1 and C2 proteins (NPC1, NPC2) cooperate to regulate the egress of low-density lipoprotein (LDL)-derived cholesterol out of late endosomes [52]. Other proteins like STARD3 (StAR related lipid transfer domain containing 3) [71], ORPs (OSBP (Oxysterol Binding proteins)-Related Proteins) [72] and Aster protein [73]

transport cholesterol between LE, PM, ER, Golgi and mitochondria.

Exit of LDL-derived cholesterol from LE/Lys requires a cooperation between NPC1 and NPC2. NPC1 is a multi-spanning transmembrane (TM) protein located in the limiting membrane of LE/Lys and NPC2 is a globular protein present in the lumen of LE/Lys. NPC1 presents 13 TM segments among which TMs 3–7 constitute the sterol-sensing domain (SSD), and 3 luminal domains: A also called the N-terminal domain (NTD), C and I. Both NTD and SSD domains bind cholesterol [51,74]. Based on mutagenesis, model membranes and atomistic simulations, a prevailing model of cholesterol transfer is currently proposed: cholesterol-carrying NPC2 would be recruited to the domain C of NPC1 and would deliver the bound cholesterol to the NTD through a “hydrophobic hand-off” mechanism [74,75] (Fig. 2). Another functional domain of NPC1 required for cholesterol export has been identified in the SSD as a high affinity binding site for U18666A [76], a cationic amphiphile compound that strongly inhibits LDL-derived cholesterol exit from lysosomes thereby inducing NPC phenotype [77] (Fig. 3A). Mutations in either NPC1 or NPC2 result in abnormal lipid storage, essentially cholesterol in LE/Lys, a cellular hallmark of Niemann-Pick C disease.

Oxysterol-Binding Protein (OSBP) and their associated proteins (ORP) constitute a family of lipid binding/transfer proteins in eukaryotes [85–87]. In mammals, 12 *Osbp* genes encode proteins of this family and variants of different sizes increase the final number of proteins to 16.

ORP proteins are mainly cytosolic proteins. However, most of them are associated with the membrane of an organelle. They are located at MCS implicating ER with other organelle limiting membrane, thanks to FFAT domain that binds the ER-resident vesicle-associated membrane protein (VAMP)-associated protein (VAP) [88,89]. ORPs are characterized by a unique binding domain to sterols (cholesterol as well as oxysterols), but also glycerophospholipids, particularly phosphatidylserine [90,91] and phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P) [78,92,93].

OSBP, the first oxysterol binding protein described, exchanges cholesterol with PI4P between ER and Golgi apparatus, by forming MCS and tethering ER to trans Golgi (TGN) membranes [78,79]. This phenomenon described as the OSBP cycle contributes to the

maintenance of a cholesterol gradient among secretory organelle membranes.

In the context of this review, endosomes have abundant contacts with ER, and some members of the ORP families are involved in these membrane contact sites, favoring cholesterol transport between those organelles [94,95]. Among them, ORP1L, ORP5 and ORP6, that are localized to LE membrane, mediate cholesterol transfer from LE to ER at MCS [82–84] (Fig. 3B).

3.2. BMP modulation of NPC and ORP activities

Several lines of evidence have established that BMP is required for an efficient cholesterol transport function of NPC proteins. The potential relationships between BMP and NPC proteins initially emerged from studies showing that BMP accumulates in liver and spleen of NPC patients and in NPC mice models [16,22]. A functional role of BMP in NPC-associated cholesterol defect has been first proposed by Kobayashi et al. [96], showing that internalization of anti-BMP antibody induced NPC phenotype in cultured BHK cells. Studies from Gruenberg team have further shown that increase of intracellular BMP, either by addition of exogenous BMP or drug-induced, reduced cholesterol storage disorder in fibroblasts of NPC patients and in liver of *npc1*^{-/-} mice [97,98]. In addition, treatment with U18666A that induced NPC phenotype was associated with an intracellular increase of BMP [97]. The authors therefore raised the hypothesis that BMP becomes limiting in the NPC disease upon excessive cholesterol overload. Whereas Gruenberg's studies have highlighted a functional crosstalk between BMP and NPC 1/2 proteins, it has been demonstrated that BMP regulates cholesterol transport through direct interaction with NPC2, independent of NPC1 [52]. Biochemical, structural and atomic scale studies demonstrated that BMP stimulated the extent and rate of cholesterol transfer by NPC2 through direct interaction at the hydrophobic knob domain on the surface of NPC2 [52,99]. Interestingly, this region is also involved in the direct interaction between the soluble protein NPC2 in the lumen and the transmembrane protein NPC1 in the limiting membrane of the LE/Lys and thus, suggests its role in the subsequent cholesterol “hand-off” mechanism [74]. This also highlights the importance of BMP not

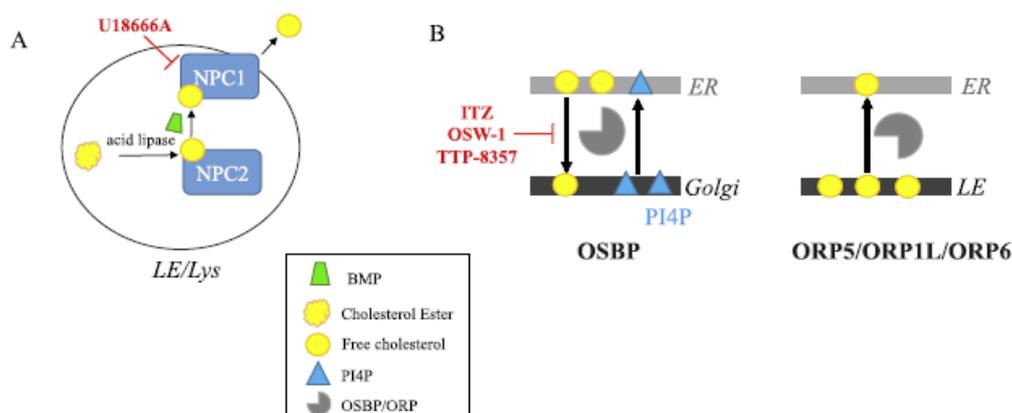


Fig. 3. Schematic intracellular lipid flows regulated by sterol transfer proteins and their inhibitors (indicated in red): A) cholesterol efflux from LE/Lys: the cationic amphiphilic drug U18666A binds to NPC1 and inhibits the LDL-derived cholesterol exit from lysosomes thereby inducing NPC phenotype [76,77]. BMP (green conical cylinder) favors the acid hydrolysis of LDL-derived cholesterol ester [22] and stimulates the rate of cholesterol transfer by NPC2 [52,51]. B) Cholesterol transfer at MCS between ER and Golgi/LE. OSBP exchanges cholesterol with PI4P between ER and trans Golgi (TGN) membranes [78,79]. Itraconazole (ITZ) and OSW-1 interact with OSBP and ORP4 disrupting OSBP lipid-shuttling function [80]. TTP-8307 inhibits directly the OSBP-dependent activities [81]. ORP1L, ORP5 and ORP6, localized to LE membrane, mediate cholesterol transfer from LE to ER [82–84] and could be implicated in virus replication [54].

only in cholesterol binding by NPC2 at the inner membranes of LE/Lys, but also in NPC2-dependent cholesterol transfer to the N-terminal domain (NTD) of NPC1 (Figs. 2 and 3A). The ability of NPC2 to bind to BMP may also represent a way to bring the cholesterol-rich and BMP-rich inner membranes of LE/Lys in proximity to the LE/Lys limiting membrane, but how the cholesterol will exit the compartment is still unknown.

Considering the putative involvement of NPC proteins in SARS-CoV infection and the interaction of BMP with these proteins, we raise the hypothesis that BMP could turn out to be a valuable target for therapeutic strategy against SARS-CoV including SARS-CoV-2.

Recently, we demonstrated that ORP11 localizes to LE and Golgi and modulates cholesterol egress from LE in macrophages [100]. Moreover, BMP favors the egress of cholesterol from LE via an ORP11-dependent mechanism, resulting in a reduced production of cytotoxic 7-oxysterols [100].

A member of the START protein family, STARD3, localized at the endosomal compartment, participates in the formation of MCS between ER to LE membranes. Cholesterol transfer from ER to LE occurred via STARD3 interaction with VAPs [71].

3.3. Role of NPC and ORP in virus infection

NPC1 has recently been identified as a key player for infection by Ebola virus (EBOV), an enveloped RNA virus from the filovirus family. First evidence came from mutagenesis studies revealing that cells mutated for NPC1, as well as fibroblasts isolated from NPC1 patients, were resistant to EBOV infection *in vitro* [101]. Using NPC1^{-/-} mouse models, it was further shown that NPC1 was required for replication and pathogenesis of EBOV *in vivo* [102]. By contrast, NPC2 mutants that exhibit NPC phenotype with cholesterol accumulation were not protected, suggesting that NPC1 requirement in EBOV infection was independent of cholesterol transport activity [101,102]. NPC1 binds to the cleaved form of EBOV glycoprotein GP1, thereby regulating membrane fusion and subsequent viral release into the cytoplasm of infected cells [75,103–105]. Of interest, U18666A and other cationic drugs inducing NPC phenotype were able to inhibit EBOV entry in a NPC1 dependent manner but independent of GP1 binding to NPC1 [26]. NPC1 and NPC2 proteins are also involved in HIV infection. HIV replication and release were significantly decreased in both NPC1 deficient cells and fibroblasts from NPC1 patients in association with cholesterol and HIV Gag protein accumulation in LE/Lys [106]. However, Coleman and colleagues reported that HIV virions released by cells lacking both NPC1 and NPC2 exhibit enhanced infectivity, probably due to their higher cholesterol content [107]. These observations suggest a rather complex mechanism in which NPC1 would favor HIV multiplication, although by controlling cholesterol transport, NPC1/NPC2 would render the viral particles less virulent. In contrast to Ebola virus, NPC requirement in HIV infection was shown to be related to the regulation of cholesterol transport out of LE/Lys [106,107].

To date, it is not known whether NPC1 is required for the entry of SARS-CoV. However, NPC1 positive compartments were shown to be an obligatory step for SARS-CoV intracellular development, probably to access to the high cathepsin activity necessary for the release of the viral nucleocapsid [108]. In a recent hypothesis paper, Ballout et al. proposed that NPC1 positive LE/Lys would also be mandatory for the successful infectivity of SARS-CoV-2 since it has an infectious life cycle similar to SARS-CoV. In addition, the authors highlight the potential role of NPC proteins for impairing SARS-CoV-2 entry and subsequent internalization and trafficking, since lipid rafts in which the ACE2 protein resides, are disrupted in NPC disorder [25]. The use of NPC1 inhibitors or NPC-disease mimetic drugs has been proposed as a potential relevant therapeutic strategy against SARS-CoV-2 [26]. Of interest, U18666A was previously

reported to inhibit type I feline coronavirus in relation with NPC1 dysfunction [109].

Virus replication occurs in the cytosol of host cells, using the ER, the Golgi apparatus and endosomal membranes as replication platforms at MCS. As sterol and phospholipids of infected cells are highly implicated in the formation of the replication organelle, recently, ORPs have been described to be implicated in viral replication process.

In 2009, the role of OSBP in proliferation of RNA viruses, Hepatitis C Virus (HCV), was pointed out [110]. OSBP interacts at the Golgi membrane with NS5A, a non-structural protein of HCV, involved in virus assembly, which is anchored to ER membrane via VAP-A. OSBP is required for both replication and egress of HCV particles [110]. OSBP lipid transfer property is essential for cholesterol delivery to the HCV replication organelle in exchange for PI4P [53], strongly implicated in viral replication [111]. Other RNA viruses including poliovirus, dengue, picornavirus, as well as Aichi virus require cholesterol supply by OSBP for replication organelle efficiency [112–114]. ORP4, the closest OSBP homolog, was implicated in HCV replication as a negative regulator via inhibition of NS5B activity, due to alteration of lipid homeostasis and formation of lipid droplet [115]. This mechanism requires a close collaboration between ORP4 and OSBP.

The formation of replication organelles requires the hijacking of cellular lipid homeostasis and is presently explored as a target for the development of antiviral compounds. Strating and coworkers identified Itraconazole (ITZ), an antifungal drug, as inhibitor for enterovirus replication, due to its interaction with OSBP and ORP4. ITZ targets OSBP and ORP4 at the replication organelle, disrupting OSBP lipid-shuttling function. Likewise, OSW-1, an antiproliferative natural compound, interacts specifically with OSBP and ORP4 [80]. The antiviral activity is due to inhibition of 25-hydroxycholesterol binding to OSBP and ORP4 [116]. TTP-8307, an enterovirus replication inhibitor, inhibits directly OSBP activity, through the PI4P-OSBP pathway. Other viruses, as picornavirus encephalomyocarditis virus and HCV, which activities are OSBP-dependent, are sensitive to TTP-8307. Very recently, OSBP was hypothesized as a potential target to SARS-CoV-2 infection [81] (Fig. 3B).

A study of flavivirus West Nile virus (WNV) showed that the silencing of ORP1L decreased the replication of WNV as well as other types of RNA viruses. ORP1L knockdown disturbed the movement of LE and contacts between LE and ER, inhibiting the transfer of cholesterol between these organelles [117]. This activity is implicated in adenovirus infection [54], ORP1L controlling the fusion and infection by the Ebola virus [118].

ORPs, due to their intracellular localization and lipid traffic properties, are implicated in the replication of many viruses, so we can postulate that they could be involved in SARS-CoV-2 infection. Especially, ORP11, via its interaction with BMP and cholesterol, could be hypothesized as a potential target of numerous viruses including SARS-CoV-2.

3.4. BMP regulation of viral infection via other cholesterol pools

Besides regulating LDL-derived cholesterol exit out of LE/Lys, BMP is involved in the distribution of LDL-derived cholesterol from LE/Lys to other cellular compartments. Using anti-BMP antibody that accumulated in LE in cultured macrophages, or a model of BMP accumulation, we showed that BMP was involved in cholesterol transport to PM and ER [23,119]. Of specific interest, we found that cholesterol distribution in PM was altered in anti-BMP treated macrophages, especially impairing HDL accessible pools [119]. Unpublished observations suggest that BMP regulates cholesterol distribution in lipid rafts. We also reported that BMP accumulation led to reduced expression of ABCG1 transporters and related

cholesterol efflux to HDL [23]. Noteworthy, it was reported that cholesterol content in lipid rafts would be determinant for SARS-CoV-2 interaction with the cellular receptor ACE2 [120]. One may therefore speculate that by regulating cholesterol-rich membrane domains, BMP could impact on SARS-CoV-2 entry in host cells.

Also of interest is our finding that BMP regulates oxysterol production, especially 7- and 25-hydroxycholesterol [100,121]. As a matter of fact, these oxysterols have been shown to exert antiviral activity against coronavirus and related virus like Ebola, Zika by decreasing virus entry or replication [122–124]. This raises the hypothesis of a role of BMP to favor this antiviral activity.

4. Conclusion

The unusual endosomal phospholipid BMP is crucial to maintain the endosomal lipid storage capacity and trafficking as well as the fine-tuning of cholesterol domains at the plasma membrane known to control receptor signaling and cholesterol efflux [21–23]. Thus, we speculated that BMP could influence SARS-CoV-2 infection in different ways: 1) by regulating cholesterol-rich membrane domains at the PM and thus, interfering with virus entry and subsequent internalization; 2) by controlling the lipid flows through the endocytic pathway and thus, interfering with viral trafficking and fusion events that are necessary for virus replication and maturation. By controlling lipid homeostasis in host cell, BMP appears as a “double face” partner of SARS-CoV-2 depending on its endosomal content: 1) in physiological conditions and within a normal concentration range of BMP in the LE/Lys, BMP will favor virus entry and infection and can be considered as a therapeutic target against COVID-19; 2) in pathological conditions and accumulation of BMP in the LE/Lys, the lipid will create deleterious conditions in the host endocytic pathway and thus, could impair virus infection. However, the enzymes involved in the *de novo* biosynthetic pathway of BMP are still unknown and little is known about its physiological regulation. Therefore, it is not possible yet to favor its putative antiviral activity against SARS-CoV-2 by genetic tools.

Since genetic NPC1 defect or drug-induced endosomal cholesterol accumulation were shown to inhibit Ebola virus and VSV infection [5,26], this can provide some useful clues for drug development against COVID-19 as recently checked: 1) reduced cholesterol content in plasma membrane to modify the lipid raft-dependent ACE2 and TMPRSS2 activities [2,125] and thus, perturb host cell docking and internalization of the virus [25,126]; 2) modification of the acidic pH in endolysosome to modify trafficking and viral particle fusion [20]; 3) increase of cholesterol and oxysterol content in endolysosome to impede viral fusion and subsequent replication [27]. However targeting the endolysosomal function that can be hijacked by the SARS-CoV-2 should be only transient and reversible to avoid side effects on lipid metabolism. This is particularly important knowing the high percentage of patients with metabolic disorders among the SARS-CoV-2 infected patients presenting severe forms of COVID-19 [68].

Funding

MR is supported by a PhD fellowship from the French Ministry of education. Financial supports were from INSERM; SFD (Société Francophone du Diabète_AE 2016) and VML (Vaincre les Maladies Lyso-somales_convention AO2018-6) to FHM.

Author contributions

CLC, FHM, and ID designed and wrote the manuscript; MR created the figures. All authors corrected and approved the final manuscript.

Declaration of competing interest

The authors declared no competing financial interest.

Acknowledgements

The authors apologize to all the researchers who cannot be cited due not only to space constraints, but also to the so fast release of new findings and literature on COVID-19.

References

- [1] N. Zhu, D. Zhang, W. Wang, X. Li, B. Yang, J. Song, X. Zhao, B. Huang, W. Shi, R. Lu, P. Niu, F. Zhan, X. Ma, D. Wang, W. Xu, G. Wu, G.F. Gao, W. Tan, China novel coronavirus Investigating and research team, A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019, *N. Engl. J. Med.* 382 (2020) 727–733, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>.
- [2] R. Yan, Y. Zhang, Y. Li, L. Xia, Y. Guo, Q. Zhou, Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2, *Science* 367 (2020) 1444–1448, <https://doi.org/10.1126/science.abb2762>.
- [3] S.L. Roth, G.R. Whittaker, Promotion of vesicular stomatitis virus fusion by the endosome-specific phospholipid bis(monoacylglycerol)phosphate (BMP), *FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett.* 585 (2011) 865–869.
- [4] L.E. Carpio, J. Villalain, Identification of the phospholipid binding regions of the envelope E protein of flaviviruses by molecular dynamics, *J. Biomol. Struct. Dyn.* (2019) 1–12, <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1697368>.
- [5] I. Le Blanc, P.P. Luyet, V. Pons, C. Ferguson, N. Emans, A. Petitot, N. Mayran, N. Demareux, J. Faure, R. Sadoul, R.G. Parton, J. Gruenberg, Endosome-to-cytosol transport of viral nucleocapsids, *Nat. Cell Biol.* 7 (2005) 653–664.
- [6] P.P. Luyet, T. Falguieres, V. Pons, A.K. Pattnaik, J. Gruenberg, The ESCRT-I subunit TSG101 controls endosome-to-cytosol release of viral RNA, *Traffic* 9 (2008) 2279–2290, <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00820.x>.
- [7] T. Falguieres, P.P. Luyet, J. Gruenberg, Molecular assemblies and membrane domains in multivesicular endosome dynamics, *Exp. Cell Res.* 315 (2009) 1567–1573.
- [8] C. Bissig, M. Lenoir, M.C. Velluz, I. Kufareva, R. Abagyan, M. Overduin, J. Gruenberg, Viral infection controlled by a calcium-dependent lipid-binding module in ALX, *Dev. Cell* 25 (2013) 364–373, <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.04.003>.
- [9] J. Gruenberg, Life in the lumen: the multivesicular endosome, *Traffic* 21 (2020) 76–93, <https://doi.org/10.1111/tra.12715>.
- [10] G. van Meer, D.R. Voelker, G.W. Feigenson, Membrane lipid: where they are and how they behave, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 112–124.
- [11] D. Lingwood, K. Simons, Lipid rafts as a membrane-organizing principle, *Science* 327 (2010) 46–50.
- [12] E. Sezgin, I. Levental, S. Mayor, C. Eggeling, The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18 (2017) 361–374, <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.16>.
- [13] M. Carquin, L. D'Auria, H. Pollet, E.R. Bongarzone, D. Tyteca, Recent progress on lipid lateral heterogeneity in plasma membranes: from rafts to sub-micrometric domains, *Prog. Lipid Res.* 62 (2016) 1–24, <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.12.004>.
- [14] K. Sobo, J. Chevallier, R.G. Parton, J. Gruenberg, F.G. van der Goot, Diversity of raft-like domains in late endosomes, *PLoS One* 2 (2007) e991.
- [15] C.C. Scott, F. Vacca, J. Gruenberg, Endosome maturation, transport and functions, *Semin. Cell Dev. Biol.* 31 (2014) 2–10, <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.03.034>.
- [16] F. Hullin-Matsuda, T. Taguchi, P. Greimel, T. Kobayashi, Lipid compartmentalization in the endosome system, *Semin. Cell Dev. Biol.* 31 (2014) 48–56, <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.04.010>.
- [17] T. Kobayashi, M.H. Beuchat, J. Chevallier, A. Makino, N. Mayran, J.M. Escola, C. Lebrand, P. Cosson, J. Gruenberg, Separation and characterization of late endosomal membrane domains, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 32157–32164.
- [18] K. Stadler, H.R. Ha, V. Ciminale, C. Spirli, G. Saletti, M. Schiavon, D. Bruttomesso, L. Bigler, F. Follath, A. Pettenazzo, A. Baritussio, Amiodarone alters late endosomes and inhibits SARS coronavirus infection at a post-endosomal level, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 39 (2008) 142–149, <https://doi.org/10.1165/rcmb.2007-02170C>.
- [19] E. Zaitseva, S.-T. Yang, K. Melikov, S. Pourmal, L.V. Chernomoridk, Dengue virus ensures its fusion in late endosomes using compartment-specific lipids, *PLoS Pathog.* 6 (2010), e1001131.
- [20] F. Carrière, S. Longhi, M. Record, The endosomal lipid bis(monoacylglycerol) phosphate as a potential key player in the mechanism of action of chloroquine against SARS-COV-2 and other enveloped viruses hijacking the endocytic pathway, *Biochimie* (2020), <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.05.013>.
- [21] T. Kobayashi, M.H. Beuchat, M. Lindsay, S. Frias, R.D. Palmiter, H. Sakuraba, R.G. Parton, J. Gruenberg, Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport, *Nat. Cell Biol.* 1 (1999) 113–118.
- [22] F. Hullin-Matsuda, C. Luquain-Costaz, J. Bouvier, I. Delton-Vandenbroucke,

- Bis(monoacylglycerol)phosphate, a peculiar phospholipid to control the fate of cholesterol: implications in pathology, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 81 (2009) 313–324.
- [23] C. Luquin-Costaz, E. Lefai, M. Arnal-Levron, D. Markina, S. Saka, V. Euthine, A. Makino, M. Guichardant, S. Yamashita, T. Kobayashi, M. Lagarde, P. Moulin, I. Delton-Vandenbroucke, Bis(monoacylglycerol)phosphate accumulation in macrophages induces intracellular cholesterol redistribution, attenuates liver-X receptor/ATP-binding cassette transporter A1/ATP-binding cassette transporter G1 pathway, and impairs cholesterol efflux, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33 (2013) 1803–1811, <https://doi.org/10.1161/atvbaha.113.301857>.
- [24] O. Ilnytska, M. Santana, N.-Y. Hsu, W.-L. Du, Y.-H. Chen, E.G. Viktorova, C. Belov, A. Brinker, J. Storch, C. Moore, J.L. Dixon, N. Altan-Bonnet, Enteroviruses harness the cellular endocytic machinery to remodel the host cell cholesterol landscape for effective viral replication, *Cell Host Microbe* 14 (2013) 281–293, <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.08.002>.
- [25] R.A. Ballout, D. Sviridov, M.L. Bukrinsky, A.T. Remaley, The lysosome: a potential junction between SARS-CoV-2 infectivity and Niemann-Pick disease type C, with therapeutic implications, *Faseb. J.* 34 (2020) 7253–7264, <https://doi.org/10.1096/fj.202000654R>.
- [26] C.J. Shoemaker, K.L. Schomberg, S.E. Delos, C. Scully, H. Pajouhesh, G.G. Olinger, L.M. Johansen, J.M. White, Multiple cationic amphiphiles induce a Niemann-Pick C phenotype and inhibit Ebola virus entry and infection, *PLoS One* 8 (2013), e56265, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056265>.
- [27] S.L. Sturley, T. Rajakumar, N. Hammond, K. Higaki, Z. Marka, S. Marka, A.B. Munkacsı, Potential COVID-19 therapeutics from a rare disease: weaponizing lipid dysregulation to combat viral infectivity, *J. Lipid Res.* 61 (2020) 972–982, <https://doi.org/10.1194/jlr.R120000851>.
- [28] A. Sauvat, F. Ciccocanti, F. Colavita, M. Di Rienzo, C. Castilletti, M.R. Capobianchi, O. Kepp, L. Zitvogel, G.M. Fimia, M. Piacentini, G. Kroemer, On-target versus off-target effects of drugs inhibiting the replication of SARS-CoV-2, *Cell Death Dis.* 11 (2020) 656, <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02842-x>.
- [29] H.H. Tan, A. Makino, K. Sudesh, P. Greimel, T. Kobayashi, Spectroscopic evidence for the unusual stereochemical configuration of an endosome-specific lipid, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 51 (2012) 533–535, <https://doi.org/10.1002/anie.201106470>.
- [30] C. Luquin, C. Laugier, M. Lagarde, J.F. Pageaux, High-performance liquid chromatography determination of bis(monoacylglycerol) phosphate and other lysophospholipids, *Anal. Biochem.* 296 (2001) 41–48.
- [31] C. Luquin, R. Dolmazon, J.M. Enderlin, C. Laugier, M. Lagarde, J.F. Pageaux, Bis(monoacylglycerol) phosphate in rat uterine stromal cells: structural characterization and specific esterification of docosahexaenoic acid, *Biochem. J.* 351 (2000) 795–804.
- [32] J. Chevallier, N. Sakai, F. Robert, T. Kobayashi, J. Gruenberg, S. Matile, Rapid access to synthetic lysobisphosphatidic acids using P(III) chemistry, *Org. Lett.* 2 (2000) 1859–1861.
- [33] H. Matsuo, J. Chevallier, N. Mayran, I. Le Blanc, C. Ferguson, J. Faure, N.S. Blanc, S. Matile, J. Dubochet, R. Sadoul, R.G. Parton, F. Vilbois, J. Gruenberg, Role of LBP1 and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization, *Science* 303 (2004) 531–534.
- [34] F. Hullin-Matsuda, K. Kawasaki, I. Delton-Vandenbroucke, Y. Xu, M. Nishijima, M. Lagarde, M. Schläme, T. Kobayashi, De novo biosynthesis of the late endosome lipid, bis(monoacylglycerol)phosphate, *J. Lipid Res.* 48 (2007) 1997–2008.
- [35] T. Thomburg, C. Miller, T. Thuren, L. King, M. Waite, Glycerol reorientation during the conversion of phosphatidylglycerol to bis(monoacylglycerol) phosphate in macrophage-like RAW 264.7 cells, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 6834–6840.
- [36] B. Amidon, J.D. Schmitt, T. Thuren, L. King, M. Waite, Biosynthetic conversion of phosphatidylglycerol to sn-1'-sn-1' bis(monoacylglycerol) phosphate in a macrophage-like cell line, *Biochemistry* 34 (1995) 5554–5560.
- [37] A. Jouti, J. Brotherus, O. Renkonen, R. Laine, W. Fischer, The stereochemical configuration of lysobisphosphatidic acid from rat liver, rabbit lung and pig lung, *Biochim. Biophys. Acta* 450 (1976) 206–209.
- [38] B.J. Poorthuis, K.Y. Hostetler, Studies on the subcellular localization and properties of bis(monoacylglycerol)phosphate biosynthesis in rat liver, *J. Biol. Chem.* 251 (1976) 4596–4602.
- [39] B.J. Poorthuis, K.Y. Hostetler, Conversion of diphosphatidylglycerol to bis(monoacylglycerol)phosphate by lysosomes, *J. Lipid Res.* 19 (1978) 309–315.
- [40] H. Schulze, T. Kolter, K. Sandhoff, Principles of lysosomal membrane degradation. Cellular topology and biochemistry of lysosomal lipid degradation, *Biochim. Biophys. Acta* 1793 (2009) 674–683.
- [41] N. Besson, F. Hullin-Matsuda, A. Makino, M. Murate, M. Lagarde, J.F. Pageaux, T. Kobayashi, I. Delton-Vandenbroucke, Selective incorporation of docosahexaenoic acid into lysobisphosphatidic acid in cultured THP-1 macrophages, *Lipids* 41 (2006) 189–196.
- [42] A. Abe, J.A. Shayman, The role of negatively charged lipids in lysosomal phospholipase A2 function, *JLR (J. Lipid Res.)* 50 (2009) 2027–2035, <https://doi.org/10.1194/jlr.M900008-JLR200>.
- [43] M. Ito, U. Tchoua, M. Okamoto, H. Tojo, Purification and properties of a phospholipase A2/lipase preferring phosphatidic acid, bis(monoacylglycerol) phosphate, and monoacylglycerol from rat testis, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 43674–43681.
- [44] M. Record, S. Amara, C. Subra, G. Jiang, G.D. Prestwich, F. Ferrato, F. Carrière, Bis(monoacylglycerol) phosphate interfacial properties and lipolysis by pancreatic lipase-related protein 2, an enzyme present in THP-1 human monocytes, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1811 (2011) 419–430.
- [45] M. Gilleron, M. Lepore, E. Layre, D. Cala-De Paeppe, N. Mebarek, J.A. Shayman, S. Canaan, L. Mori, F. Carrière, G. Puzo, G. De Libero, Lysosomal lipases PLRP2 and LPLA2 process mycobacterial multi-acylated lipids and generate T cell stimulatory antigens, *Cell Chem Biol* 23 (2016) 1147–1156, <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.07.021>.
- [46] M.A. Pribasniq, I. Mrak, G.F. Grabner, U. Taschler, O. Knittelfelder, B. Scherz, T.O. Eichmann, C. Heier, L. Grumet, J. Kowaluk, M. Romauch, S. Holler, F. Anderl, H. Wolinski, A. Lass, R. Breinbauer, G. Marsche, J. Mark Brown, R. Zimmermann, Alpha/beta hydrolase domain-containing 6 (ABHD6) degrades the late endosomal/lysosomal lipid bis(monoacylglycerol)phosphate, *J. Biol. Chem.* (2015), <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.669168>.
- [47] G.F. Grabner, N. Fawzy, M.A. Pribasniq, M. Trieb, U. Taschler, M. Holzer, M. Schweiger, H. Wolinski, D. Kolb, A. Horvath, R. Breinbauer, T. Rüllicke, R. Rabl, A. Lass, V. Stadlbauer, B. Hutter-Paier, R.E. Stauber, P. Fickert, R. Zechner, G. Marsche, T.O. Eichmann, R. Zimmermann, Metabolic disease and ABHD6 alter the circulating bis(monoacylglycerol)phosphate profile in mice and humans, *JLR (J. Lipid Res.)* 60 (2019) 1020–1031, <https://doi.org/10.1194/jlr.M093351>.
- [48] L. Urbanelli, S. Buratta, B. Tancini, K. Sagini, F. Delo, S. Porcellati, C. Emiliani, The role of extracellular vesicles in viral infection and transmission, *Vaccines* (2019) 7, <https://doi.org/10.3390/vaccines7030102>.
- [49] M. Rabia, V. Leuzy, C. Soulage, A. Durand, B. Foumaux, E. Erzuriz-Cerda, R. Köffel, A. Draeger, P. Colosetti, A. Jalabert, M. Di Filippo, A. Villard-Garon, C. Bergerot, C. Luquin-Costaz, P. Moulin, S. Rome, I. Delton, F. Hullin-Matsuda, Bis(monoacylglycerol)phosphate, a new lipid signature of endosome-derived extracellular vesicles, *Biochimie* 178 (2020) 26–38, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.07.005>.
- [50] G. van Niel, G. D'Angelo, G. Raposo, Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19 (2018) 213–228, <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>.
- [51] J. Storch, Z. Xu, Niemann-Pick C2 (NPC2) and intracellular cholesterol trafficking, *Biochim. Biophys. Acta* 1791 (2009) 671–678, <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.02.001>.
- [52] L.A. McCauliff, A. Langan, R. Li, O. Ilnytska, D. Bose, M. Waghalter, K. Lai, P.C. Kahn, J. Storch, Intracellular cholesterol trafficking is dependent upon NPC2 interaction with lysobisphosphatidic acid, *Elife* 8 (2019), <https://doi.org/10.7554/eLife.50832>.
- [53] H. Wang, J.W. Perry, A.S. Lauring, P. Neddermann, R. De Francesco, A.W. Tai, Oxyster-binding protein is a phosphatidylinositol 4-kinase effector required for HCV replication membrane integrity and cholesterol trafficking, *Gastroenterology* 146 (2014) 1373–1385, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.02.002>, e1–11.
- [54] N.L. Cianciola, S. Chung, D. Manor, C.R. Carlin, Adenovirus modulates toll-like receptor 4 signaling by reprogramming ORP1L-VAP protein contacts for cholesterol transport from endosomes to the endoplasmic reticulum, *J. Virol* 91 (2017), <https://doi.org/10.1128/JVI.01904-16>.
- [55] M. Nishihara, H. Morii, Y. Koga, Bis(monoacylglycerol)phosphate in alkaliphilic bacteria, *J. Biochem. (Tokyo)* 92 (1982) 1469–1479.
- [56] J.M. Rodríguez-Paris, K.V. Nolk, T.L. Steck, Characterization of lysosomes isolated from *Dictyostelium discoideum* by magnetic fractionation, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 9110–9116.
- [57] P.J. Melkle, S. Duplock, D. Blacklock, P.D. Whitfield, G. Macintosh, J.J. Hopwood, M. Fuller, Effect of lysosomal storage on bis(monoacylglycerol) phosphate, *Biochem. J.* 411 (2008) 71–78.
- [58] H. Sawada, K. Takami, S. Asahi, A toxicogenomic approach to drug-induced phospholipidosis: analysis of its induction mechanism and establishment of a novel in vitro screening system, *Toxicol. Sci.* 83 (2005) 282–292, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh264>.
- [59] E.A. Tengstrand, G.T. Miwa, F.Y. Hsieh, Bis(monoacylglycerol)phosphate as a non-invasive biomarker to monitor the onset and time-course of phospholipidosis with drug-induced toxicities, *Expert Opin. Drug Metabol. Toxicol.* 6 (2010) 555–570, <https://doi.org/10.1517/17425251003601961>.
- [60] N. Liu, E.A. Tengstrand, L. Chourb, F.Y. Hsieh, Di-22:6-bis(monoacylglycerol) phosphate: a clinical biomarker of drug-induced phospholipidosis for drug development and safety assessment, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 279 (2014) 467–476, <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.06.014>.
- [61] J. Bouvier, K.A. Zemska Berry, F. Hullin-Matsuda, A. Makino, S. Michaud, A. Geloën, R.C. Murphy, T. Kobayashi, M. Lagarde, I. Delton-Vandenbroucke, Selective decrease of bis(monoacylglycerol)phosphate content in macrophages by high supplementation with docosahexaenoic acid, *J. Lipid Res.* 50 (2009) 243–255.
- [62] G.F. Grabner, N. Fawzy, R. Schreiber, L.M. Pusch, D. Bulfon, H. Koefeler, T.O. Eichmann, A. Lass, M. Schweiger, G. Marsche, S. Schoiswohl, U. Taschler, R. Zimmermann, Metabolic regulation of the lysosomal cofactor bis(monoacylglycerol)phosphate in mice, *J. Lipid Res.* (2020), <https://doi.org/10.1194/jlr.RA119000516>.
- [63] Z. Akgoc, S. Iosim, T.N. Seyfried, Bis(monoacylglycerol)phosphate as a macrophage enriched phospholipid, *Lipids* 50 (2015) 907–912, <https://doi.org/10.1007/s11745-015-4045-5>.
- [64] Z. Akgoc, M. Sena-Esteves, D.R. Martin, X. Han, A. d'Azzo, T.N. Seyfried, Bis(monoacylglycerol)phosphate: a secondary storage lipid in the

- gangliosidoses, *J. Lipid Res.* 56 (2015) 1006–1013, <https://doi.org/10.1194/jlr.M057851>.
- [65] C. Bissig, J. Gruenberg, AUX and the multivesicular endosome: AUX in Wonderland, *Trends Cell Biol.* 24 (2014) 19–25, <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.10.009>.
- [66] H. Schulze, K. Sandhoff, Sphingolipids and lysosomal pathologies, *Biochim. Biophys. Acta* 1841 (2014) 799–810, <https://doi.org/10.1016/j.bbaplp.2013.10.015>.
- [67] K. Trajkovic, C. Hsu, S. Chiantia, L. Rajendran, D. Wenzel, F. Wieland, P. Schwille, B. Brugger, M. Simons, Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes, *Science* 319 (2008) 1244–1247, <https://doi.org/10.1126/science.1153124>.
- [68] I. Dugaill, E.-Z. Amri, N. Vitale, High prevalence for obesity in severe COVID-19: possible links and perspectives towards patient stratification, *Biochimie* (2020), <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.07.001>.
- [69] D.B. Jaea, F.R. Maxfield, Cholesterol trafficking and distribution, *Essays Biochem.* 57 (2015) 43–55, <https://doi.org/10.1042/bse0570043>.
- [70] J. Luo, L.-Y. Jiang, H. Yang, B.-L. Song, Intracellular cholesterol transport by sterol transfer proteins at membrane contact sites, *Trends Biochem. Sci.* 44 (2019) 273–292, <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.10.001>.
- [71] L.P. Wilhelm, C. Wendling, B. Védie, T. Kobayashi, M.-P. Chenard, C. Tomasetto, G. Drin, F. Alpy, STARD3 mediates endoplasmic reticulum-to-endosome cholesterol transport at membrane contact sites, *EMBO J.* 36 (2017) 1412–1433, <https://doi.org/10.15252/embj.201695917>.
- [72] V.M. Olkkonen, S. Li, Oxysterol-binding proteins: sterol and phosphoinositide sensors coordinating transport, signaling and metabolism, *Prog. Lipid Res.* 52 (2013) 529–538, <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.06.004>.
- [73] J. Sandhu, S. Li, L. Fairall, S.G. Pfisterer, J.E. Gumett, X. Xiao, T.A. Weston, D. Vashi, A. Ferrari, J.L. Orozco, C.L. Hartman, D. Strugatsky, S.D. Lee, C. He, C. Hong, H. Jiang, L.A. Bentiola, A.T. Gatta, T.P. Levine, A. Femg, R. Lee, D.A. Ford, S.G. Young, E. Ikonen, J.W.R. Schwabe, P. Tontonoz, Aster proteins facilitate nonvesicular plasma membrane to ER cholesterol transport in mammalian cells, *Cell* 175 (2018) 514–529, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.033>, e20.
- [74] S.R. Pfeffer, NPC intracellular cholesterol transporter 1 (NPC1)-mediated cholesterol export from lysosomes, *J. Biol. Chem.* 294 (2019) 1706–1709, <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.004165>.
- [75] X. Gong, H. Qian, X. Zhou, J. Wu, T. Wan, P. Cao, W. Huang, X. Zhao, X. Wang, P. Wang, Y. Shi, G.F. Gao, Q. Zhou, N. Yan, Structural insights into the Niemann-pick C1 (NPC1)-mediated cholesterol transfer and Ebola infection, *Cell* 165 (2016) 1467–1478, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.022>.
- [76] F. Liu, Q. Jiang, L. Abi-Mosleh, A. Das, J.K. De Brabander, J.L. Goldstein, M.S. Brown, Identification of NPC1 as the target of U18666A, an inhibitor of lysosomal cholesterol export and Ebola infection, *Elife* 4 (2015), <https://doi.org/10.7554/eLife.12177>.
- [77] L. Lisum, J.R. Faust, The intracellular transport of low density lipoprotein-derived cholesterol is inhibited in Chinese hamster ovary cells cultured with 3-beta-2-(diethylamino)ethoxyandrost-5-en-17-one, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 11796–11806.
- [78] B. Antony, J. Bigay, B. Mesmin, The oxysterol-binding protein cycle: burning off PI(4)P to transport cholesterol, *Annu. Rev. Biochem.* 87 (2018) 809–837, <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044924>.
- [79] B. Mesmin, J. Bigay, J. Moser von Filseck, S. Lacas-Gervais, G. Drin, B. Antony, A four-step cycle driven by PI(4)P hydrolysis directs sterol/PI(4)P exchange by the ER-Golgi tether OSBP, *Cell* 155 (2013) 830–843, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.056>.
- [80] J.R.P.M. Strating, L. van der Linden, L. Albulescu, J. Bigay, M. Arita, L. Delang, P. Leyssen, H.M. van der Schaar, K.H.W. Lanke, H.J. Thibaut, R. Ulferts, G. Drin, N. Schlinck, R.W. Wubbolts, N. Sever, S.A. Head, J.O. Liu, P.A. Beachy, M.A. De Matteis, M.D. Shair, V.M. Olkkonen, J. Neyts, F.J.M. van Kuppeveld, Itraconazole inhibits enterovirus replication by targeting the oxysterol-binding protein, *Cell Rep.* 10 (2015) 600–615, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.12.054>.
- [81] S. Shahmohamadnejad, S.F. Nabavi, S. Habtemariam, K. Sarkar, P.C. Sil, R. Dowran, S.M. Nabavi, May we target double-membrane vesicles and oxysterol-binding protein to combat SARS-CoV-2 infection? *Cell Biol. Int.* (2020) <https://doi.org/10.1002/cbin.11400>.
- [82] K. Zhao, N.D. Ridgway, Oxysterol-binding protein-related protein 1L regulates cholesterol egress from the endo-lysosomal system, *Cell Rep.* 19 (2017) 1807–1818, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.028>.
- [83] X. Du, J. Kumar, C. Ferguson, T.A. Schulz, Y.S. Ong, W. Hong, W.A. Prinz, R.G. Parton, A.J. Brown, H. Yang, A role for oxysterol-binding protein-related protein 5 in endosomal cholesterol trafficking, *J. Cell Biol.* 192 (2011) 121–135, <https://doi.org/10.1083/jcb.201004142>.
- [84] M. Ouimet, E.J. Hennessy, C. van Solingen, G.J. Koelwyn, M.A. Hussein, B. Ramkhalawon, K.J. Rayner, R.E. Temel, L. Perisic, U. Hedlin, L. Maegdefessel, M.J. Garabedian, L.M. Holdt, D. Teupser, K.J. Moore, mRNA targeting of oxysterol-binding protein-like 6 regulates cholesterol trafficking and efflux, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 36 (2016) 942–951, <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.307282>.
- [85] V.M. Olkkonen, Macrophage oxysterols and their binding proteins: roles in atherosclerosis, *Curr. Opin. Lipidol.* 23 (2012) 462–470, <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e328356dba0>.
- [86] V.M. Olkkonen, O. Béaslas, E. Nissilä, Oxysterols and their cellular effectors, *Biomolecules* 2 (2012) 76–103, <https://doi.org/10.3390/biom2010076>.
- [87] A. Pietrangelo, N.D. Ridgway, Bridging the molecular and biological functions of the oxysterol-binding protein family, *Cell. Mol. Life Sci.* 75 (2018) 3079–3098, <https://doi.org/10.1007/s00108-018-2795-y>.
- [88] H. Kentala, M. Weber-Boyvatt, V.M. Olkkonen, OSBP-related protein family: mediators of lipid transport and signaling at membrane contact sites, *Int Rev Cell Mol Biol.* 321 (2016) 299–340, <https://doi.org/10.1016/bs.icmb.2015.09.006>.
- [89] V.M. Olkkonen, OSBP-related protein family in lipid transport over membrane contact sites, *Lipid Insights* 8 (2015) 1–9, <https://doi.org/10.4137/LPI.S31726>.
- [90] K. Maeda, K. Anand, A. Chiapparino, A. Kumar, M. Poletto, M. Kaksonen, A.C. Gavin, Interactome map uncovers phosphatidyserine transport by oxysterol-binding proteins, *Nature* 501 (2013) 257–261, <https://doi.org/10.1038/nature12430>.
- [91] J. Chung, F. Torta, K. Masai, L. Lucast, H. Czaplá, L.B. Tanner, P. Narayanaswamy, M.R. Wenk, F. Nakatsu, P. De Camilli, INTRACELLULAR TRANSPORT, PMP/phosphatidylserine countertransport at ORP5- and ORP8-mediated ER-plasma membrane contacts, *Science* 349 (2015) 428–432, <https://doi.org/10.1126/science.1261370>.
- [92] J. Tong, H. Yang, H. Yang, S.H. Eom, Y.J. Im, Structure of Osh 3 reveals a conserved mode of phosphoinositide binding in oxysterol-binding proteins, *Structure* 21 (2013) 1203–1213, <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.05.007>.
- [93] J. Moser von Filseck, A. Čopić, V. Delbosse, S. Vanni, C.I. Jackson, W. Bourguet, G. Drin, INTRACELLULAR TRANSPORT, Phosphatidylserine transport by ORP/Osh proteins is driven by phosphatidylinositol 4-phosphate, *Science* 349 (2015) 432–436, <https://doi.org/10.1126/science.1261346>.
- [94] J.R. Friedman, J.R. Dibenedetto, M. West, A.A. Rowland, G.K. Voeltz, Endoplasmic reticulum-endosome contact increases as endosomes traffic and mature, *Mol. Biol. Cell* 24 (2013) 1030–1040, <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-10-0733>.
- [95] C. Raiborg, E.M. Wenzel, H. Stenmark, ER-endosome contact sites: molecular compositions and functions, *EMBO J.* 34 (2015) 1848–1858, <https://doi.org/10.15252/embj.201591481>.
- [96] T. Kobayashi, M.H. Beuchat, M. Lindsay, S. Frias, R.D. Palmer, H. Sakuraba, R.G. Parton, J. Gruenberg, Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport, *Nat. Cell Biol.* 1 (1999) 113–118, <https://doi.org/10.1038/10084>.
- [97] J. Chevallier, Z. Chamoun, G. Jiang, G. Prestwich, N. Sakai, S. Matile, R.G. Parton, J. Gruenberg, lysobisphosphatidic acid controls endosomal cholesterol levels, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 27871–27880, <https://doi.org/10.1074/jbc.M801463200>.
- [98] D. Moreau, F. Vacca, S. Vossio, C. Scott, A. Colaco, J. Paz Montoya, C. Ferguson, M. Damme, M. Moniatte, R.G. Parton, F.M. Platt, J. Gruenberg, Drug-induced increase in lysobisphosphatidic acid reduces the cholesterol overload in Niemann-Pick type C cells and mice, *EMBO Rep.* 20 (2019), e47055, <https://doi.org/10.15252/embr.201847055>.
- [99] G. Enkavi, H. Mikkiläinen, B. Güngör, E. Ikonen, I. Vattulainen, Concerted regulation of npc2 binding to endosomal/lysosomal membranes by bis(monoacylglycerol)phosphate and sphingomyelin, *PLoS Comput. Biol.* 13 (2017), e1005831, <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005831>.
- [100] M. Amal-Levron, Y. Chen, P. Greimel, F. Calevro, K. Gaget, F. Riols, A. Batut, J. Bertrand-Michel, F. Hullin-Matsuda, V.M. Olkkonen, I. Delton, C. Luquin-Costaz, Bis(monoacylglycerol)phosphate regulates oxysterol binding protein-related protein 11 dependent sterol trafficking, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1864 (2019) 1247–1257, <https://doi.org/10.1016/j.bbaplp.2019.05.011>.
- [101] J.E. Carette, M. Raaben, A.C. Wong, A.S. Herbert, G. Obernosterer, N. Mulherkar, A.I. Kuehne, P.J. Kranzusch, A.M. Griffin, G. Ruthel, P. Dal Cin, J.M. Dye, S.P. Whelan, K. Chandran, T.R. Brummelkamp, Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1, *Nature* 477 (2011) 340–343, <https://doi.org/10.1038/nature10348>.
- [102] A.S. Herbert, C. Davidson, A.I. Kuehne, R. Bakken, S.Z. Braigen, K.E. Gunn, S.P. Whelan, T.R. Brummelkamp, N.A. Twenhafel, K. Chandran, S.U. Walkley, J.M. Dye, Niemann-pick C1 is essential for ebolavirus replication and pathogenesis in vivo, *mBio* 6 (2015), <https://doi.org/10.1128/mBio.00565-15>, e00565-00515.
- [103] M. Côté, J. Misasi, T. Ren, A. Bruchez, K. Lee, C.M. Filone, L. Hensley, Q. Li, D. Ory, K. Chandran, J. Cunningham, Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection, *Nature* 477 (2011) 344–348, <https://doi.org/10.1038/nature10380>.
- [104] E.H. Miller, G. Obemosterer, M. Raaben, A.S. Herbert, M.S. Deffieu, A. Krishnan, E. Ndungu, R.G. Sandesara, J.E. Carette, A.I. Kuehne, G. Ruthel, S.R. Pfeffer, J.M. Dye, S.P. Whelan, T.R. Brummelkamp, K. Chandran, Ebola virus entry requires the host-programmed recognition of an intracellular receptor, *EMBO J.* 31 (2012) 1947–1960, <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.53>.
- [105] H. Wang, Y. Shi, J. Song, J. Qi, G. Lu, J. Yan, G.F. Gao, Ebola viral glycoprotein bound to its endosomal receptor niemann-pick C1, *Cell* 164 (2016) 258–268, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.044>.
- [106] Y. Tang, I.C. Leao, E.M. Coleman, R.S. Broughton, J.E.K. Hildreth, Deficiency of niemann-pick type C-1 protein impairs release of human immunodeficiency virus type 1 and results in Gag accumulation in late endosomal/lysosomal compartments, *J. Virol.* 83 (2009) 7982–7995, <https://doi.org/10.1128/JVI.00259-09>.
- [107] E.M. Coleman, T.N. Walker, J.E.K. Hildreth, Loss of Niemann Pick type C

- proteins 1 and 2 greatly enhances HIV infectivity and is associated with accumulation of HIV Gag and cholesterol in late endosomes/lysosomes, *Virology* 9 (2012) 31, <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-31>.
- [108] R.M. Mingo, J.A. Simmons, C.J. Shoemaker, E.A. Nelson, K.L. Schornberg, R.S. D'Souza, J.E. Casanova, J.M. White, Ebola virus and severe acute respiratory syndrome coronavirus display late cell entry kinetics: evidence that transport to NPC1+ endolysosomes is a rate-defining step, *J. Virol.* 89 (2015) 2931–2943, <https://doi.org/10.1128/JVI03398-14>.
- [109] T. Takano, M. Endoh, H. Fukatsu, H. Sakurada, T. Doki, T. Hohdatsu, The cholesterol transport inhibitor U18666A inhibits type I feline coronavirus infection, *Antivir. Res.* 145 (2017) 96–102, <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.07.022>.
- [110] Y. Amako, A. Sarkeshik, H. Hotta, J. Yates, A. Siddiqui, Role of oxysterol binding protein in hepatitis C virus infection, *J. Virol.* 83 (2009) 9237–9246, <https://doi.org/10.1128/JVI00958-09>.
- [111] H. Wang, A.W. Tai, Nir 2 is an effector of VAPs necessary for efficient hepatitis C virus replication and phosphatidylinositol 4-phosphate enrichment at the viral replication organelle, *J. Virol.* 93 (2019), <https://doi.org/10.1128/JVI.00742-19>.
- [112] M. Arita, Phosphatidylinositol-4 kinase III beta and oxysterol-binding protein accumulate unesterified cholesterol on poliovirus-induced membrane structure, *Microbiol. Immunol.* 58 (2014) 239–256, <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12144>.
- [113] F. Meutiawati, B. Bezemer, J.R.P.M. Strating, G.J. Overheul, E. Žusinaite, F.J.M. van Kuppeveld, K.W.R. van Cleef, R.P. van Rij, Posaconazole inhibits dengue virus replication by targeting oxysterol-binding protein, *Antivir. Res.* 157 (2018) 68–79, <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.06.017>.
- [114] K. Ishikawa-Sasaki, S. Nagashima, K. Taniguchi, J. Sasaki, Model of OSBP-mediated cholesterol supply to Aichi virus RNA replication sites involving protein-protein interactions among viral proteins, ACBD3, OSBP, VAP-A/B, and SAC1, *J. Virol.* 92 (2018), <https://doi.org/10.1128/JVI.01952-17>.
- [115] I.-W. Park, J. Ndjomou, Y. Wen, Z. Liu, N.D. Ridgway, C.C. Kao, J.J. He, Inhibition of HCV replication by oxysterol-binding protein-related protein 4 (ORP4) through interaction with HCV NS5B and alteration of lipid droplet formation, *PLoS One* 8 (2013), e75648, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075648>.
- [116] B.L. Roberts, Z.C. Severance, R.C. Bensen, A.T. Le, N.R. Kothapalli, J.L. Nuñez, H. Ma, S. Wu, S.J. Standke, Z. Yang, W.J. Reddig, E.L. Blewett, A.W.G. Burgett, Transient compound treatment induces a multigenerational reduction of oxysterol-binding protein (OSBP) levels and prophylactic antiviral activity, *ACS Chem. Biol.* 14 (2019) 276–287, <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00984>.
- [117] S.C. Courtney, H. Di, B.M. Stockman, H. Liu, S.V. Scherbik, M.A. Brinton, Identification of novel host cell binding partners of Oas1b, the protein conferring resistance to flavivirus-induced disease in mice, *J. Virol.* 86 (2012) 7953–7963, <https://doi.org/10.1128/JVI00333-12>.
- [118] R. van der Kant, A. Fish, L. Janssen, H. Janssen, S. Krom, N. Ho, T. Brummelkamp, J. Carette, N. Rocha, J. Neeffjes, Late endosomal transport and tethering are coupled processes controlled by RILP and the cholesterol sensor ORP1L, *J. Cell Sci.* 126 (2013) 3462–3474, <https://doi.org/10.1242/jcs.129270>.
- [119] I. Delton-Vandenbroucke, J. Bouvier, A. Makino, N. Besson, J.F. Pageaux, M. Lagarde, T. Kobayashi, Anti-bis(monoacylglycerol)phosphate antibody accumulates acetylated LDL-derived cholesterol in cultured macrophages, *J. Lipid Res.* 48 (2007) 543–552.
- [120] J. Glende, C. Schwegmann-Wessels, M. Al-Falah, S. Pfeifferle, X. Qu, H. Deng, C. Drosten, H.Y. Naim, G. Herrler, Importance of cholesterol-rich membrane microdomains in the interaction of the S protein of SARS-coronavirus with the cellular receptor angiotensin-converting enzyme 2, *Virology* 381 (2008) 215–221, <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.08.026>.
- [121] M. Arnal-Levron, Y. Chen, I. Delton-Vandenbroucke, C. Luquain-Costaz, Bis(monoacylglycerol)phosphate reduces oxysterol formation and apoptosis in macrophages exposed to oxidized LDL, *Biochem. Pharmacol.* 86 (2013) 115–121, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.03.017>.
- [122] S.-Y. Liu, R. Aliyari, K. Chikere, G. Li, M.D. Marsden, J.K. Smith, O. Pernet, H. Guo, R. Nusbaum, J.A. Zack, A.N. Freiberg, L. Su, B. Lee, G. Cheng, Interferon-inducible cholesterol-25-hydroxylase broadly inhibits viral entry by production of 25-hydroxycholesterol, *Immunity* 38 (2013) 92–105, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.11.005>.
- [123] K.A. Willard, C.L. Elling, S.L. Stice, M.A. Brindley, The oxysterol 7-ketocholesterol reduces Zika virus titers in vero cells and human neurons, *Viruses* 11 (2018), <https://doi.org/10.3390/v11010020>.
- [124] Y. Zhang, Z. Song, M. Wang, M. Lan, K. Zhang, P. Jiang, Y. Li, J. Bai, X. Wang, Cholesterol 25-hydroxylase negatively regulates porcine intestinal coronavirus replication by the production of 25-hydroxycholesterol, *Vet. Microbiol.* 231 (2019) 129–138, <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.03.004>.
- [125] M. Hoffmann, H. Kleine-Weber, S. Schroeder, N. Krüger, T. Herrler, S. Erichsen, T.S. Schiergens, G. Hemler, N.-H. Wu, A. Nitsche, M.A. Müller, C. Drosten, S. Pöhlmann, SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor, *Cell* 181 (2020) 271–280, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>, e8.
- [126] D. Radenkovic, S. Chawla, M. Pirro, A. Sahebkar, M. Banach, Cholesterol in relation to COVID-19: should we care about it? *J. Clin. Med.* 9 (2020) <https://doi.org/10.3390/jcm9061909>.

Annexe 3 :

Tableau 60 : liste des abréviations des acides gras présente dans les espèces moléculaires du BMP

Abréviation acide gras	Nom	Nombre de carbone et double liaison
A	acide arachidonique	C20:4 n-6
D	acide docosahénoïque	C22:6 n-3
DPA	acide docosapenténoïque	C22:5 n-3/6
DTA	acide docosatetraénoïque	C22:4 n-6
EE	acide eicosadiénoïque	C20:2 n-6
ETA	acide eicosatriénoïque	C20:3 :-6/9
L	acide linoléique	C18:2n-6
O	acide oléique	C18:1 n-9
P	acide palmitique	C16:0
Pa	acide palmitoléique	C16:1 n-7
S	acide stéarique	C18:0

Annexe 4 :

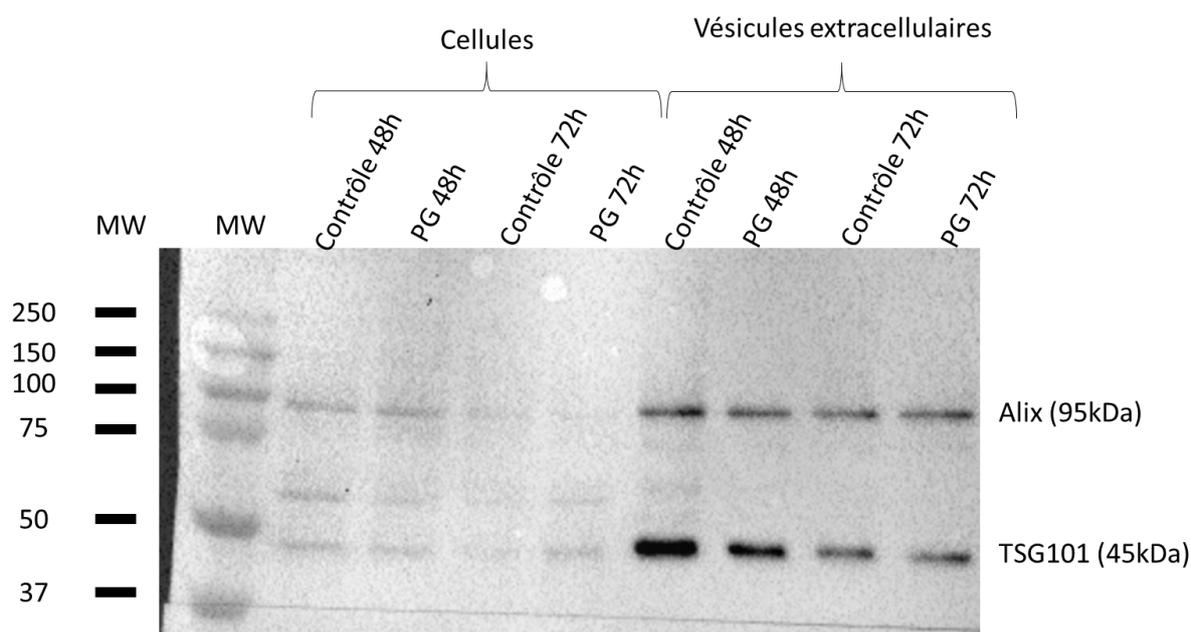


Figure 102 : caractérisation de la présence d'exosomes par western blot, marqueur utilisé ALIX et TSG101, western blot entier des figure 60 et 77.

Annexe5 :

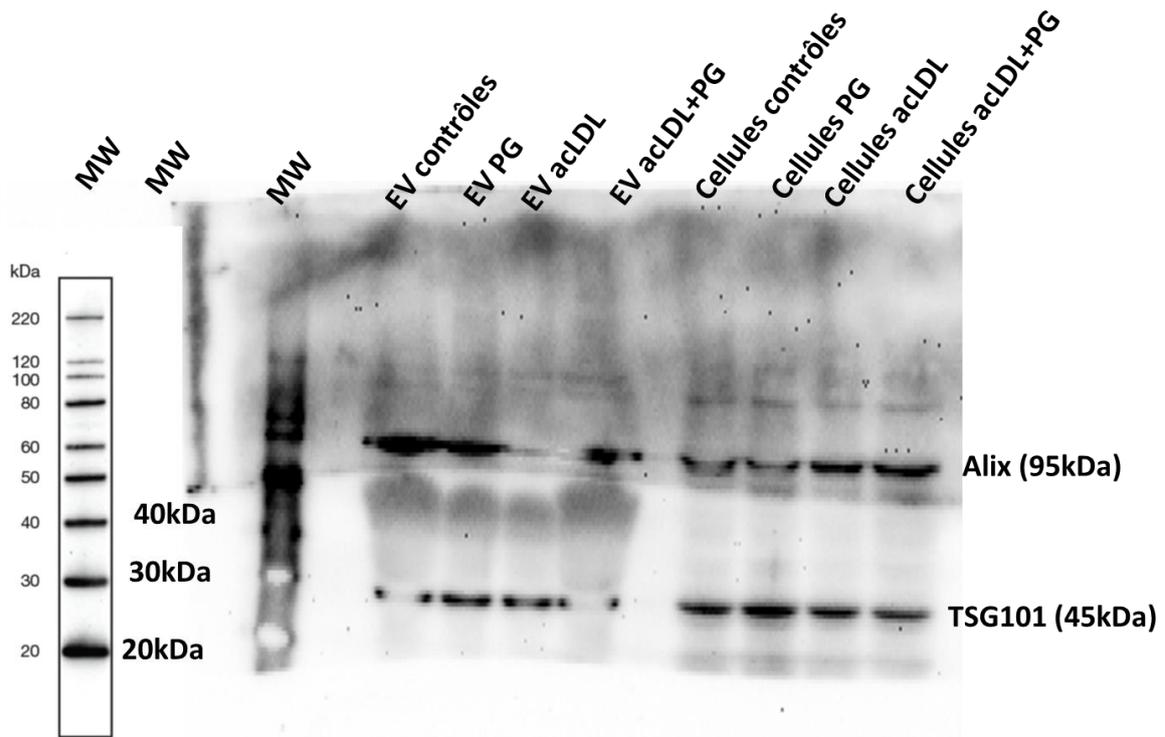


Figure 103 : caractérisation de la présence d'exosomes par western blot, marqueur utilisé ALIX et TSG101, western blot entier des figure 67 et 98

Annexe 6 :

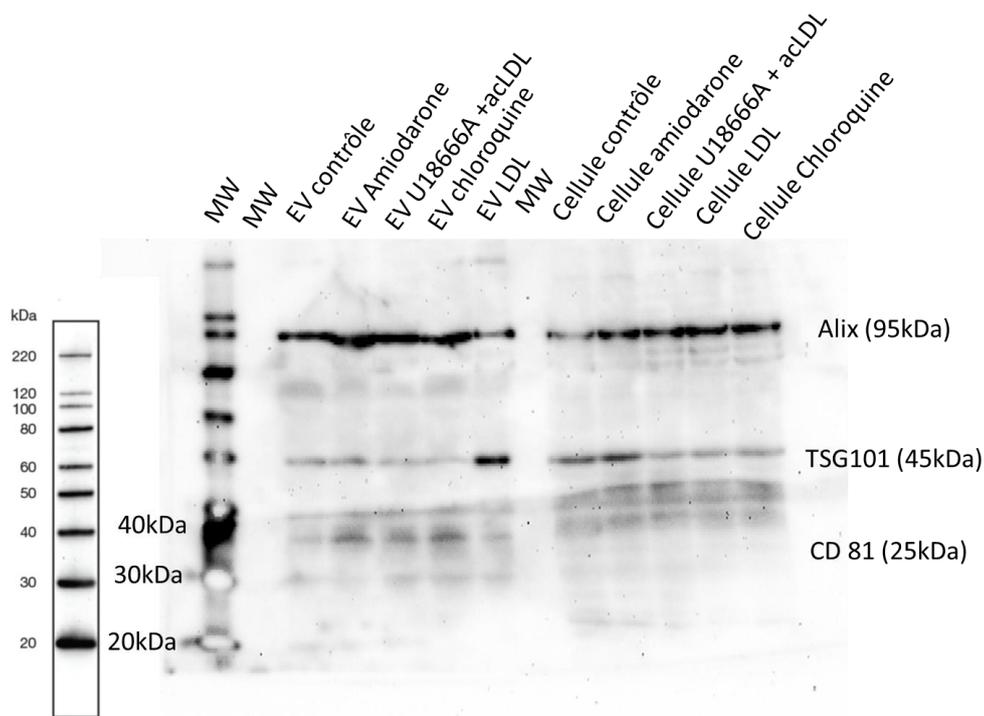


Figure 104 : caractérisation de la présence d'exosomes par western blot, marqueur utilisé ALIX, TSG101 et CD81, western blot entier des figure 81, 98.

Annexe 7 : liste des communications orales

Présentations orales

- 2019 2^{ème} journée de la FSEV – Nantes
Titre : Bismonoacylglycerophosphate
a unique endosome-associated
phospholipid
detected in extracellular vesicles
- 2019 24^{ème} journée de l'EDISS – Lyon
Titre : Bismonoacylglycerophosphate
a unique endosome-associated
phospholipid
detected in extracellular vesicles

Présentations posters

- 2019 15^{ème} congrès international du GERLI –
Compiègne
Titre : Bis(monoacylglycero)phosphate :
a biomarker of drug-induced
phospholipidosis in human urines
- 2018 18^{ème} journée de l'IMBL - Clermont-
Ferrand
Titre : Bis(monoacylglycero)phosphate : a
possible biomarker of drug-induced
phospholipidosis in human urines
- 2017 24^{ème} journée du G2L2 – Lyon
Titre : Molecular species characterization
of the endosomal lipid,
bis(monoacylglycero)phosphate in urines
- 2017 17^{ème} journée de l'IMBL – Grenoble
Titre : Molecular species characterization
of the endosomal lipid,
bis(monoacylglycero)phosphate in urines

Laboratoire CarMeN
Cardiovasculaire, Métabolisme, Diabétologie et Nutrition
Unité Mixte de Recherche - INSERM U1060, INRA U1397, Université Lyon1, INSA de Lyon

Bis(monoacylglycero)phosphate : a biomarker of drug-induced phospholipidosis in human urines

Maxence Rabi¹, Annie Durand¹, Baptiste Fourmaux^{1,2}, Céline Luquain-Costaz¹, Philippe Moulin¹, Isabelle Delton¹ and Françoise Hullin-Matsuda¹

¹Univ Lyon, CarMeN Laboratory, INSERM, INRA, INSA Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, 69621, Villeurbanne, France
²Plateforme de lipidomique fonctionnelle, Laboratoire CarMeN/IMBL-INSA de Lyon, 69621 Villeurbanne cedex, France

Aim

Phospholipidosis is a genetic or drug-induced disease characterized by an accumulation of phospholipids in the endolysosomal organelles of various tissues. Amiodarone, an iodinated antiarrhythmic drug belonging to the cationic amphiphilic drug family, induces phospholipidosis during long-term treatment, especially in lung, thyroid and liver.

Bis(monoacylglycero)phosphate (BMP), also known as lysobisphosphatidic acid (LBPA), has been recently described as a possible biomarker of lysosomal storage disorders and drug-induced phospholipidosis [1]. BMP is a unique phospholipid specifically enriched in the endolysosomal compartment [2] and a structural isomer of phosphatidylglycerol (PG) [3]. The aim of our study is to confirm the presence of BMP in urines of amiodarone-treated patients in order to evaluate its use as a biomarker of drug-induced phospholipidosis in clinical follow-up.

Figure 1 : di-docosahexaenoate BMP

Method

For this study, age-matched subjects were recruited :

- Control subjects (n=13)
- Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) patients (n=6)
- Amiodarone-treated patients (n=26)

Urines were collected and centrifuged before lipid extraction and analysis.

Lipids were extracted according to the Bligh and Dyer method in acidic conditions [4]. To analyse the different molecular species of BMP, we developed a reversed-phase chromatography method coupled to ESI tandem mass spectrometry (RPLC-MS/MS) using a triple quadrupole AB Sciex 4500 QTRAP working in positive ion mode.

For data comparison, urinary BMP concentrations were adjusted by creatinine content.

Amiodarone increases urinary di-DHA BMP

Figure 2 : Variation of di-DHA BMP in urines (* p < 0.05, Student's t test)

We observed a significant increase of the diDHA BMP species in urines of amiodarone-treated patients. No difference was observed for the NASH group compared to the control group.

Total BMP content is increased after amiodarone

Figure 3 : Variation of total BMP in urines (* p < 0.05, Student's t test)

We observed a significant increase of the total BMP content in urines of amiodarone-treated patients. No difference was observed for the NASH group compared to the control group.

Amiodarone increases polyunsaturation of BMP molecular species

Degree of Unsaturation	Molecular species (BMP)	Control (n=13)		Amiodarone (n=26)			
		pmol BMP/μmol creatinine		pmol BMP/μmol creatinine			
Saturated	(C16:0,C16:0)	3.42	± 0.45	4.00	± 0.63		
Monounsaturated	(C18:1n-9,C18:1n-9)	0.98	± 0.18	5.46	± 1.44*		
	(18:0,C18:1n-9)	0.28	± 0.04	1.11	± 0.30*		
Polyunsaturated	(C18:2n-6,C18:2n-6)	0.09	± 0.02	0.71	± 0.22*		
	(C18:2n-6,C22:6n-3)	0.38	± 0.06	2.75	± 1.00*		
	(C18:1n-9,C22:6n-3)	1.13	± 0.17	5.32	± 1.28*		
	(C22:6n-3,C22:6n-3)	1.24	± 0.26	4.49	± 1.10*		
	(C18:0,C22:6n-3)	0.11	± 0.02	0.38	± 0.08*		
	(C18:1n-9,C20:4n-6)	0.06	± 0.01	0.51	± 0.18*		
Total pmol BMP/μmol creatinine		TOTAL BMP		9.02	± 1.10	33.68	± 8.33*

Table : Main BMP molecular species from human urines : Lipid extracts from urines were analyzed by LC-MS/MS. Results are expressed in pmol BMP/μmol creatinine. (* p < 0.05, Student's t test)

Control

Amiodarone-treated patients

Saturated species

Monounsaturated species

Polyunsaturated species

Figure 4 : Percentage of saturated/unsaturated BMP molecular species

Conclusion

Our study indicates that urinary BMP can be used as a biomarker of endolysosomal dysfunction induced by amiodarone in human patients and more specifically the di-DHA BMP species. We showed that all unsaturated molecular species of BMP are increased with amiodarone treatment.

We are now studying the mechanism leading to BMP secretion in urines and its vehicle.

References

- [1] Meikle, P.J. et al. (2008). *Biochem J* 411(1): 71-78.
- [2] Hullin-Matsuda F and al. (2014). *Semin Cell Dev Biol* 31: 48-56.
- [3] Tan H.H. et al. (2012). *Angew Chem Int Ed Engl* 51(2), 533-535.
- [4] Bligh and Dyer (1959). *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37 (8), 911-917.

Bis(monoacylglycero)phosphate : a possible biomarker of drug-induced phospholipidosis in human urines

Maxence Rabia¹, Baptiste Fourmaux^{1,2}, Céline Luquain-Costaz¹, Philippe Moulin¹, Isabelle Delton² and Françoise Hullin-Matsuda²

¹Univ Lyon, CarMeN Laboratory, INSERM, INRA, INSA Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, 69621, Villeurbanne, France
²Plateforme de lipidomique fonctionnelle, Laboratoire CarMeN/IMBL-INSA de Lyon, 69621 Villeurbanne cedex, France

Aim

Phospholipidosis is a genetic or drug-induced disease characterized by an accumulation of phospholipids in the endolysosomal organelles of various tissues. Amiodarone, an iodinated antiarrhythmic drug belonging to the cationic amphiphilic drug family, induces phospholipidosis during long-term treatment, especially in lung, thyroid and liver.

Bis(monoacylglycero)phosphate (BMP), also known as lysobisphosphatidic acid (LBPA), has been recently described as a possible biomarker of lysosomal storage disorders and drug-induced phospholipidosis [1]. BMP is a unique phospholipid specifically enriched in the endolysosomal compartment [2] and a structural isomer of phosphatidylglycerol (PG) [3]. The aim of our study is to confirm the presence of BMP in urines of amiodarone-treated patients in order to evaluate its use as a biomarker of drug-induced phospholipidosis in clinical follow-up.



Figure 1 : Di-oleate bis(monoacylglycero)phosphate

Method

The study is carried out using the urines of healthy subjects, patients treated with amiodarone (with or without dysthyroidism) and patients with non-alcoholic steatohepatitis (NASH).

Groups of patients :

- Control : n=14, median age 58 years
- NASH : n=6, median age 62 years
- Amiodarone without dysthyroidism (Amio) : n=19, median age 72 years
- Amiodarone with dysthyroidism (Amio thyro) : n =6, median age 73 years

For data comparison, urinary BMP concentrations are adjusted by creatinine content

Lipids are extracted according to the Bligh and Dyer method in acidic conditions [4]. To analyse the different molecular species of BMP, we developed a reversed-phase chromatography method coupled to ESI tandem mass spectrometry (RPLC-MS/MS) using a triple quadrupole AB Sciex 4500 QTRAP working in positive ion mode.

Urinary di-DHA BMP

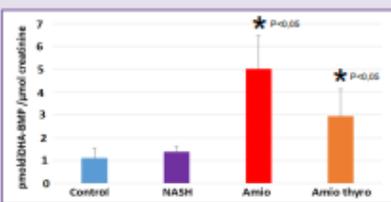


Figure 2 : Variation of di-DHA BMP (pmol of di-DHA-BMP/μmol de creatinine (HPLC-MS/MS)) (statistical test : T test)

We observe a significant increase of diDHA BMP for patients treated with amiodarone (with or without dysthyroidism). No difference is observed for the group NASH compared to the control

Urinary BMP

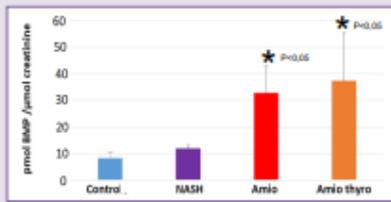


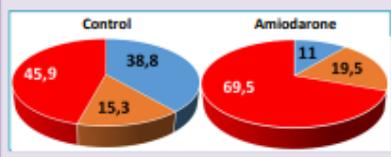
Figure 3 : Variation of total BMP (pmol of total BMP/μmol de creatinine (HPLC-MS/MS)) (statistical test : T test)

We observe a significant increase of total BMP for patients treated with amiodarone (with or without dysthyroidism). No difference is observed for the group NASH compared to the control

Urinary BMP molecular species

UNSATURATION	Main molecular species (BMP)	Control (n=14) pmol BMP/μmol creatinine	Amiodarone (n=19) pmol BMP/μmol creatinine
Saturated	(C16:0,C16:0)	3,19 ± 0,43	3,60 ± 0,60
Monounsaturated	(C16:0,C18:1n-9)	0,88 ± 0,17	4,71 ± 1,53
	(C18:0,C18:1n-9)	0,49 ± 0,09	4,90 ± 2,61
Polyunsaturated	(C18:2n-6,C18:2n-6)	0,25 ± 0,04	1,02 ± 0,36
	(C18:2n-6,C22:6n-3)	0,34 ± 0,05	2,97 ± 1,32
	(C18:1n-9,C22:6n-3)	1,03 ± 0,16	5,17 ± 1,54
	(C18:0,C22:6n-3)	0,10 ± 0,01	0,37 ± 0,11
	(C22:6n-3,C22:6n-3)	1,11 ± 0,25	5,02 ± 1,46
	(C18:1n-9,C20:4n-6)	0,34 ± 0,05	1,50 ± 0,47
Total pmol BMP/μmol creatinine	TOTAL BMP	8,21 ± 1,05	32,74 ± 10,17

Table : Main BMP molecular species from human urines : Lipid extracts from urines were analyzed by LC-MS/MS. Results are expressed in pmol BMP/μmol creatinine.



Control

45,9 (Saturated), 38,8 (Monounsaturated), 15,3 (Polyunsaturated)

Amiodarone

11 (Saturated), 69,5 (Monounsaturated), 19,5 (Polyunsaturated)

Figure 4 : Percentage of saturated/unsaturated BMP molecular species

Conclusion

Our study indicates that urinary BMP can be used as a biomarker of endolysosomal perturbations induced by amiodarone in human patients and more specifically the di-DHA BMP molecular species. We show that all unsaturated molecular species of BMP are increased with amiodarone treatment.

We are now looking for the vehicles of BMP in the urines and the mechanism of BMP secretion involved.

References

- [1] Meikle, P.J. et al. (2008). *Biochem J* 411(1): 71-78.
- [2] Hullin-Matsuda F and al. (2014). *Semin Cell Dev Biol* 31: 48-56.
- [3] Tan H.H et al. (2012). *Angew Chem Int Ed Engl* 51(2), 533-535.
- [4] Bligh and Dyer (1959). *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37 (8), 911-917.

INSA INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUÉES LYON

Inserm UMR1106

Laboratoire CarMeN Cardiovasculaire, Métabolisme, Diabétologie et Nutrition

Université Claude Bernard Lyon 1

Molecular species characterization of the endosomal lipid, bis(monoacyl)phosphate in urines

Maxence Rabia^{1,2}, Baptiste Fourmaux^{1,3}, Céline Luquain-Costaz¹, Philippe Moulin¹, Isabelle Delton¹, Françoise Hullin-Matsuda¹

¹INSERM UMR1106-INSA, Laboratoire CarMeN, 69621 Villeurbanne cedex, France
²Université Lyon 1 UCLB, 69622, Villeurbanne Cedex, France.
³Plateforme de Lipidologie Fonctionnelle, Laboratoire CarMeN/IMBL-INSA de Lyon, 69621 Villeurbanne cedex, France

maxence.rabia@gmail.com

ABSTRACT

Bis(monoacyl)phosphate (BMP), also known as lysobisphosphatidic acid (LBPA), is a structural isomer of phosphatidylglycerol (PG) with a glycerophosphoglycerol backbone, displaying an *sn-1, sn'-1* stereoisomerism unusual for eukaryotic lipids [1]. This phospholipid is specifically enriched in the late endosome/lysosome organelles, particularly in their internal membranes [2] (Fig 1). In these acidic compartments, BMP is resistant to the activity of the endosomal phospholipases due to its unique structure. It is involved in the regulation of cholesterol transport from the late endosome [3,4]. Furthermore, it has been recently described as a possible biomarker in lysosomal storage disorders and drug-induced phospholipidosis [5]. This phospholipid is enriched in unsaturated fatty acids like docosahexaenoic acid and oleic acid. Such enrichment is important for its biophysical properties in the membrane. Thus it is essential to specify the various molecular species of BMP in biological samples to better understand its functions.

Electrospray ionization (ESI) mass spectrometry is a powerful tool to analyze minor lipid species from biological samples. We developed a reverse-phase chromatography method coupled to ESI tandem mass spectrometry (RP-LC-MS/MS) using a triple quadrupole AB Sciex 4500 QTRAP working in positive ion mode. With this method, we can analyze samples containing pmol amounts of BMP.

In ammonium formate containing solvent, BMP forms ammonia adduct ions $[M+NH_4]^+$ that fragment to yield monoacylglycerol (MAG). We optimized MS parameters for ionization efficiency, especially during gradient elution. We determined linearity of concentration curves with saturated and unsaturated species of BMP. Finally we analyzed the BMP content after lipid extraction of human urines. Limit of detection per molecular species was about 0.3 pmol per ml urines.

Analyzing the BMP molecular species in biological samples is important to better understand their biological functions as well as to precise their role in various lipid-associated disorders (diabetes, Niemann-Pick type C, drug-induced phospholipidosis).

Fig 1: Lipid compartmentalization in the endosome system : Progressive enrichment in BMP is correlated with the active membrane invagination occurring in the multivesicular body (MVB) endosomal carrier vesicle (ECV) compartment. The highest BMP content is found in the inner membranes of the acidic late endosome (LE)/lysosome compartment [2].

INTRODUCTION

Bis(monoacyl)phosphate (BMP) is a minor phospholipid of eukaryotic cells whose characterization needs new sensitive analytical tools such as mass spectrometry (MS). Whereas most of the current MS methods analyze the molecular species according to the acyl ester chains of the major phospholipids, only a few papers report about BMP content. We now describe a MS method coupled with RP-HPLC (Reverse Phase - High Pressure Liquid Chromatography) that separates and identifies the different BMP molecular species. BMP displays an *sn-1,sn'-1* stereoisomerism, that is unusual in eukaryotes, but is present in the archaea. In the acidic environment, the acyl chains are found in the *sn-2,sn-2'* position of the glycerol moieties. Isomerization can occur with the displacement of the acyl chains to the *sn-2,sn-3'* position, resulting in different forms of BMP that can be separated by different elution times on the LC column (Fig 2).

METHOD

The different species of BMP are analyzed by reverse phase liquid chromatography using a Shimadzu LC-20AD Nexera coupled to the AbSciex 4500 QTrap mass spectrometer (RP-LC-MS/MS) having a triple quadrupole. HPLC is performed using an Acquity UPLC column BEH C18 column (Waters). Elution is achieved with a gradient of organic solvent and aqueous solvent. The ionization source is an ESI (Electrospray ionization) and the MS is performed in positive-ion mode.

Fig 2: Analysis of BMP standards by LC-MS/MS in positive-ion mode : Ammonium adducts of BMP (14:0, 16:1) have precursor ion at m/z 624.3 and produced a MAG fragment (m/z 310.2). Ammonium adducts of BMP (18:1, 18:1) have precursor ion at m/z 782.5 and produced a MAG fragment (m/z 310.2). In the LC chromatogram, the double or triple peaks observed for BMP are monomers with different acylation positions on the glycerol moieties (successively *sn-2,sn-2'*, *sn-2,sn-3'*, *sn-3,sn-2'*, *sn-3,sn-3'*).

QUANTIFICATION OF BMP SPECIES

The linearity range was performed using saturated and unsaturated species of BMP standards from Avanti Polar Lipids. Standards of di 14:0 BMP (S,R) *sn-3, sn-3'* and di 18:1 BMP (S,S) *sn-3, sn-3'* were used in a concentration range of 0-100 pmol. Integration of peak area is carried out using Analyst 1.6 software. The curves show a linear correlation with a coefficient of 0.99. The saturated species displays smaller response than the unsaturated species (Fig 3).

Lipid extraction from human urine samples is carried out by the acid Bligh-Dyer method [6] using di 14:0 BMP as internal standard. The different BMP species are analyzed by RP-HPLC-MS/MS using MRM (multiple reaction monitoring) to analyze each species. The different BMP molecular species are identified by their respective elution time, their precursor ion $[M]^+$ and their MAG (monoacylglycerol) fragment with characteristic mass/charge m/z. The quantification is done by comparing the peak area of the BMP species with that of the standard (di 14:0 BMP). The asymmetric BMP species producing 2 different MAG fragments, the peak area of both MAGs is pooled. The limit of detection is 0.3 pmol BMP per ml of urine, regardless of the BMP species. We observed that BMP is enriched in polyunsaturated fatty acids (see Table).

Fig 3: Linearity of BMP standards by LC-MS/MS analysis (positive-ion mode) : Each lipid standard is dissolved in methanol and analyzed by LC-MS/MS method as above. Data are presented as the MS peak area for each standard per the pmol amount used. Ammonium adducts of each BMP are identified by their MAG fragment.

CONCLUSIONS

RP-HPLC-MS/MS allows to analyze minor lipid species from biological samples. Using new HPLC-ESI MS/MS method, we could separate and quantify the different BMP molecular species from human urine samples.

The parameters of the MS were optimized to increase efficiency of the ionization during the elution gradient. With this method, we were able to determine a linearity range for the saturated and unsaturated species of BMP.

It was recently demonstrated that BMP could be a biomarker of drug-induced phospholipidosis and lysosomal diseases such as Niemann-Pick type C in biological fluids [5,7]. The characterization of different molecular species of BMP will help to better understand its physiological role and to precise the involvement of its specific molecular species in endosomal-related diseases.

References:

- Tan HJ et al. (2012). *Angew Chem Int Ed Engl* 51(2), 545-555.
- Hullin-Matsuda F et al. (2014). *Semin Cell Dev Biol* 24: 48-56.
- Kohayashi T et al. (1995). *Nat Cell Biol* 2(2), 215-218.
- Luquain-Costaz C et al. (2018). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 38(6): 1869-1871.
- Meskinen J et al. (2008). *Biochem J* 412(1), 71-76.
- Bligh E Dyer (1959). *Can J Biochem Physiol* 37: 911-917
- Thompson et al. (2015). *Toxicol Lett* 233, 285-293.

HUMAN URINES		
BMP SPECIES	pmol/mg creatinine	mg/dl
BMP C16:0/C16:0	2,720.22	29,980.54
BMP C16:1/C16:2n-6	0,8229	8,7580.04
BMP C16:1/C16:1n-7	0,7160.93	7,7601.17
BMP C18:1n-7/C18:2n-6	0,1180.08	1,2580.88
BMP C18:1n-7/C18:2n-6	0,3201.24	3,420.70
BMP C18:1n-7/C18:2n-6	0,4600.91	4,940.04
BMP C18:1n-7/C18:1n-7	0,9501.26	10,170.52
BMP C18:1n-7/C18:2n-6	0,9501.26	10,170.52
BMP C18:1n-7/C22:6n-3	0,7720.07	8,280.88
BMP C18:1n-7/C20:4n-6	0,9700.91	10,370.05
BMP C16:0/C22:6n-3	0,0189	0,2020.05
BMP C18:1n-7/C20:4n-6	0,0008.93	0,0094.19
BMP C18:1n-7/C20:4n-6	0,4601.91	4,940.07
BMP C18:1n-7/C20:4n-6	0,1180.08	1,2580.88
BMP C18:1n-7/C22:6n-3	0,1180.08	1,2580.88
BMP C18:1n-7/C22:6n-3	0,1180.08	1,2580.88
BMP C20:4n-6/C22:6n-3	0,0008.93	0,0094.19
BMP C20:4n-6/C22:6n-3	0,1180.08	1,2580.88
BMP C20:4n-6/C22:6n-3	0,2601.17	2,7601.76
BMP TOTAL	0,2801.16	2,9801.16

Table 1: BMP molecular species from human urines : Lipid extracts from urines were analyzed by LC-MS/MS method as described above. The data are expressed in pmol/mg creatinine and in mg/dl (mg/dl = $\mu\text{mol/mg creatinine} \times 100$). For data comparison, urinary BMP concentrations are adjusted by creatinine content. The values are the mean \pm SD of 10 samples.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abe, A., & Shayman, J. A. (2009). The role of negatively charged lipids in lysosomal phospholipase A2 function. *Journal of Lipid Research*, 50(10), 2027-2035. <https://doi.org/10.1194/jlr.M900008-JLR200>

Abrami, L., Brandi, L., Moayeri, M., Brown, M. J., Krantz, B. A., Leppla, S. H., & van der Goot, F. G. (2013). Hijacking multivesicular bodies enables long-term and exosome-mediated long-distance action of anthrax toxin. *Cell Reports*, 5(4), 986-996. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.019>

Airola, M. V., & Hannun, Y. A. (2013). Sphingolipid metabolism and neutral sphingomyelinases. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 215, 57-76. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1368-4_3

Akgoc, Z., Sena-Esteves, M., Martin, D. R., Han, X., d'Azzo, A., & Seyfried, T. N. (2015). Bis(monoacylglycero)phosphate: A secondary storage lipid in the gangliosidoses. *Journal of Lipid Research*, 56(5), 1006-1013. <https://doi.org/10.1194/jlr.M057851>

Almsherqi, Z. A. (2021). Potential Role of Plasmalogens in the Modulation of Biomembrane Morphology. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 1648. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.673917>

Amidon, B., Brown, A., & Waite, M. (1996). Transacylase and Phospholipases in the Synthesis of Bis(monoacylglycero)phosphate †. *Biochemistry*, 35(44), 13995-14002. <https://doi.org/10.1021/bi961164o>

Amidon, B., Schmitt, J. D., Thuren, T., King, L., & Waite, M. (1995). Biosynthetic conversion of phosphatidylglycerol to sn-1:sn-1' bis(monoacylglycerol) phosphate in a macrophage-like cell Line. *Biochemistry*, 34(16), 5554-5560. <https://doi.org/10.1021/bi00016a029>

Anderson, H. C. (1969). Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. *The Journal of Cell Biology*, 41(1), 59-72. <https://doi.org/10.1083/jcb.41.1.59>

Anderson, H. C., Garimella, R., & Tague, S. E. (2005). The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 10, 822-837. <https://doi.org/10.2741/1576>

Anderson, M. R., Kashanchi, F., & Jacobson, S. (2016). Exosomes in Viral Disease. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 13(3), 535-546. <https://doi.org/10.1007/s13311-016-0450-6>

Arienti, G., Carlini, E., Verdacchi, R., Cosmi, E. V., & Palmerini, C. A. (1997). Prostate to sperm transfer of CD13/aminopeptidase N (EC 3.4.11.2). *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1336(3), 533-538. [https://doi.org/10.1016/s0304-4165\(97\)00071-8](https://doi.org/10.1016/s0304-4165(97)00071-8)

Arnal-Levron, M., Chen, Y., Delton-Vandenbroucke, I., & Luquain-Costaz, C. (2013). Bis(monoacylglycero)phosphate reduces oxysterol formation and apoptosis in macrophages exposed to oxidized LDL. *Biochemical Pharmacology*, 86(1), 115-121. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.03.017>

Arnal-Levron, M., Chen, Y., Greimel, P., Calevro, F., Gaget, K., Riols, F., Batut, A., Bertrand-Michel, J., Hullin-Matsuda, F., Olkkonen, V. M., Delton, I., & Luquain-Costaz, C. (2019). Bis(monoacylglycero)phosphate regulates oxysterol binding protein-related protein 11 dependent sterol trafficking. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1864(9), 1247-1257. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.05.011>

Aswad, H., Jalabert, A., & Rome, S. (2016). Depleting extracellular vesicles from fetal bovine serum alters proliferation and differentiation of skeletal muscle cells *in vitro*. *BMC Biotechnology*, 16, 32. <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0262-0>

Ayala-Mar, S., Donoso-Quezada, J., Gallo-Villanueva, R. C., Perez-Gonzalez, V. H., & González-Valdez, J. (2019). Recent advances and challenges in the recovery and purification of cellular exosomes. *Electrophoresis*, 40(23-24), 3036-3049. <https://doi.org/10.1002/elps.201800526>

Baietti, M. F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., Depoortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., Zimmermann, P., & David, G. (2012). Syndecan–syntenin–ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nature Cell Biology*, 14(7), 677-685. <https://doi.org/10.1038/ncb2502>

Bakhshian Nik, A., Hutcheson, J. D., & Aikawa, E. (2017). Extracellular Vesicles As Mediators of Cardiovascular Calcification. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 4, 78. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2017.00078>

Balderhaar, H. J. kleine, Lachmann, J., Yavavli, E., Bröcker, C., Lürick, A., & Ungermann, C. (2013). The CORVET complex promotes tethering and fusion of Rab5/Vps21-positive membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(10), 3823-3828. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221785110>

Ball, W. B., Neff, J. K., & Gohil, V. M. (2018). The role of nonbilayer phospholipids in mitochondrial structure and function. *FEBS Letters*, *592*(8), 1273-1290. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12887>

Banani, E., Murray, J. W., Stockert, R. J., Satir, P., & Wolkoff, A. W. (2000). Microtubule and Motor-Dependent Endocytic Vesicle Sorting *in vitro*. *Journal of Cell Biology*, *151*(1), 179-186. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.1.179>

Baronas, E. T., Lee, J.-W., Alden, C., & Hsieh, F. Y. (2007). Biomarkers to monitor drug-induced phospholipidosis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *218*(1), 72-78. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.10.015>

Barry, A. R., & Dixon, D. L. (2021). Omega-3 fatty acids for the prevention of atherosclerotic cardiovascular disease. *Pharmacotherapy*. <https://doi.org/10.1002/phar.2615>

Bartuzi, P., Billadeau, D. D., Favier, R., Rong, S., Dekker, D., Fedoseienko, A., Fieten, H., Wijers, M., Levels, J. H., Huijkman, N., Kloosterhuis, N., van der Molen, H., Brufau, G., Groen, A. K., Elliott, A. M., Kuivenhoven, J. A., Plecko, B., Grangl, G., McGaughran, J., ... van de Sluis, B. (2016). CCC- and WASH-mediated endosomal sorting of LDLR is required for normal clearance of circulating LDL. *Nature Communications*, *7*(1), 10961. <https://doi.org/10.1038/ncomms10961>

Basaria, S., & Cooper, D. S. (2005). Amiodarone and the thyroid. *The American Journal of Medicine*, *118*(7), 706-714. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2004.11.028>

Basu, S. K., Goldstein, J. L., Anderson, G. W., & Brown, M. S. (1976). Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation of cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *73*(9), 3178-3182. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.9.3178>

Bebelman, Maarten P., Philippe Bun, Stephan Huvneers, Guillaume van Niel, D. Michiel Pegtel, et Frederik J. Verweij. 2020. « Real-Time Imaging of Multivesicular Body-

Plasma Membrane Fusion to Quantify Exosome Release from Single Cells ». *Nature Protocols* 15 (1): 102-21. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0245-4>.

Besson, N., Hullin-Matsuda, F., Makino, A., Murate, M., Lagarde, M., Pageaux, J.-F., Kobayashi, T., & Delton-Vandenbroucke, I. (2006). Selective incorporation of docosahexaenoic acid into lysobisphosphatidic acid in cultured THP-1 macrophages. *Lipids*, 41(2), 189-196. <https://doi.org/10.1007/s11745-006-5087-5>

Bianchi, E., Doe, B., Goulding, D., & Wright, G. J. (2014). Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature*, 508(7497), 483-487. <https://doi.org/10.1038/nature13203>

Bisogno, T., Delton-Vandenbroucke, I., Milone, A., Lagarde, M., & Di Marzo, V. (1999). Biosynthesis and inactivation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) and N-docosahexaenylethanolamine in bovine retina. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 370(2), 300-307. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1410>

Blanc, L., & Vidal, M. (2018). New insights into the function of Rab GTPases in the context of exosomal secretion. *Small GTPases*, 9(1-2), 95-106. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1264352>

Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911-917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>

Body, D. R., & Gray, G. M. (1967). The isolation and characterisation of phosphatidylglycerol and a structural isomer from pig lung. *Chemistry and Physics of Lipids*, 1(3), 254-263. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(67\)90032-1](https://doi.org/10.1016/0009-3084(67)90032-1)

Bonucci, E. (1967). Fine structure of early cartilage calcification. *Journal of Ultrastructure Research*, 20(1), 33-50. [https://doi.org/10.1016/s0022-5320\(67\)80034-0](https://doi.org/10.1016/s0022-5320(67)80034-0)

Booth, A. M., Fang, Y., Fallon, J. K., Yang, J.-M., Hildreth, J. E. K., & Gould, S. J. (2006). Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. *Journal of Cell Biology*, 172(6), 923-935. <https://doi.org/10.1083/jcb.200508014>

Bouvier, J., Zemski Berry, K. A., Hullin-Matsuda, F., Makino, A., Michaud, S., Geloën, A., Murphy, R. C., Kobayashi, T., Lagarde, M., & Delton-Vandenbroucke, I. (2009). Selective

decrease of bis(monoacylglycero)phosphate content in macrophages by high supplementation with docosahexaenoic acid. *Journal of Lipid Research*, 50(2), 243-255. <https://doi.org/10.1194/jlr.M800300-JLR200>

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>

Braverman, N. E., & Moser, A. B. (2012). Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1822(9), 1442-1452. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.05.008>

Breiden, B., & Sandhoff, K. (2019). Emerging mechanisms of drug-induced phospholipidosis. *Biological Chemistry*, 401(1), 31-46. <https://doi.org/10.1515/hsz-2019-0270>

Breiden, B., & Sandhoff, K. (2021). Acid Sphingomyelinase, a Lysosomal and Secretory Phospholipase C, Is Key for Cellular Phospholipid Catabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 9001. <https://doi.org/10.3390/ijms22169001>

Brotherus, J., & Renkonen, O. (1974). Isolation and characterisation of bis-phosphatidic acid and its partially deacylated derivatives from cultured BHK-cells. *Chemistry and Physics of Lipids*, 13(1), 11-20. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(74\)90038-3](https://doi.org/10.1016/0009-3084(74)90038-3)

Brotherus, J., Renkonen, O., Fischer, W., & Herrmann, J. (1974). Novel stereoconfiguration in lyso-bis-phosphatidic acid of cultured BHK-cells. *Chemistry and Physics of Lipids*, 13(2), 178-182. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(74\)90034-6](https://doi.org/10.1016/0009-3084(74)90034-6)

Brown, A. J., & Jessup, W. (2009). Oxysterols: Sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(3), 111-122. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.02.005>

Brown, M. S., Goldstein, J. L., Krieger, M., Ho, Y. K., & Anderson, R. G. (1979). Reversible accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with acetylated lipoproteins. *The Journal of Cell Biology*, 82(3), 597-613. <https://doi.org/10.1083/jcb.82.3.597>

Burger, K. N. J. (2000). Greasing Membrane Fusion and Fission Machineries. *Traffic*, 1(8), 605-613. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2000.010804.x>

Caforio, A., & Driessen, A. J. M. (2017). Archaeal phospholipids : Structural properties and biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1862(11), 1325-1339. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.12.006>

Calder, P. C. (2020). Eicosanoids. *Essays in Biochemistry*, 64(3), 423-441. <https://doi.org/10.1042/EBC20190083>

Carlsson, S. R., Roth, J., Piller, F., & Fukuda, M. (1988). Isolation and characterization of human lysosomal membrane glycoproteins, h-lamp-1 and h-lamp-2. Major sialoglycoproteins carrying polylectosaminoglycan. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(35), 18911-18919.

Carpio, L. E., & Villalaín, J. (2020). Identification of the phospholipid binding regions of the envelope E protein of flaviviruses by molecular dynamics. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 38(17), 5136-5147. <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1697368>

Carrière, F., Longhi, S., & Record, M. (2020). The endosomal lipid bis(monoacylglycero) phosphate as a potential key player in the mechanism of action of chloroquine against SARS-COV-2 and other enveloped viruses hijacking the endocytic pathway. *Biochimie*, 179, 237-246. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.05.013>

Carstea, E. D., Morris, J. A., Coleman, K. G., Loftus, S. K., Zhang, D., Cummings, C., Gu, J., Rosenfeld, M. A., Pavan, W. J., Krizman, D. B., Nagle, J., Polymeropoulos, M. H., Sturley, S. L., Ioannou, Y. A., Higgins, M. E., Comly, M., Cooney, A., Brown, A., Kaniski, C. R., ... Tagle, D. A. (1997). Niemann-Pick C1 Disease Gene : Homology to Mediators of Cholesterol Homeostasis. *Science*, 277(5323), 228-231. <https://doi.org/10.1126/science.277.5323.228>

Carstea, E. D., Polymeropoulos, M. H., Parker, C. C., Detera-Wadleigh, S. D., O'Neill, R. R., Patterson, M. C., Goldin, E., Xiao, H., Straub, R. E., & Vanier, M. T. (1993). Linkage of Niemann-Pick disease type C to human chromosome 18. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(5), 2002-2004. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.5.2002>

Cha, D. J., Franklin, J. L., Dou, Y., Liu, Q., Higginbotham, J. N., Demory Beckler, M., Weaver, A. M., Vickers, K., Prasad, N., Levy, S., Zhang, B., Coffey, R. J., & Patton, J. G.

(2015). KRAS-dependent sorting of miRNA to exosomes. *eLife*, 4, e07197. <https://doi.org/10.7554/eLife.07197>

Chahar, H. S., Bao, X., & Casola, A. (2015). Exosomes and Their Role in the Life Cycle and Pathogenesis of RNA Viruses. *Viruses*, 7(6), 3204-3225. <https://doi.org/10.3390/v7062770>

Chang, T.-Y., Li, B.-L., Chang, C. C. Y., & Urano, Y. (2009). Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferases. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 297(1), E1-9. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90926.2008>

Chapuy-Regaud, S., Subra, C., Requena, M., de Medina, P., Amara, S., Delton-Vandenbroucke, I., Payre, B., Cazabat, M., Carriere, F., Izopet, J., Poirot, M., & Record, M. (2013). Progesterone and a phospholipase inhibitor increase the endosomal bis(monoacylglycero)phosphate content and block HIV viral particle intercellular transmission. *Biochimie*, 95(9), 1677-1688. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.05.019>

Chen, F. W., Li, C., & Ioannou, Y. A. (2010). Cyclodextrin induces calcium-dependent lysosomal exocytosis. *PLoS One*, 5(11), e15054. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015054>

Chen, G., Huang, A. C., Zhang, W., Zhang, G., Wu, M., Xu, W., Yu, Z., Yang, J., Wang, B., Sun, H., Xia, H., Man, Q., Zhong, W., Antelo, L. F., Wu, B., Xiong, X., Liu, X., Guan, L., Li, T., ... Guo, W. (2018). Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature*, 560(7718), 382-386. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0392-8>

Chen, J., Xu, Q., Zhang, Y., & Zhang, H. (2020). RNA Profiling Analysis of the Serum Exosomes Derived from Patients with Chronic Hepatitis and Acute-on-chronic Liver Failure Caused By HBV. *Scientific Reports*, 10(1), 1528. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58233-x>

Chen, L., Feng, Z., Yue, H., Bazdar, D., Mbonye, U., Zender, C., Harding, C. V., Bruggeman, L., Karn, J., Sieg, S. F., Wang, B., & Jin, G. (2018). Exosomes derived from HIV-1-infected cells promote growth and progression of cancer via HIV TAR RNA. *Nature Communications*, 9(1), 4585. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07006-2>

Chen, Y., Arnal-Levron, M., Hullin-Matsuda, F., Knibbe, C., Moulin, P., Luquain-Costaz, C., & Delton, I. (2018). *In vitro* oxidized HDL and HDL from type 2 diabetes patients have reduced ability to efflux oxysterols from THP-1 macrophages. *Biochimie*, 153, 232-237. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.04.018>

Chen, Y., Arnal-Levron, M., Lagarde, M., Moulin, P., Luquain-Costaz, C., & Delton, I. (2015). THP1 macrophages oxidized cholesterol, generating 7-derivative oxysterols specifically released by HDL. *Steroids*, 99(Pt B), 212-218. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.02.020>

Chevallier, J., Chamoun, Z., Jiang, G., Prestwich, G., Sakai, N., Matile, S., Parton, R. G., & Gruenberg, J. (2008). Lysobisphosphatidic acid controls endosomal cholesterol levels. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(41), 27871-27880. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801463200>

Chevallier, J., Sakai, N., Robert, F., Kobayashi, T., Gruenberg, J., & Matile, S. (2000). Rapid access to synthetic lysobisphosphatidic acids using P(III) chemistry. *Organic Letters*, 2(13), 1859-1861. <https://doi.org/10.1021/ol0059246>

Cochran, F. R., Roddick, V. L., Connor, J. R., Thornburg, J. T., & Waite, M. (1987). Regulation of arachidonic acid metabolism in resident and BCG-activated alveolar macrophages: Role of lyso(bis)phosphatidic acid. *The Journal of Immunology*, 138(6), 1877-1883.

Cocucci, E., & Meldolesi, J. (2015). Ectosomes and exosomes : Shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends in Cell Biology*, 25(6), 364-372. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.01.004>

Colombo, M., Raposo, G., & Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30, 255-289. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>

Costa-Silva, B., Aiello, N. M., Ocean, A. J., Singh, S., Zhang, H., Thakur, B. K., Becker, A., Hoshino, A., Mark, M. T., Molina, H., Xiang, J., Zhang, T., Theilen, T.-M., García-Santos, G., Williams, C., Ararso, Y., Huang, Y., Rodrigues, G., Shen, T.-L., ... Lyden, D. (2015). Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nature Cell Biology*, 17(6), 816-826. <https://doi.org/10.1038/ncb3169>

Dahlbäck, B., & Villoutreix, B. O. (2005). Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway: Novel insights into structure-function relationships and molecular recognition. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25(7), 1311-1320. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000168421.13467.82>

Datta, A., Kim, H., Lal, M., McGee, L., Johnson, A., Moustafa, A. A., Jones, J. C., Mondal, D., Ferrer, M., & Abdel-Mageed, A. B. (2017). Manumycin A suppresses exosome biogenesis and secretion via targeted inhibition of Ras/Raf/ERK1/2 signaling and hnRNP H1 in castration-resistant prostate cancer cells. *Cancer Letters*, 408, 73-81. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.08.020>

Davis, C. G., Goldstein, J. L., Südhof, T. C., Anderson, R. G. W., Russell, D. W., & Brown, M. S. (1987). Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. *Nature*, 326(6115), 760-765. <https://doi.org/10.1038/326760a0>

de Duve, C. (2005). The lysosome turns fifty. *Nature Cell Biology*, 7(9), 847-849. <https://doi.org/10.1038/ncb0905-847>

de Kroon, A. I. P. M., Rijken, P. J., & De Smet, C. H. (2013). Checks and balances in membrane phospholipid class and acyl chain homeostasis, the yeast perspective. *Progress in Lipid Research*, 52(4), 374-394. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.04.006>

Delton-Vandenbroucke, I., Bouvier, J., Makino, A., Besson, N., Pageaux, J.-F., Lagarde, M., & Kobayashi, T. (2007). Anti-bis(monoacylglycero)phosphate antibody accumulates acetylated LDL-derived cholesterol in cultured macrophages. *Journal of Lipid Research*, 48(3), 543-552. <https://doi.org/10.1194/jlr.M600266-JLR200>

Delton-Vandenbroucke, I., Maude, M. B., Chen, H., Aguirre, G. D., Acland, G. M., & Anderson, R. E. (1998). Effect of diet on the fatty acid and molecular species composition of dog retina phospholipids. *Lipids*, 33(12), 1187-1193. <https://doi.org/10.1007/s11745-998-0322-7>

Deneka, M., Pelchen-Matthews, A., Byland, R., Ruiz-Mateos, E., & Marsh, M. (2007). In macrophages, HIV-1 assembles into an intracellular plasma membrane domain containing the tetraspanins CD81, CD9, and CD53. *The Journal of Cell Biology*, 177(2), 329-341. <https://doi.org/10.1083/jcb.200609050>

Dikic, I. (2004). ALIX-ing phospholipids with endosome biogenesis. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 26(6), 604-607. <https://doi.org/10.1002/bies.20068>

Djuricic, I., & Calder, P. C. (2021). Beneficial Outcomes of Omega-6 and Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Human Health : An Update for 2021. *Nutrients*, *13*(7), 2421. <https://doi.org/10.3390/nu13072421>

Doherty, G. J., & McMahon, H. T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, *78*, 857-902. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540>

Dorninger, F., Brodde, A., Braverman, N. E., Moser, A. B., Just, W. W., Forss-Petter, S., Brügger, B., & Berger, J. (2015). Homeostasis of phospholipids—The level of phosphatidylethanolamine tightly adapts to changes in ethanolamine plasmalogens. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1851*(2), 117-128. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2014.11.005>

Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H. A., Glass, C. K., Merrill, A. H., Murphy, R. C., Raetz, C. R. H., Russell, D. W., Seyama, Y., Shaw, W., Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G., VanNieuwenhze, M. S., White, S. H., Witztum, J. L., & Dennis, E. A. (2005). A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*, *46*(5), 839-862. <https://doi.org/10.1194/jlr.E400004-JLR200>

Fahy, E., Subramaniam, S., Murphy, R. C., Nishijima, M., Raetz, C. R. H., Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G., Wakelam, M. J. O., & Dennis, E. A. (2009). Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*, *50 Suppl*, S9-14. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800095-JLR200>

Falguières, T., Luyet, P.-P., & Gruenberg, J. (2009). Molecular assemblies and membrane domains in multivesicular endosome dynamics. *Experimental Cell Research*, *315*(9), 1567-1573. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.12.006>

Fang, Y., Wu, N., Gan, X., Yan, W., Morrell, J. C., & Gould, S. J. (2007). Higher-Order Oligomerization Targets Plasma Membrane Proteins and HIV Gag to Exosomes. *PLOS Biology*, *5*(6), e158. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050158>

Feltes, M., Gale, S. E., Moores, S., Ory, D. S., & Schaffer, J. E. (2020). Monitoring the itinerary of lysosomal cholesterol in Niemann-Pick Type C1-deficient cells after cyclodextrin treatment. *Journal of Lipid Research*, *61*(3), 403-412. <https://doi.org/10.1194/jlr.RA119000571>

Fernández-Llama, P., Khositseth, S., Gonzales, P. A., Star, R. A., Pisitkun, T., & Knepper, M. A. (2010). Tamm-Horsfall protein and urinary exosome isolation. *Kidney International*, *77*(8), 736-742. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.550>

Florek, J. B., & Girzadas, D. (2021). Amiodarone. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482154/>

Fordjour, F. K., Daaboul, G. G., & Gould, S. J. (2019). A shared pathway of exosome biogenesis operates at plasma and endosome membranes. *BioRxiv*, 545228. <https://doi.org/10.1101/545228>

Forterre, A., Jalabert, A., Chikh, K., Pesenti, S., Euthine, V., Granjon, A., Errazuriz, E., Lefai, E., Vidal, H., & ROME, S. (2014). Myotube-derived exosomal miRNAs downregulate Sirtuin1 in myoblasts during muscle cell differentiation. *Cell Cycle*, 13(1), 78-89. <https://doi.org/10.4161/cc.26808>

Frostegård, J. (2013). Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease. *BMC Medicine*, 11, 117. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-117>

Fuji, Reina N., Michael Flagella, Miriam Baca, Marco A. S. Baptista, Jens Brodbeck, Bryan K. Chan, Brian K. Fiske, et al. 2015. « Effect of Selective LRRK2 Kinase Inhibition on Nonhuman Primate Lung ». *Science Translational Medicine* 7 (273): 273ra15. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa3634>.

Gallala, H. D., & Sandhoff, K. (2011). Biological Function of the Cellular Lipid BMP—BMP as a Key Activator for Cholesterol Sorting and Membrane Digestion. *Neurochemical Research*, 36(9), 1594-1600. <https://doi.org/10.1007/s11064-010-0337-6>

Galve-de Rochemonteix, B., Kobayashi, T., Rosnoblet, C., Lindsay, M., Parton, R. G., Reber, G., de Maistre, E., Wahl, D., Kruithof, E. K., Gruenberg, J., & de Moerloose, P. (2000). Interaction of anti-phospholipid antibodies with late endosomes of human endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(2), 563-574. <https://doi.org/10.1161/01.atv.20.2.563>

Galvez, T., Gilleron, J., Zerial, M., & O'Sullivan, G. A. (2012). SnapShot : Mammalian Rab proteins in endocytic trafficking. *Cell*, 151(1), 234-234.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.013>

Garcia, D., & Erkan, D. (2018). Diagnosis and Management of the Antiphospholipid Syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 378(21), 2010-2021. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1705454>

Gardiner, C., Di Vizio, D., Sahoo, S., Théry, C., Witwer, K. W., Wauben, M., & Hill, A. F. (2016). Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles : Results of a worldwide survey. *Journal of Extracellular Vesicles*, 5, 32945. <https://doi.org/10.3402/jev.v5.32945>

Garnier, D., Magnus, N., Lee, T. H., Bentley, V., Meehan, B., Milsom, C., Montermini, L., Kislinger, T., & Rak, J. (2012). Cancer cells induced to express mesenchymal phenotype release exosome-like extracellular vesicles carrying tissue factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(52), 43565-43572. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.401760>

Gault, C. R., Obeid, L. M., & Hannun, Y. A. (2010). An overview of sphingolipid metabolism : From synthesis to breakdown. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 688, 1-23. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6741-1_1

Giri, P. K., & Schorey, J. S. (2008). Exosomes derived from M. Bovis BCG infected macrophages activate antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells *in vitro* and *in vivo*. *PloS One*, 3(6), e2461. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002461>

Goldstein, J. L., Brown, M. S., Anderson, R. G., Russell, D. W., & Schneider, W. J. (1985). Receptor-mediated endocytosis : Concepts emerging from the LDL receptor system. *Annual Review of Cell Biology*, 1, 1-39. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.01.110185.000245>

Grabner, G. F., Fawzy, N., Pribasnig, M. A., Trieb, M., Taschler, U., Holzer, M., Schweiger, M., Wolinski, H., Kolb, D., Horvath, A., Breinbauer, R., Rüllicke, T., Rabl, R., Lass, A., Stadlbauer, V., Hutter-Paier, B., Stauber, R. E., Fickert, P., Zechner, R., ... Zimmermann, R. (2019). Metabolic disease and ABHD6 alter the circulating bis(monoacylglycerol)phosphate profile in mice and humans. *Journal of Lipid Research*, 60(5), 1020-1031. <https://doi.org/10.1194/jlr.M093351>

Grabner, G. F., Fawzy, N., Schreiber, R., Pusch, L. M., Bulfon, D., Koefeler, H., Eichmann, T. O., Lass, A., Schweiger, M., Marsche, G., Schoiswohl, G., Taschler, U., & Zimmermann, R. (2020). Metabolic regulation of the lysosomal cofactor bis(monoacylglycerol)phosphate in mice. *Journal of Lipid Research*. <https://doi.org/10.1194/jlr.RA119000516>

Gruenberg, J. (2001). The endocytic pathway : A mosaic of domains. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(10), 721-730. <https://doi.org/10.1038/35096054>

Gruenberg, J. (2020). Life in the lumen: The multivesicular endosome. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 21(1), 76-93. <https://doi.org/10.1111/tra.12715>

Gruenberg, J., & van der Goot, F. G. (2006). Mechanisms of pathogen entry through the endosomal compartments. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 7(7), 495-504. <https://doi.org/10.1038/nrm1959>

Gurunathan, S., Kang, M.-H., & Kim, J.-H. (2021). A Comprehensive Review on Factors Influences Biogenesis, Functions, Therapeutic and Clinical Implications of Exosomes. *International Journal of Nanomedicine*, 16, 1281-1312. <https://doi.org/10.2147/IJN.S291956>

Hannun, Y. A., & Obeid, L. M. (2018). Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 19(3), 175-191. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.107>

Harding, C., Heuser, J., & Stahl, P. (1984). Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes : Demonstration of a pathway for receptor shedding. *European Journal of Cell Biology*, 35(2), 256-263.

Hayakawa, T., Makino, A., Murate, M., Sugimoto, I., Hashimoto, Y., Takahashi, H., Ito, K., Fujisawa, T., Matsuo, H., & Kobayashi, T. (2007). PH-dependent Formation of Membranous Cytoplasmic Body-Like Structure of Ganglioside GM1/Bis(Monoacylglycero)Phosphate Mixed Membranes. *Biophysical Journal*, 92(1), L13-L15. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.098657>

Henne, W. M., Buchkovich, N. J., & Emr, S. D. (2011). The ESCRT Pathway. *Developmental Cell*, 21(1), 77-91. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.05.015>

Holbrook, P. G., Pannell, L. K., Murata, Y., & Daly, J. W. (1992). Bis(monoacylglycero) phosphate from PC12 cells, a phospholipid that can comigrate with phosphatidic acid : Molecular species analysis by fast atom bombardment mass spectrometry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1125(3), 330-334. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(92\)90063-2](https://doi.org/10.1016/0005-2760(92)90063-2)

Holub, B. J., & Kuksis, A. (1969). Molecular species of phosphatidyl ethanolamine from egg yolk. *Lipids*, 4(6), 466-472. <https://doi.org/10.1007/BF02531026>

Holub, B. J., Kuksis, A., & Thompson, W. (1970). Molecular species of mono-, di-, and triphosphoinositides of bovine brain. *Journal of Lipid Research*, *11*(6), 558-564. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)42940-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)42940-2)

Hook, G. E. (1991). Alveolar proteinosis and phospholipidoses of the lungs. *Toxicologic Pathology*, *19*(4 Pt 1), 482-513. <https://doi.org/10.1177/019262339101900416>

Hostetler, K. (1982). *Chapter 6 Polyglycerophospholipids : Phosphatidylglycerol, diphosphatidylglycerol and bis (monoacylglycero) phosphate*. [https://doi.org/10.1016/S0167-7306\(08\)60010-1](https://doi.org/10.1016/S0167-7306(08)60010-1)

Hullin-Matsuda, F., Kawasaki, K., Delton-Vandenbroucke, I., Xu, Y., Nishijima, M., Lagarde, M., Schlame, M., & Kobayashi, T. (2007). De novo biosynthesis of the late endosome lipid, bis(monoacylglycero)phosphate. *Journal of Lipid Research*, *48*(9), 1997-2008. <https://doi.org/10.1194/jlr.M700154-JLR200>

Hullin-Matsuda, F., Luquain-Costaz, C., Bouvier, J., & Delton-Vandenbroucke, I. (2009). Bis(monoacylglycero)phosphate, a peculiar phospholipid to control the fate of cholesterol: Implications in pathology. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, *81*(5-6), 313-324. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2009.09.006>

Hullin-Matsuda, F., Taguchi, T., Greimel, P., & Kobayashi, T. (2014). Lipid compartmentalization in the endosome system. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *31*, 48-56. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.04.010>

Huotari, J., & Helenius, A. (2011). Endosome maturation. *The EMBO Journal*, *30*(17), 3481-3500. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.286>

Hurley, J. H. (2008). ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Current Opinion in Cell Biology*, *20*(1), 4-11. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.12.002>

Huterer, S., & Wherrett, J. (1979). *Metabolism of bis(monoacylglycero)phosphate in macrophages*. 8.

Huterer, S., & Wherrett, J. R. (1986). Incorporation of polyunsaturated fatty acids into bis(monoacylglycero) phosphate and other lipids of macrophages and of fibroblasts from control and Niemann-Pick patients. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, *876*(2), 318-326. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(86\)90290-0](https://doi.org/10.1016/0005-2760(86)90290-0)

Hyung, S., Jeong, J., Shin, K., Kim, J. Y., Yim, J.-H., Yu, C. J., Jung, H. S., Hwang, K.-G., Choi, D., & Hong, J. W. (2020). Exosomes derived from chemically induced human hepatic progenitors inhibit oxidative stress induced cell death. *Biotechnology and Bioengineering*, 117(9), 2658-2667. <https://doi.org/10.1002/bit.27447>

Ilnytska, O., Jeziorek, M., Lai, K., Altan-Bonnet, N., Dobrowolski, R., & Storch, J. (2021). Lysobisphosphatidic acid (LBPA) enrichment promotes cholesterol egress via exosomes in Niemann Pick type C1 deficient cells. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1866(6), 158916. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2021.158916>

Ilnytska, O., Lai, K., Gorshkov, K., Schultz, M. L., Tran, B. N., Jeziorek, M., Kunkel, T. J., Azaria, R. D., McLoughlin, H. S., Waghalter, M., Xu, Y., Schlame, M., Altan-Bonnet, N., Zheng, W., Lieberman, A. P., Dobrowolski, R., & Storch, J. (2021). Enrichment of NPC1-deficient cells with the lipid LBPA stimulates autophagy, improves lysosomal function, and reduces cholesterol storage. *The Journal of Biological Chemistry*, 297(1), 100813. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100813>

Infante, R. E., Wang, M. L., Radhakrishnan, A., Kwon, H. J., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (2008). NPC2 facilitates bidirectional transfer of cholesterol between NPC1 and lipid bilayers, a step in cholesterol egress from lysosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(40), 15287-15292. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807328105>

Itabashi, Y., & Kuksis, A. (1997). Reassessment of Stereochemical Configuration of Natural Phosphatidylglycerols by Chiral-Phase High-Performance Liquid Chromatography and Electrospray Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 254(1), 49-56. <https://doi.org/10.1006/abio.1997.2418>

Ito, M., Tchoua, U., Okamoto, M., & Tojo, H. (2002). Purification and Properties of a Phospholipase A2/Lipase Preferring Phosphatidic Acid, Bis(monoacylglycerol) Phosphate, and Monoacylglycerol from Rat Testis*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(46), 43674-43681. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202817200>

Izco, M., Blesa, J., Schleef, M., Schmeer, M., Porcari, R., Al-Shawi, R., Ellmerich, S., de Toro, M., Gardiner, C., Seow, Y., Reinares-Sebastian, A., Forcen, R., Simons, J. P., Bellotti, V., Cooper, J. M., & Alvarez-Erviti, L. (2019). Systemic Exosomal Delivery of shRNA

Minicircles Prevents Parkinsonian Pathology. *Molecular Therapy*, 27(12), 2111-2122. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.08.010>

Janowski, B. A., Grogan, M. J., Jones, S. A., Wisely, G. B., Kliewer, S. A., Corey, E. J., & Mangelsdorf, D. J. (1999). Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(1), 266-271. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.1.266>

Janowski, B. A., Willy, P. J., Devi, T. R., Falck, J. R., & Mangelsdorf, D. J. (1996). An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature*, 383(6602), 728-731. <https://doi.org/10.1038/383728a0>

Jansen, F., & Li, Q. (2017). Exosomes as Diagnostic Biomarkers in Cardiovascular Diseases. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 998, 61-70. https://doi.org/10.1007/978-981-10-4397-0_4

Jiang, Z., Liu, G., & Li, J. (2020). Recent Progress on the Isolation and Detection Methods of Exosomes. *Chemistry – An Asian Journal*, 15(23), 3973-3982. <https://doi.org/10.1002/asia.202000873>

Juhl, A. D., Lund, F. W., Jensen, M. L. V., Szomek, M., Heegaard, C. W., Guttmann, P., Werner, S., McNally, J., Schneider, G., Kapishnikov, S., & Wüstner, D. (2021). Niemann Pick C2 protein enables cholesterol transfer from endo-lysosomes to the plasma membrane for efflux by shedding of extracellular vesicles. *Chemistry and Physics of Lipids*, 235, 105047. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2020.105047>

Kaplan, M. J. (2021). Linking clotting and autoimmunity. *Science (New York, N.Y.)*, 371(6534), 1100-1101. <https://doi.org/10.1126/science.abg6449>

Khalyfa, A., Poroyko, V. A., Qiao, Z., Gileles-Hillel, A., Khalyfa, A. A., Akbarpour, M., Almendros, I., Farré, R., & Gozal, D. (2017). Exosomes and Metabolic Function in Mice Exposed to Alternating Dark-Light Cycles Mimicking Night Shift Work Schedules. *Frontiers in Physiology*, 8, 882. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00882>

Kinchen, J. M., & Ravichandran, K. S. (2010). Identification of two evolutionarily conserved genes regulating processing of engulfed apoptotic cells. *Nature*, 464(7289), 778-782. <https://doi.org/10.1038/nature08853>

Kobayashi, T., Beuchat, M. H., Lindsay, M., Frias, S., Palmiter, R. D., Sakuraba, H., Parton, R. G., & Gruenberg, J. (1999). Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport. *Nature Cell Biology*, *1*(2), 113-118. <https://doi.org/10.1038/10084>

Kobayashi, T., Beuchat, M.-H., Chevallier, J., Makino, A., Mayran, N., Escola, J.-M., Lebrand, C., Cosson, P., Kobayashi, T., & Gruenberg, J. (2002). Separation and characterization of late endosomal membrane domains. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(35), 32157-32164. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202838200>

Kobayashi, T., Stang, E., Fang, K. S., de Moerloose, P., Parton, R. G., & Gruenberg, J. (1998). A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature*, *392*(6672), 193-197. <https://doi.org/10.1038/32440>

Kobiyama, K., & Ley, K. (2018). Atherosclerosis. *Circulation Research*, *123*(10), 1118-1120. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313816>

Köffel, R., Meshcheryakova, A., Warszawska, J., Hennig, A., Wagner, K., Jörgl, A., Gubi, D., Moser, D., Hladik, A., Hoffmann, U., Fischer, M. B., van den Berg, W., Koenders, M., Scheinecker, C., Gesslbauer, B., Knapp, S., & Strobl, H. (2014). Monocytic cell differentiation from band-stage neutrophils under inflammatory conditions via MKK6 activation. *Blood*, *124*(17), 2713-2724. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-07-588178>

Kucharzewska, P., Christianson, H. C., Welch, J. E., Svensson, K. J., Fredlund, E., Ringnér, M., Mörgelin, M., Bourseau-Guilmain, E., Bengzon, J., & Belting, M. (2013). Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(18), 7312-7317. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220998110>

Kuksis, A., Breckenridge, W. C., Marai, L., & Stachnyk, O. (1969). Molecular species of lecithins of rat heart, kidney, and plasma. *Journal of Lipid Research*, *10*(1), 25-32.

Kuksis, A., & Marai, L. (1967). Determination of the complete structure of natural lecithins. *Lipids*, *2*(3), 217-224. <https://doi.org/10.1007/BF02532559>

Kuksis, A., Marai, L., Breckenridge, W. C., Gornall, D. A., & Stachnyk, O. (1968). Molecular species of lecithins of some functionally distinct rat tissues. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *46*(3), 511-524. <https://doi.org/10.1139/y68-075>

Kunjathoor, V. V., Febbraio, M., Podrez, E. A., Moore, K. J., Andersson, L., Koehn, S., Rhee, J. S., Silverstein, R., Hoff, H. F., & Freeman, M. W. (2002). Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(51), 49982-49988. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209649200>

Kwon, H. J., Abi-Mosleh, L., Wang, M. L., Deisenhofer, J., Goldstein, J. L., Brown, M. S., & Infante, R. E. (2009). Structure of N-terminal domain of NPC1 reveals distinct subdomains for binding and transfer of cholesterol. *Cell*, 137(7), 1213-1224. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.049>

Lai, R. C., Arslan, F., Lee, M. M., Sze, N. S. K., Choo, A., Chen, T. S., Salto-Tellez, M., Timmers, L., Lee, C. N., El Oakley, R. M., Pasterkamp, G., de Kleijn, D. P. V., & Lim, S. K. (2010). Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Research*, 4(3), 214-222. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2009.12.003>

Laulagnier, K., Motta, C., Hamdi, S., Roy, S., Fauvelle, F., Pageaux, J.-F., Kobayashi, T., Salles, J.-P., Perret, B., Bonnerot, C., & Record, M. (2004). Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *The Biochemical Journal*, 380(Pt 1), 161-171. <https://doi.org/10.1042/BJ20031594>

Le Blanc, I., Luyet, P.-P., Pons, V., Ferguson, C., Emans, N., Petiot, A., Mayran, N., Demareux, N., Fauré, J., Sadoul, R., Parton, R. G., & Gruenberg, J. (2005). Endosome-to-cytosol transport of viral nucleocapsids. *Nature Cell Biology*, 7(7), 653-664. <https://doi.org/10.1038/ncb1269>

Lebrand, C., Corti, M., Goodson, H., Cosson, P., Cavalli, V., Mayran, N., Fauré, J., & Gruenberg, J. (2002). Late endosome motility depends on lipids via the small GTPase Rab7. *The EMBO Journal*, 21(6), 1289-1300. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.6.1289>

Lecommandeur, E., Baker, D., Cox, T. M., Nicholls, A. W., & Griffin, J. L. (2017). Alterations in endo-lysosomal function induce similar hepatic lipid profiles in rodent models of drug-induced phospholipidosis and Sandhoff disease. *Journal of Lipid Research*, 58(7), 1306-1314. <https://doi.org/10.1194/jlr.M073395>

Leren, T. P. (2014). Sorting an LDL receptor with bound PCSK9 to intracellular degradation. *Atherosclerosis*, 237(1), 76-81. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.08.038>

Li, J., Chen, X., Yi, J., Liu, Y., Li, D., Wang, J., Hou, D., Jiang, X., Zhang, J., Wang, J., Zen, K., Yang, F., Zhang, C.-Y., & Zhang, Y. (2016). Identification and Characterization of 293T Cell-Derived Exosomes by Profiling the Protein, mRNA and MicroRNA Components. *PloS One*, 11(9), e0163043. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163043>

Li, P., Kaslan, M., Lee, S. H., Yao, J., & Gao, Z. (2017). Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics*, 7(3), 789-804. <https://doi.org/10.7150/thno.18133>

Libby, P., Buring, J. E., Badimon, L., Hansson, G. K., Deanfield, J., Bittencourt, M. S., Tokgözoğlu, L., & Lewis, E. F. (2019). Atherosclerosis. *Nature Reviews. Disease Primers*, 5(1), 56. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0106-z>

Linke, T., Wilkening, G., Lansmann, S., Moczall, H., Bartelsen, O., Weisgerber, J., & Sandhoff, K. (2001). Stimulation of acid sphingomyelinase activity by lysosomal lipids and sphingolipid activator proteins. *Biological Chemistry*, 382(2), 283-290. <https://doi.org/10.1515/BC.2001.035>

Linke, T., Wilkening, G., Sadeghlar, F., Moczall, H., Bernardo, K., Schuchman, E., & Sandhoff, K. (2001). Interfacial Regulation of Acid Ceramidase Activity : STIMULATION OF CERAMIDE DEGRADATION BY LYSOSOMAL LIPIDS AND SPHINGOLIPID ACTIVATOR PROTEINS*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(8), 5760-5768. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006846200>

Liscum, L., & Faust, J. R. (1989). The intracellular transport of low density lipoprotein-derived cholesterol is inhibited in Chinese hamster ovary cells cultured with 3-beta-[2-(diethylamino)ethoxy]androst-5-en-17-one. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(20), 11796-11806.

Liu, N., Tengstrand, E. A., Chourb, L., & Hsieh, F. Y. (2014). Di-22:6-bis(monoacylglycerol)phosphate : A clinical biomarker of drug-induced phospholipidosis for drug development and safety assessment. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 279(3), 467-476. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.06.014>

Llorente, A., Skotland, T., Sylvänne, T., Kauhanen, D., Róg, T., Orłowski, A., Vattulainen, I., Ekroos, K., & Sandvig, K. (2013). Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1831(7), 1302-1309. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2013.04.011>

Lobb, R. J., van Amerongen, R., Wiegmans, A., Ham, S., Larsen, J. E., & Möller, A. (2017). Exosomes derived from mesenchymal non-small cell lung cancer cells promote chemoresistance. *International Journal of Cancer*, 141(3), 614-620. <https://doi.org/10.1002/ijc.30752>

Lüllmann, H., Lüllmann-Rauch, R., & Wassermann, O. (1978). Lipidosis induced by amphiphilic cationic drugs. *Biochemical Pharmacology*, 27(8), 1103-1108. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(78\)90435-5](https://doi.org/10.1016/0006-2952(78)90435-5)

Lundmark, R., & Carlsson, S. R. (2004). Regulated membrane recruitment of dynamin-2 mediated by sorting nexin 9. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(41), 42694-42702. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407430200>

Luo, J., Yang, H., & Song, B.-L. (2020). Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 21(4), 225-245. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0190-7>

Luquain, C., Laugier, C., Lagarde, M., & Pageaux, J.-F. (2001). High-Performance Liquid Chromatography Determination of Bis(monoacylglycerol) Phosphate and Other Lysophospholipids. *Analytical Biochemistry*, 296(1), 41-48. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5158>

Luquain, C., R, D., Jm, E., C, L., M, L., & Jf, P. (2000). Bis(monoacylglycerol) phosphate in rat uterine stromal cells : Structural characterization and specific esterification of docosahexaenoic acid. *The Biochemical Journal*, 351 Pt 3(Pt 3). <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/11042136/>

Luquain-Costaz, C., Lefai, E., Arnal-Levron, M., Markina, D., Sakai, S., Euthine, V., Makino, A., Guichardant, M., Yamashita, S., Kobayashi, T., Lagarde, M., Moulin, P., & Delton-Vandenbroucke, I. (2013). Bis(monoacylglycerol)phosphate accumulation in macrophages induces intracellular cholesterol redistribution, attenuates liver-X receptor/ATP-Binding cassette transporter A1/ATP-binding cassette transporter G1 pathway, and impairs

cholesterol efflux. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(8), 1803-1811. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301857>

Luquain-Costaz, C., Rabia, M., Hullin-Matsuda, F., & Delton, I. (2020). Bis(monoacylglycero)phosphate, an important actor in the host endocytic machinery hijacked by SARS-CoV-2 and related viruses. *Biochimie*, 179, 247-256. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.10.018>

Luyet, P.-P., Falguières, T., Pons, V., Pattnaik, A. K., & Gruenberg, J. (2008). The ESCRT-I Subunit TSG101 Controls Endosome-to-Cytosol Release of Viral RNA. *Traffic*, 9(12), 2279-2290. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00820.x>

MacDonald, J. I., & Sprecher, H. (1991). Phospholipid fatty acid remodeling in mammalian cells. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1084(2), 105-121. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(91\)90209-z](https://doi.org/10.1016/0005-2760(91)90209-z)

Makino, A., Ishii, K., Murate, M., Hayakawa, T., Suzuki, Y., Suzuki, M., Ito, K., Fujisawa, T., Matsuo, H., Ishitsuka, R., & Kobayashi, T. (2006). D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol alters cellular cholesterol homeostasis by modulating the endosome lipid domains. *Biochemistry*, 45(14), 4530-4541. <https://doi.org/10.1021/bi052104y>

Marai, L., & Kuksis, A. (1969). Molecular species of lecithins from erythrocytes and plasma of man. *Journal of Lipid Research*, 10(2), 141-152. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)42660-4](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)42660-4)

Mariamenatu, A. H., & Abdu, E. M. (2021). Overconsumption of Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs) versus Deficiency of Omega-3 PUFAs in Modern-Day Diets : The Disturbing Factor for Their “Balanced Antagonistic Metabolic Functions” in the Human Body. *Journal of Lipids*, 2021, e8848161. <https://doi.org/10.1155/2021/8848161>

Marks, M. S., Woodruff, L., Ohno, H., & Bonifacino, J. S. (1996). Protein targeting by tyrosine- and di-leucine-based signals : Evidence for distinct saturable components. *The Journal of Cell Biology*, 135(2), 341-354. <https://doi.org/10.1083/jcb.135.2.341>

Martirosyan, A., Aminov, R., & Manukyan, G. (2019). Environmental Triggers of Autoreactive Responses : Induction of Antiphospholipid Antibody Formation. *Frontiers in Immunology*, 10, 1609. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01609>

Masson, E. (2009). *Métabolisme des lipides et des lipoprotéines chez l'homme*. EM-Consulte. <https://www.em-consulte.com/article/237743/metabolisme-des-lipides-et-des-lipoproteines-chez->

Matsuo, H., Chevallier, J., Mayran, N., Le Blanc, I., Ferguson, C., Fauré, J., Blanc, N. S., Matile, S., Dubochet, J., Sadoul, R., Parton, R. G., Vilbois, F., & Gruenberg, J. (2004). Role of LBPA and ALIX in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science (New York, N.Y.)*, *303*(5657), 531-534. <https://doi.org/10.1126/science.1092425>

Matsuzawa, Y., & Hostetler, K. Y. (1980). Studies on drug-induced lipidosis : Subcellular localization of phospholipid and cholesterol in the liver of rats treated with chloroquine or 4,4'-bis (diethylaminoethoxy)alpha, beta-diethyldiphenylethane. *Journal of Lipid Research*, *21*(2), 202-214.

McCauliff, L. A., Langan, A., Li, R., Ilnytska, O., Bose, D., Waghalter, M., Lai, K., Kahn, P. C., & Storch, J. (2019). Intracellular cholesterol trafficking is dependent upon NPC2 interaction with lysobisphosphatidic acid. *ELife*, *8*. <https://doi.org/10.7554/eLife.50832>

Meikle, P. J., Duplock, S., Blacklock, D., Whitfield, P. D., Macintosh, G., Hopwood, J. J., & Fuller, M. (2008). Effect of lysosomal storage on bis(monoacylglycero)phosphate. *Biochemical Journal*, *411*(1), 71-78. <https://doi.org/10.1042/BJ20071043>

Melki, I., Tessandier, N., Zufferey, A., & Boilard, E. (2017). Platelet microvesicles in health and disease. *Platelets*, *28*(3), 214-221. <https://doi.org/10.1080/09537104.2016.1265924>

Merchant, M. L., Rood, I. M., Deegens, J. K. J., & Klein, J. B. (2017). Isolation and characterization of urinary extracellular vesicles : Implications for biomarker discovery. *Nature reviews. Nephrology*, *13*(12), 731-749. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.148>

Mesens, N., Desmidt, M., Verheyen, G. R., Starckx, S., Damsch, S., De Vries, R., Verhemeldonck, M., Van Gompel, J., Lampo, A., & Lammens, L. (2012). Phospholipidosis in rats treated with amiodarone : Serum biochemistry and whole genome micro-array analysis supporting the lipid traffic jam hypothesis and the subsequent rise of the biomarker BMP. *Toxicologic Pathology*, *40*(3), 491-503. <https://doi.org/10.1177/0192623311432290>

Mesmin, B., & Maxfield, F. R. (2009). Intracellular sterol dynamics. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1791*(7), 636-645. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.03.002>

Miranda, A. M., Lasiecka, Z. M., Xu, Y., Neufeld, J., Shahriar, S., Simoes, S., Chan, R. B., Oliveira, T. G., Small, S. A., & Di Paolo, G. (2018). Neuronal lysosomal dysfunction releases exosomes harboring APP C-terminal fragments and unique lipid signatures. *Nature Communications*, 9(1), 291. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02533-w>

Miranda, A. M., & Paolo, G. D. (2018). Endolysosomal dysfunction and exosome secretion: Implications for neurodegenerative disorders. *Cell Stress*, 2(5), 115-118. <https://doi.org/10.15698/cst2018.05.136>

Mitterreiter, S., Page, R. M., Kamp, F., Hopson, J., Winkler, E., Ha, H.-R., Hamid, R., Herms, J., Mayer, T. U., Nelson, D. J., Steiner, H., Stahl, T., Zeitschel, U., Rossner, S., Haass, C., & Lichtenthaler, S. F. (2010). Bepidil and amiodarone simultaneously target the Alzheimer's disease beta- and gamma-secretase via distinct mechanisms. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(26), 8974-8983. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1199-10.2010>

Möbius, W., Ohno-Iwashita, Y., van Donselaar, E. G., Oorschot, V. M. J., Shimada, Y., Fujimoto, T., Heijnen, H. F. G., Geuze, H. J., & Slot, J. W. (2002). Immunoelectron microscopic localization of cholesterol using biotinylated and non-cytolytic perfringolysin O. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 50(1), 43-55. <https://doi.org/10.1177/002215540205000105>

Montecalvo, A., Larregina, A. T., Shufesky, W. J., Stolz, D. B., Sullivan, M. L. G., Karlsson, J. M., Baty, C. J., Gibson, G. A., Erdos, G., Wang, Z., Milosevic, J., Tkacheva, O. A., Divito, S. J., Jordan, R., Lyons-Weiler, J., Watkins, S. C., & Morelli, A. E. (2012). Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood*, 119(3), 756-766. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-338004>

Moore, K. J., Sheedy, F. J., & Fisher, E. A. (2013). Macrophages in atherosclerosis: A dynamic balance. *Nature Reviews. Immunology*, 13(10), 709-721. <https://doi.org/10.1038/nri3520>

Morissette, G., Ammoury, A., Rusu, D., Marguery, M. C., Lodge, R., Poubelle, P. E., & Marceau, F. (2009). Intracellular sequestration of amiodarone: Role of vacuolar ATPase and macroautophagic transition of the resulting vacuolar cytopathology. *British Journal of Pharmacology*, 157(8), 1531-1540. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00320.x>

Müller-Calleja, N., Hollerbach, A., Royce, J., Ritter, S., Pedrosa, D., Madhusudhan, T., Teifel, S., Meineck, M., Häuser, F., Canisius, A., Nguyen, T. S., Braun, J., Bruns, K., Etzold, A., Zechner, U., Strand, S., Radsak, M., Strand, D., Gu, J.-M., ... Ruf, W. (2021). Lipid presentation by the protein C receptor links coagulation with autoimmunity. *Science (New York, N.Y.)*, 371(6534), eabc0956. <https://doi.org/10.1126/science.abc0956>

Murray, J. W., Bananis, E., & Wolkoff, A. W. (2000). Reconstitution of ATP-dependent movement of endocytic vesicles along microtubules *in vitro*: An oscillatory bidirectional process. *Molecular Biology of the Cell*, 11(2), 419-433. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.2.419>

Navab, M., Ananthramaiah, G. M., Reddy, S. T., Van Lenten, B. J., Ansell, B. J., Fonarow, G. C., Vahabzadeh, K., Hama, S., Hough, G., Kamranpour, N., Berliner, J. A., Lusis, A. J., & Fogelman, A. M. (2004). The oxidation hypothesis of atherogenesis: The role of oxidized phospholipids and HDL. *Journal of Lipid Research*, 45(6), 993-1007. <https://doi.org/10.1194/jlr.R400001-JLR200>

Nishihara, M., Morii, H., & Koga, Y. (1982). Bis(monoacylglycero)phosphate in Alkalophilic Bacteria. *The Journal of Biochemistry*, 92(5), 1469-1479. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a134071>

Nkwe, D. O., Pelchen-Matthews, A., Burden, J. J., Collinson, L. M., & Marsh, M. (2016). The intracellular plasma membrane-connected compartment in the assembly of HIV-1 in human macrophages. *BMC Biology*, 14, 50. <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0272-3>

Nurminen, T. A., Holopainen, J. M., Zhao, H., & Kinnunen, P. K. J. (2002). Observation of topical catalysis by sphingomyelinase coupled to microspheres. *Journal of the American Chemical Society*, 124(41), 12129-12134. <https://doi.org/10.1021/ja017807r>

Ohya, T., Miaczynska, M., Coskun, Ü., Lommer, B., Runge, A., Drechsel, D., Kalaidzidis, Y., & Zerial, M. (2009). Reconstitution of Rab- and SNARE-dependent membrane fusion by synthetic endosomes. *Nature*, 459(7250), 1091-1097. <https://doi.org/10.1038/nature08107>

Okano, G., & Akino, T. (1979). Variations in the molecular species of lung phosphatidylglycerol. *Lipids*, 14(6), 541-546. <https://doi.org/10.1007/BF02533529>

Palmeri, S., Battisti, C., Malandrini, A., & Federico, A. (1995). Amiodarone induced lipidosis similar to Niemann-Pick C disease. Biochemical and morphological study. *Life Sciences*, 57(21), 1963-1971. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(95\)02129-7](https://doi.org/10.1016/0024-3205(95)02129-7)

Pan, B. T., & Johnstone, R. M. (1983). Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes *in vitro* : Selective externalization of the receptor. *Cell*, 33(3), 967-978. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90040-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90040-5)

Pathan, M., Keerthikumar, S., Chisanga, D., Alessandro, R., Ang, C.-S., Askenase, P., Batagov, A. O., Benito-Martin, A., Camussi, G., Clayton, A., Collino, F., Di Vizio, D., Falcon-Perez, J. M., Fonseca, P., Fonseka, P., Fontana, S., Ghossein, Y. S., Hendrix, A., Hoen, E. N.-'t, ... Mathivanan, S. (2017). A novel community driven software for functional enrichment analysis of extracellular vesicles data. *Journal of Extracellular Vesicles*, 6(1), 1321455. <https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1321455>

Pattanakitsakul, S., Pongswai, J., Kanlaya, R., Sinchaikul, S., Chen, S.-T., & Thongboonkerd, V. (2010). Association of ALIX with late endosomal lysobisphosphatidic acid is important for dengue virus infection in human endothelial cells. *Journal of Proteome Research*, 9(9), 4640-4648. <https://doi.org/10.1021/pr100357f>

Pegtel, D. M., & Gould, S. J. (2019). Exosomes. *Annual Review of Biochemistry*, 88, 487-514. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-111902>

Peinado, H., Zhang, H., Matei, I. R., Costa-Silva, B., Hoshino, A., Rodrigues, G., Psaila, B., Kaplan, R. N., Bromberg, J. F., Kang, Y., Bissell, M. J., Cox, T. R., Giaccia, A. J., Ertel, J. T., Hiratsuka, S., Ghajar, C. M., & Lyden, D. (2017). Pre-metastatic niches : Organ-specific homes for metastases. *Nature Reviews. Cancer*, 17(5), 302-317. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.6>

Pentchev, P. G., Brady, R. O., Blanchette-Mackie, E. J., Vanier, M. T., Carstea, E. D., Parker, C. C., Goldin, E., & Roff, C. F. (1994). The Niemann-Pick C lesion and its relationship to the intracellular distribution and utilization of LDL cholesterol. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1225(3), 235-243. [https://doi.org/10.1016/0925-4439\(94\)90001-9](https://doi.org/10.1016/0925-4439(94)90001-9)

Peplowska, K., Markgraf, D. F., Ostrowicz, C. W., Bange, G., & Ungermann, C. (2007). The CORVET Tethering Complex Interacts with the Yeast Rab5 Homolog Vps21 and Is

Involved in Endo-Lysosomal Biogenesis. *Developmental Cell*, 12(5), 739-750.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.03.006>

Peters, C., & von Figura, K. (1994). Biogenesis of lysosomal membranes. *FEBS Letters*, 346(1), 108-114. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)00499-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00499-4)

Pfriege, F. W., & Ungerer, N. (2011). Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. *Progress in Lipid Research*, 50(4), 357-371.
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.06.002>

Piccoli, E., Nadai, M., Caretta, C. M., Bergonzini, V., Del Vecchio, C., Ha, H. R., Bigler, L., Dal Zoppo, D., Faggin, E., Pettenazzo, A., Orlando, R., Salata, C., Calistri, A., Palù, G., & Baritussio, A. (2011). Amiodarone impairs trafficking through late endosomes inducing a Niemann-Pick C-like phenotype. *Biochemical Pharmacology*, 82(9), 1234-1249.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.07.090>

Pipalia, N. H., Subramanian, K., Mao, S., Ralph, H., Hutt, D. M., Scott, S. M., Balch, W. E., & Maxfield, F. R. (2017). Histone deacetylase inhibitors correct the cholesterol storage defect in most Niemann-Pick C1 mutant cells. *Journal of Lipid Research*, 58(4), 695-708.
<https://doi.org/10.1194/jlr.M072140>

Pisitkun, Trairak, Rong-Fong Shen, et Mark A. Knepper. 2004. « Identification and Proteomic Profiling of Exosomes in Human Urine ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (36): 13368-73.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0403453101>.

Platt, F. M., d'Azzo, A., Davidson, B. L., Neufeld, E. F., & Tiffit, C. J. (2018). Lysosomal storage diseases. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 27.
<https://doi.org/10.1038/s41572-018-0025-4>

Polo, S., Sigismund, S., Faretta, M., Guidi, M., Capua, M. R., Bossi, G., Chen, H., De Camilli, P., & Di Fiore, P. P. (2002). A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature*, 416(6879), 451-455.
<https://doi.org/10.1038/416451a>

Poorthuis, B. J., & Hostetler, K. Y. (1976). Studies on the subcellular localization and properties of bis(monoacylglyceryl)phosphate biosynthesis in rat liver. *The Journal of Biological Chemistry*, 251(15), 4596-4602.

Poorthuis, B. J., & Hostetler, K. Y. (1978). Conversion of diphosphatidylglycerol to bis(monoacylglyceryl)phosphate by lysosomes. *Journal of Lipid Research*, *19*(3), 309-315.

Poteryaev, D., Datta, S., Ackema, K., Zerial, M., & Spang, A. (2010). Identification of the Switch in Early-to-Late Endosome Transition. *Cell*, *141*(3), 497-508. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.011>

Praefcke, G. J. K., & McMahon, H. T. (2004). The dynamin superfamily : Universal membrane tubulation and fission molecules? *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *5*(2), 133-147. <https://doi.org/10.1038/nrm1313>

Pribasnig, M. A., Mrak, I., Grabner, G. F., Taschler, U., Knittelfelder, O., Scherz, B., Eichmann, T. O., Heier, C., Grumet, L., Kowaliuk, J., Romauch, M., Holler, S., Anderl, F., Wolinski, H., Lass, A., Breinbauer, R., Marsche, G., Brown, J. M., & Zimmermann, R. (2015). α/β Hydrolase Domain-containing 6 (ABHD6) Degrades the Late Endosomal/Lysosomal Lipid Bis(monoacylglycerol)phosphate. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(50), 29869-29881. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.669168>

Puthenveedu, M. A., & von Zastrow, M. (2006). Cargo regulates clathrin-coated pit dynamics. *Cell*, *127*(1), 113-124. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.035>

Rabia, M., Leuzy, V., Soulage, C., Durand, A., Fourmaux, B., Errazuriz-Cerda, E., Köffel, R., Draeger, A., Colosetti, P., Jalabert, A., Di Filippo, M., Villard-Garon, A., Bergerot, C., Luquain-Costaz, C., Moulin, P., Rome, S., Delton, I., & Hullin-Matsuda, F. (2020). Bis(monoacylglycerol)phosphate, a new lipid signature of endosome-derived extracellular vesicles. *Biochimie*. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.07.005>

Raiborg, C., Bache, K. G., Gillooly, D. J., Madshus, I. H., Stang, E., & Stenmark, H. (2002). Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes. *Nature Cell Biology*, *4*(5), 394-398. <https://doi.org/10.1038/ncb791>

Ramstedt, B., Leppimäki, P., Axberg, M., & Slotte, J. P. (1999). Analysis of natural and synthetic sphingomyelins using high-performance thin-layer chromatography. *European Journal of Biochemistry*, *266*(3), 997-1002. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00938.x>

Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J., & Geuze, H. J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *The Journal of Experimental Medicine*, *183*(3), 1161-1172. <https://doi.org/10.1084/jem.183.3.1161>

Reaves, B. J., Row, P. E., Bright, N. A., Luzio, J. P., & Davidson, H. W. (2000). Loss of cation-independent mannose 6-phosphate receptor expression promotes the accumulation of lysobisphosphatidic acid in multilamellar bodies. *Journal of Cell Science*, *113* (Pt 22), 4099-4108.

Record, M., Amara, S., Subra, C., Jiang, G., Prestwich, G. D., Ferrato, F., & Carrière, F. (2011). Bis (monoacylglycero) phosphate interfacial properties and lipolysis by pancreatic lipase-related protein 2, an enzyme present in THP-1 human monocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1811*(7-8), 419-430. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2011.04.008>

Record, M., Silvente-Poirot, S., Poirot, M., & Wakelam, M. J. O. (2018). Extracellular vesicles : Lipids as key components of their biogenesis and functions. *Journal of Lipid Research*, *59*(8), 1316-1324. <https://doi.org/10.1194/jlr.E086173>

Rieu, S., Géminard, C., Rabesandratana, H., Sainte-Marie, J., & Vidal, M. (2000). Exosomes released during reticulocyte maturation bind to fibronectin via integrin alpha4beta1. *European Journal of Biochemistry*, *267*(2), 583-590. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01036.x>

Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y., & Zerial, M. (2005). Rab Conversion as a Mechanism of Progression from Early to Late Endosomes. *Cell*, *122*(5), 735-749. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.043>

Robinson, M., Blank, M. L., & Snyder, F. (1985). Acylation of lysophospholipids by rabbit alveolar macrophages. Specificities of CoA-dependent and CoA-independent reactions. *The Journal of Biological Chemistry*, *260*(13), 7889-7895.

Rocha, N., Kuijl, C., van der Kant, R., Janssen, L., Houben, D., Janssen, H., Zwart, W., & Neefjes, J. (2009). Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7–RILP–p150Glued and late endosome positioning. *Journal of Cell Biology*, *185*(7), 1209-1225. <https://doi.org/10.1083/jcb.200811005>

Rodriguez-Paris, J. M., Nolta, K. V., & Steck, T. L. (1993). Characterization of lysosomes isolated from Dictyostelium discoideum by magnetic fractionation. *Journal of Biological Chemistry*, *268*(12), 9110-9116. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)52984-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)52984-7)

Roth, S. L., & Whittaker, G. R. (2011). Promotion of vesicular stomatitis virus fusion by the endosome-specific phospholipid bis(monoacylglycero)phosphate (BMP). *FEBS Letters*, 585(6), 865-869. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.02.015>

Rudenko, G., Henry, L., Henderson, K., Ichtchenko, K., Brown, M. S., Goldstein, J. L., & Deisenhofer, J. (2002). Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5602), 2353-2358. <https://doi.org/10.1126/science.1078124>

Salomon, C., & Rice, G. E. (2017). Chapter Six—Role of Exosomes in Placental Homeostasis and Pregnancy Disorders. In W. R. Huckle (Éd.), *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 145, p. 163-179). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2016.12.006>

Santolini, E., Puri, C., Salcini, A. E., Gagliani, M. C., Pelicci, P. G., Tacchetti, C., & Di Fiore, P. P. (2000). Numb is an endocytic protein. *The Journal of Cell Biology*, 151(6), 1345-1352. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.6.1345>

Scherer, M., Schmitz, G., & Liebisch, G. (2010). Simultaneous Quantification of Cardiolipin, Bis(monoacylglycero)phosphate and their Precursors by Hydrophilic Interaction LC–MS/MS Including Correction of Isotopic Overlap. *Analytical Chemistry*, 82(21), 8794-8799. <https://doi.org/10.1021/ac1021826>

Schlame, M., Brody, S., & Hostetler, K. Y. (1993). Mitochondrial cardiolipin in diverse eukaryotes. *European Journal of Biochemistry*, 212(3), 727-733. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb17711.x>

Schulze, H., Kolter, T., & Sandhoff, K. (2009). Principles of lysosomal membrane degradation : Cellular topology and biochemistry of lysosomal lipid degradation. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1793(4), 674-683. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.09.020>

Scott, C. C., & Gruenberg, J. (2011). Ion flux and the function of endosomes and lysosomes : PH is just the start: the flux of ions across endosomal membranes influences endosome function not only through regulation of the luminal pH. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 33(2), 103-110. <https://doi.org/10.1002/bies.201000108>

Scott, C. C., Vacca, F., & Gruenberg, J. (2014). Endosome maturation, transport and functions. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 31, 2-10. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.03.034>

Seaman, M. N. J. (2012). The retromer complex—Endosomal protein recycling and beyond. *Journal of Cell Science*, 125(Pt 20), 4693-4702. <https://doi.org/10.1242/jcs.103440>

Sekiya, M., Osuga, J.-I., Igarashi, M., Okazaki, H., & Ishibashi, S. (2011). The role of neutral cholesterol ester hydrolysis in macrophage foam cells. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 18(5), 359-364. <https://doi.org/10.5551/jat.7013>

Simbari, F., McCaskill, J., Coakley, G., Millar, M., Maizels, R. M., Fabriás, G., Casas, J., & Buck, A. H. (2016). Plasmalogen enrichment in exosomes secreted by a nematode parasite versus those derived from its mouse host : Implications for exosome stability and biology. *Journal of Extracellular Vesicles*, 5(1), 30741. <https://doi.org/10.3402/jev.v5.30741>

Sims, B., Farrow, A. L., Williams, S. D., Bansal, A., Krendelchtchikov, A., & Matthews, Q. L. (2018). Tetraspanin blockage reduces exosome-mediated HIV-1 entry. *Archives of Virology*, 163(6), 1683-1689. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3737-6>

Skotland, T., Sandvig, K., & Llorente, A. (2017). Lipids in exosomes : Current knowledge and the way forward. *Progress in Lipid Research*, 66, 30-41. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2017.03.001>

Somerharju, P., & Renkonen, O. (1980). Conversion of phosphatidylglycerol lipids to bis(monoacylglycero)phosphate *in vivo*. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 618(3), 407-419. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(80\)90259-3](https://doi.org/10.1016/0005-2760(80)90259-3)

Soppina, V., Rai, A. K., Ramaiya, A. J., Barak, P., & Mallik, R. (2009). Tug-of-war between dissimilar teams of microtubule motors regulates transport and fission of endosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(46), 19381-19386. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906524106>

Sorkin, A. (2004). Cargo recognition during clathrin-mediated endocytosis : A team effort. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(4), 392-399. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.06.001>

Stadler, K., Ha, H. R., Ciminale, V., Spirli, C., Saletti, G., Schiavon, M., Bruttomesso, D., Bigler, L., Follath, F., Pettenazzo, A., & Baritussio, A. (2008). Amiodarone Alters Late Endosomes and Inhibits SARS Coronavirus Infection at a Post-Endosomal Level. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 39(2), 142-149. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2007-0217OC>

Stegmayr, B., Brody, I., & Ronquist, G. (1982). A biochemical and ultrastructural study on the endogenous protein kinase activity of secretory granule membranes of prostatic origin in human seminal plasma. *Journal of Ultrastructure Research*, 78(2), 206-214. [https://doi.org/10.1016/s0022-5320\(82\)80024-5](https://doi.org/10.1016/s0022-5320(82)80024-5)

Stenmark, H., & Olkkonen, V. M. (2001). The Rab GTPase family. *Genome Biology*, 2(5), reviews3007.1-reviews3007.7.

Stinson, A. M., Wiegand, R. D., & Anderson, R. E. (1991). Fatty acid and molecular species compositions of phospholipids and diacylglycerols from rat retinal membranes. *Experimental Eye Research*, 52(2), 213-218. [https://doi.org/10.1016/0014-4835\(91\)90261-C](https://doi.org/10.1016/0014-4835(91)90261-C)

Strauss, K., Goebel, C., Runz, H., Möbius, W., Weiss, S., Feussner, I., Simons, M., & Schneider, A. (2010). Exosome secretion ameliorates lysosomal storage of cholesterol in Niemann-Pick type C disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(34), 26279-26288. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.134775>

Subra, C., Laulagnier, K., Perret, B., & Record, M. (2007). Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie*, 89(2), 205-212. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.10.014>

Sugiura, T., Masuzawa, Y., & Waku, K. (1988). Coenzyme A-dependent transacylation system in rabbit liver microsomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(33), 17490-17498.

Sung, B. H., von Lersner, A., Guerrero, J., Krystofiak, E. S., Inman, D., Pelletier, R., Zijlstra, A., Ponik, S. M., & Weaver, A. M. (2020). A live cell reporter of exosome secretion and uptake reveals pathfinding behavior of migrating cells. *Nature Communications*, 11(1), 2092. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15747-2>

Tan, H.-H., Makino, A., Sudesh, K., Greimel, P., & Kobayashi, T. (2012). Spectroscopic Evidence for the Unusual Stereochemical Configuration of an Endosome-Specific Lipid.

Angewandte Chemie International Edition, 51(2), 533-535.
<https://doi.org/10.1002/anie.201106470>

Tengstrand, E. A., Miwa, G. T., & Hsieh, F. Y. (2010). Bis(monoacylglycerol)phosphate as a non-invasive biomarker to monitor the onset and time-course of phospholipidosis with drug-induced toxicities. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 6(5), 555-570. <https://doi.org/10.1517/17425251003601961>

Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., & Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current Protocols in Cell Biology*, Chapter 3, Unit 3.22. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0322s30>

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., Ayre, D. C., Bach, J.-M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., ... Zuba-Surma, E. K. (2018). 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. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1), 1535750. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>

Thompson, K. L., Zhang, J., Stewart, S., Rosenzweig, B. A., Shea, K., Mans, D., & Colatsky, T. (2012). Comparison of urinary and serum levels of di-22:6-bis(monoacylglycerol)phosphate as noninvasive biomarkers of phospholipidosis in rats. *Toxicology Letters*, 213(2), 285-291. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.07.013>

Thompson, W., & MacDonald, G. (1975). Isolation and characterization of cytidine diphosphate diglyceride from beef liver. *Journal of Biological Chemistry*, 250(17), 6779-6785. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)40999-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)40999-X)

Thornburg, T., Miller, C., Thurent, T., King, L., & Waitet, M. (s. d.). *Glycerol Reorientation during the Conversion of Phosphatidylglycerol to Bis(monoacylglycerol)phosphate in Macrophage-like RAW 264.7 Cells*. 7.

Tkach, M., & Théry, C. (2016). Communication by Extracellular Vesicles : Where We Are and Where We Need to Go. *Cell*, 164(6), 1226-1232. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.043>

Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B., & Simons, M. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science (New York, N.Y.)*, *319*(5867), 1244-1247. <https://doi.org/10.1126/science.1153124>

Tsang, W., & Houlden, R. L. (2009). Amiodarone-induced thyrotoxicosis : A review. *Canadian Journal of Cardiology*, *25*(7), 421-424. [https://doi.org/10.1016/S0828-282X\(09\)70512-4](https://doi.org/10.1016/S0828-282X(09)70512-4)

Tycko, B., & Maxfield, F. R. (1982). Rapid acidification of endocytic vesicles containing α 2-macroglobulin. *Cell*, *28*(3), 643-651. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90219-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90219-7)

Underwood, K. W., Andemariam, B., McWilliams, G. L., & Liscum, L. (1996). Quantitative analysis of hydrophobic amine inhibition of intracellular cholesterol transport. *Journal of Lipid Research*, *37*(7), 1556-1568.

Vacca, F., Vossio, S., Mercier, V., Moreau, D., Johnson, S., Scott, C. C., Montoya, J. P., Moniatte, M., & Gruenberg, J. (2019). Cyclodextrin triggers MCOLN1-dependent endolysosome secretion in Niemann-Pick type C cells. *Journal of Lipid Research*, *60*(4), 832-843. <https://doi.org/10.1194/jlr.M089979>

Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, *9*(6), 654-659. <https://doi.org/10.1038/ncb1596>

van den Brink-van der Laan, E., Killian, J. A., & de Kruijff, B. (2004). Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1666*(1-2), 275-288. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.06.010>

Vanier, M. T. (2010). Niemann-Pick disease type C. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *5*, 16. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-5-16>

Vanier, M. T. (2015). Complex lipid trafficking in Niemann-Pick disease type C. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *38*(1), 187-199. <https://doi.org/10.1007/s10545-014-9794-4>

Vanier, M. T., Duthel, S., Rodriguez-Lafrasse, C., Pentchev, P., & Carstea, E. D. (1996). Genetic heterogeneity in Niemann-Pick C disease : A study using somatic cell hybridization and linkage analysis. *American Journal of Human Genetics*, 58(1), 118-125.

van Meer, G., Voelker, D. R., & Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids : Where they are and how they behave. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(2), 112-124. <https://doi.org/10.1038/nrm2330>

van Niel, G., D'Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(4), 213-228. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>

Verderio, C., Gabrielli, M., & Giussani, P. (2018). Role of sphingolipids in the biogenesis and biological activity of extracellular vesicles. *Journal of Lipid Research*, 59(8), 1325-1340. <https://doi.org/10.1194/jlr.R083915>

Verweij, Frederik Johannes, Maarten P. Bebelman, Connie R. Jimenez, Juan J. Garcia-Vallejo, Hans Janssen, Jacques Neefjes, Jaco C. Knol, et al. 2018. « Quantifying Exosome Secretion from Single Cells Reveals a Modulatory Role for GPCR Signaling ». *The Journal of Cell Biology* 217 (3): 1129-42. <https://doi.org/10.1083/jcb.201703206>.

Vihervaara, T., Uronen, R.-L., Wohlfahrt, G., Björkhem, I., Ikonen, E., & Olkkonen, V. M. (2011). Sterol binding by OSBP-related protein 1L regulates late endosome motility and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(3), 537-551. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0470-z>

Waite, M., King, L., Thornburg, T., Osthoff, G., & Thuren, T. Y. (1990). Metabolism of phosphatidylglycerol and bis(monoacylglycero)-phosphate in macrophage subcellular fractions. *Journal of Biological Chemistry*, 265(35), 21720-21726. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)45800-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)45800-0)

Waite, M., Roddick, V., Thornburg, T., King, L., & Cochran, F. (1987). Conversion of phosphatidylglycerol to lyso(bis)phosphatidic acid by alveolar macrophages. *The FASEB Journal*, 1(4), 318-325. <https://doi.org/10.1096/fasebj.1.4.3653583>

Walkley, S. U., & Vanier, M. T. (2009). Pathomechanisms in Lysosomal Storage Disorders. *Biochimica et biophysica acta*, 1793(4), 726-736. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.11.014>

Wang, J., Yao, Y., Wu, J., & Li, G. (2015). Identification and analysis of exosomes secreted from macrophages extracted by different methods. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(6), 6135-6142.

Welsch, S., Keppler, O. T., Habermann, A., Allespach, I., Krijnse-Locker, J., & Kräusslich, H.-G. (2007). HIV-1 buds predominantly at the plasma membrane of primary human macrophages. *PLoS Pathogens*, 3(3), e36. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030036>

Wherrett, J. R., & Huterer, S. (1972). Enrichment of bis-(monoacylglyceryl) phosphate in lysosomes from rat liver. *The Journal of Biological Chemistry*, 247(13), 4114-4120.

Wherrett, J. R., & Huterer, S. (1973). Bis-(monoacylglyceryl)-phosphate of rat and human liver: Fatty acid composition and NMR spectroscopy. *Lipids*, 8(9), 531-533. <https://doi.org/10.1007/BF02531989>

Wilhelm, Léa P., Catherine Tomasetto, et Fabien Alpy. 2016. « Touché! STARD3 and STARD3NL Tether the ER to Endosomes ». *Biochemical Society Transactions* 44 (2): 493-98. <https://doi.org/10.1042/BST20150269>.

Wilhelm, Léa P., Corinne Wendling, Benoît Védie, Toshihide Kobayashi, Marie-Pierre Chenard, Catherine Tomasetto, Guillaume Drin, et Fabien Alpy. 2017. « STARD3 Mediates Endoplasmic Reticulum-to-Endosome Cholesterol Transport at Membrane Contact Sites ». *The EMBO Journal* 36 (10): 1412-33. <https://doi.org/10.15252/emboj.201695917>.

Williams, K. J., & Tabas, I. (1995). The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 15(5), 551-561. <https://doi.org/10.1161/01.atv.15.5.551>

Willms, E., Johansson, H. J., Mäger, I., Lee, Y., Blomberg, K. E. M., Sadik, M., Alaarg, A., Smith, C. I. E., Lehtiö, J., El Andaloussi, S., Wood, M. J. A., & Vader, P. (2016). Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Scientific Reports*, 6, 22519. <https://doi.org/10.1038/srep22519>

Witwer, K. W., Buzás, E. I., Bemis, L. T., Bora, A., Lässer, C., Lötval, J., Nolte-’t Hoen, E. N., Piper, M. G., Sivaraman, S., Skog, J., Théry, C., Wauben, M. H., & Hochberg, F. (2013). Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2. <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.20360>

Wolf, P. (1967). The nature and significance of platelet products in human plasma. *British Journal of Haematology*, 13(3), 269-288. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x>

Wood, R., & Harlow, R. D. (1969a). Structural analyses of rat liver phosphoglycerides. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 135, 272-281. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(69\)90540-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(69)90540-2)

Wood, R., & Harlow, R. D. (1969b). Structural studies of neutral glycerides and phosphoglycerides of rat liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 131(2), 495-501. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(69\)90421-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(69)90421-4)

Wubbolts, R., Leckie, R. S., Veenhuizen, P. T. M., Schwarzmann, G., Möbius, W., Hoernschemeyer, J., Slot, J.-W., Geuze, H. J., & Stoorvogel, W. (2003). Proteomic and Biochemical Analyses of Human B Cell-derived Exosomes : POTENTIAL IMPLICATIONS FOR THEIR FUNCTION AND MULTIVESICULAR BODY FORMATION*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(13), 10963-10972. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207550200>

Yabuuchi, H., & O'Brien, J. S. (1968). Positional distribution of fatty acids in glycerophosphatides of bovine gray matter. *Journal of Lipid Research*, 9(1), 65-67. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)43144-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)43144-X)

Yamamoto, A., Adachi, S., Kitani, T., Shinji, Y., & Seki, K. (1971). Drug-induced lipidosis in human cases and in animal experiments. Accumulation of an acidic glycerophospholipid. *Journal of Biochemistry*, 69(3), 613-615.

Yamamoto, A., Adachi, S., Matsuzawa, Y., Kitani, T., Hiraoka, A., & Seki, K. (1976). Studies on drug-induced lipidosis: VII. Effects of bis-beta-diethyl-aminoethylether of hexestrol, chloroquine, homochlorocyclizine, prenylamine, and diazacholesterol on the lipid composition of rat liver and kidney. *Lipids*, 11(8), 616-622. <https://doi.org/10.1007/BF02532875>

Yamamoto, T., Kosaka, N., & Ochiya, T. (2019). Latest advances in extracellular vesicles : From bench to bedside. *Science and Technology of Advanced Materials*, 20(1), 746-757. <https://doi.org/10.1080/14686996.2019.1629835>

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., Colás, E., Silva, A. C., Fais, S., Falcon-

Perez, J. M., Ghobrial, I. M., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., ... De Wever, O. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>

Yu, D., Swaroop, M., Wang, M., Baxa, U., Yang, R., Yan, Y., Coksaygan, T., DeTolla, L., Marugan, J. J., Austin, C. P., McKew, J. C., Gong, D.-W., & Zheng, W. (2014). Niemann-Pick Disease Type C : Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neuronal Cells for Modeling Neural Disease and Evaluating Drug Efficacy. *Journal of Biomolecular Screening*, 19(8), 1164-1173. <https://doi.org/10.1177/1087057114537378>

Yu, X.-H., Jiang, N., Yao, P.-B., Zheng, X.-L., Cayabyab, F. S., & Tang, C.-K. (2014). NPC1, intracellular cholesterol trafficking and atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 429, 69-75. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.11.026>

Zaitseva, E., Yang, S.-T., Melikov, K., Pourmal, S., & Chernomordik, L. V. (2010). Dengue Virus Ensures Its Fusion in Late Endosomes Using Compartment-Specific Lipids. *PLOS Pathogens*, 6(10), e1001131. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001131>

Zanoni, P., Velagapudi, S., Yalcinkaya, M., Rohrer, L., & von Eckardstein, A. (2018). Endocytosis of lipoproteins. *Atherosclerosis*, 275, 273-295. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.06.881>

Zeringer, E., Li, M., Barta, T., Schageman, J., Pedersen, K. W., Neurauter, A., Magdaleno, S., Setterquist, R., & Vlassov, A. V. (2013). Methods for the extraction and RNA profiling of exosomes. *World Journal of Methodology*, 3(1), 11-18. <https://doi.org/10.5662/wjm.v3.i1.11>

Zhang, X., Liu, L., Tang, M., Li, H., Guo, X., & Yang, X. (2020). The effects of umbilical cord-derived macrophage exosomes loaded with cisplatin on the growth and drug resistance of ovarian cancer cells. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 46(7), 1150-1162. <https://doi.org/10.1080/03639045.2020.1776320>

Zhang, Y., Han, T., Feng, D., Li, J., Wu, M., Peng, X., Wang, B., Zhan, X., & Fu, P. (2020). Screening of non-invasive miRNA biomarker candidates for metastasis of gastric cancer by small RNA sequencing of plasma exosomes. *Carcinogenesis*, 41(5), 582-590. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgz186>

Zhou, H., Yuen, P. S. T., Pisitkun, T., Gonzales, P. A., Yasuda, H., Dear, J. W., Gross, P., Knepper, M. A., & Star, R. A. (2006). Collection, storage, preservation, and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery. *Kidney International*, 69(8), 1471-1476. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5000273>

Zhou, W., Woodson, M., Sherman, M. B., Neelakanta, G., & Sultana, H. (2019). Exosomes mediate Zika virus transmission through SMPD3 neutral Sphingomyelinase in cortical neurons. *Emerging Microbes & Infections*, 8(1), 307-326. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1578188>

Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., & Amigorena, S. (1998). Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: Dendritic cell-derived exosomes. *Nature Medicine*, 4(5), 594-600. <https://doi.org/10.1038/nm0598-594>

Autres types de références

Bouvier : Bouvier Jérôme. Bis(Monoacylglycéro)Phosphate, acide docosahexaénoïque et cholestérol : Relations métaboliques et fonctionnelles dans les macrophages. INSA de Lyon, 2008. Français

FRM: <https://www.frm.org/recherches-maladies-cardiovasculaires/atherosclerose/focus-atherosclerose>

Laboratoire CarMeN : <http://carmen.univ-lyon1.fr/>

Lipid maps: <https://www.lipidmaps.org/>

Arnal : Maud Arnal. Bis(Monoacylglycéro)Phosphate, oxystérols et ORP11 : un trio régulateur du trafic du cholestérol dans les macrophages. Biochimie [q-bio.BM]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français.

NSFA : <https://www.nsfa.asso.fr/patients/atherosclerose-nous-sommes-tous-concernes/>

PPT Servier : https://smart.servier.com/smart_image/lipoprotein/

WHO (Organisation mondiale de la santé/*World Health Organization*): [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))



FOLIO ADMINISTRATIF

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON OPEREE AU SEIN DE L'INSA LYON

NOM : RABIA

DATE de SOUTENANCE : 8 décembre 2021

Prénoms : Maxence

TITRE : Rôle d'un phospholipide spécifique des endosomes, le bis(monoacylglycéro)phosphate, dans le trafic vésiculaire endosomal - implication dans les dyslipidémies.

NATURE : Doctorat

Numéro d'ordre : 2021LYSEI098

Ecole doctorale : ED 205 : Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences Santé EDISS

Spécialité : Biochimie

RESUME :

Les cellules eucaryotes contiennent un système endolysosomal très organisé de compartiments membranaires communiquant entre eux et avec l'extérieur. L'identité de ces organelles est définie par des protéines ou des lipides caractéristiques présents à leur surface ou leur lumen. La voie d'endocytose joue un rôle central dans l'homéostasie cellulaire non seulement en permettant à la cellule d'internaliser des composés de l'extérieur, mais aussi en régulant l'utilisation, la dégradation et le recyclage des lipides et protéines. Le cholestérol va ainsi être distribué dans la cellule via les endolysosomes. Ce trafic intracellulaire est finement régulé, néanmoins il existe des dysfonctionnements endosomaux génétiques, alimentaires ou médicamenteux. Ces maladies de surcharge lysosomale entraînent une accumulation de lipides et de protéines dans les endolysosomes, conduisant à des perturbations métaboliques, des retards neuro-moteurs ou des décès précoces.

Le Bis(monoacylglycéro)phosphate (BMP) est un phospholipide atypique uniquement présent dans les endolysosomes, en particulier au niveau des vésicules internes endosomales. Ce lipide joue des rôles essentiels dans la voie endosomale, en participant à la sortie du cholestérol des endosomes et en régulant des enzymes du métabolisme lipidique. Cette thèse étudie son rôle dans le trafic vésiculaire endosomal. En effet, le BMP en permettant la fusion membranaire participe à la dynamique membranaire intraendosomale, favorisant ainsi la sortie du cholestérol des endosomes, et la formation des vésicules intraendosomales à l'origine des vésicules extracellulaires/exosomes.

Cette thèse a permis de caractériser le BMP, comme biomarqueur urinaire de dysfonctionnement endolysosomal induit par l'anti-arythmique amiodarone chez l'homme. De plus, le BMP a été détecté dans des exosomes provenant de différents modèles biologiques ce qui permet d'envisager son utilisation comme marqueur de l'origine endosomale des vésicules extracellulaires. Enfin, le rôle du BMP dans la formation des exosomes permettant le désengorgement des endosomes lors de surcharges endolysosomales a été étudié. Nos travaux suggèrent donc l'importance du BMP dans le contrôle de l'homéostasie lipidique en participant à la formation des vésicules extracellulaires/exosomes et son potentiel intérêt thérapeutique au cours des dyslipidémies.

Laboratoire (s) de recherche : Laboratoire CarMeN

Directeur de thèse:

Delton Isabelle	Professeur des Universités	INSA-Lyon	Directrice de thèse
Hullin-Matsuda Françoise	Chargé de Recherche	INSERM	Co-directrice de thèse

Président de jury : Collet Xavier	Directeur de Recherche	INSERM	Examineur
--------------------------------------	------------------------	--------	-----------

Composition du jury :

Alpy, Fabien	Chargé de Recherche	INSERM	Rapporteur
Van Niel, Guillaume	Directeur de Recherche	CNRS	Rapporteur
Delton Isabelle	Professeur des Universités	INSA-Lyon	Directrice de thèse
Hullin-Matsuda Françoise	Chargé de Recherche	INSERM	Co-directrice de thèse