



HAL
open science

Caractérisation des vésicules extracellulaires et étude de leur rôle dans la neuropathologie de la mucopolysaccharidose de type III

Chloé Dias

► **To cite this version:**

Chloé Dias. Caractérisation des vésicules extracellulaires et étude de leur rôle dans la neuropathologie de la mucopolysaccharidose de type III. Médecine humaine et pathologie. Université de Toulouse, 2024. Français. NNT : 2024TLSES084 . tel-04717148

HAL Id: tel-04717148

<https://theses.hal.science/tel-04717148v1>

Submitted on 1 Oct 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.

Doctorat de l'Université de Toulouse

préparé à l'Université Toulouse III - Paul Sabatier

Caractérisation des vésicules extracellulaires et étude de leur
rôle dans la neuropathologie de la mucopolysaccharidose de
type III

Thèse présentée et soutenue, le 19 juin 2024 par
Chloé DIAS

École doctorale

BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies

Spécialité

NEUROSCIENCES

Unité de recherche

INFINITY - Institut Toulousain des Maladies Infectieuses et Inflammatoires

Thèse dirigée par

Jérôme AUSSEIL et Stéphanie TRUDEL-AUSSEIL

Composition du jury

Mme Hélène HIRBEC, Rapporteur, CNRS Occitanie Est

M. Sylvain LEHMANN, Rapporteur, Université de Montpellier

M. Christophe LEFEBVRE, Rapporteur, Université de Lille

Mme Cécile MALNOU, Examinatrice, Université Toulouse III - Paul Sabatier

M. Kumaran DEIVA, Examineur, Université Paris-Saclay

M. Jérôme AUSSEIL, Directeur de thèse, Université Toulouse III - Paul Sabatier

Mme Stéphanie TRUDEL-AUSSEIL, Co-directrice de thèse, Université Toulouse III - Paul Sabatier

*A mon père,
Cette personne formidable qui m'a inculqué la valeur inestimable de la curiosité et du savoir.*

« La meilleure façon de réaliser ses rêves est de se réveiller. »
PAUL VALÉRY

— REMERCIEMENTS —

Cette thèse est l'aboutissement de 3 années et demie de travaux de recherche et de nombreux échanges scientifiques. Je suis extrêmement reconnaissante et fière d'avoir pu vivre cette aventure hors du commun. Il m'aurait été impossible de la traverser sans l'aide et le soutien de toutes ces personnes que je souhaite remercier à présent.

Mesdames et messieurs les membres de mon jury de thèse, je vous remercie de m'avoir fait l'honneur d'évaluer mes travaux de thèse. Merci à Christophe Lefebvre, Hélène Hirbec et Sylvain Lehmann d'avoir accepté d'endosser le rôle de rapporteur et de l'avoir accompli avec attention, rigueur et bienveillance. Merci à Kumaran Deiva d'avoir examiné mes travaux, cette fois achevés, et ce avec grand intérêt. Merci à Cécile Malnou d'avoir présidé ce jury de thèse de manière remarquable et je dois dire que je suis très touchée d'avoir été la première à en avoir l'honneur. Je vous remercie tous sincèrement pour la richesse de la discussion que nous avons eue et qui participera sans nul doute à la bonne poursuite de ces recherches.

Les membres de mon comité de suivi de thèse, Kumaran Deiva, Chiara Guerrera, Corinne Leprince et Daniel Dunia, merci de m'avoir apporté votre expertise et votre aide essentielles au bon déroulement de mes travaux. J'ai toujours pris plaisir à vous exposer mon projet et à discuter de mes résultats lors de nos rencontres annuelles, qui ont participé à mon évolution scientifique. Un merci tout particulier à Daniel qui a été un parrain affectueux, très attentif et soucieux de l'avancée de mon projet, mais aussi et surtout de mon bien être au sein de l'équipe et de l'institut.

Nos collaborateurs, Alexey Pshezhetsky et Mahsa Taherzadeh du laboratoire Elisa Linton du CHU Sainte-Justine à Montréal, merci pour le partage de vos données de séquençage. Je tiens à remercier l'ensemble des membres de l'équipe Vinedys d'Infinity qui m'a beaucoup apporté tout au long de ma thèse. Merci au groupe EVs avec Cécile Malnou, Hélène Martin, Mathilde Bergamelli et Charlène Martin, pour vos conseils, le partage de votre expertise aux prémices de mon projet ainsi que pour l'entre-aide lors de nos galères avec le NTA ou les ultras. Merci au groupe neuro avec Elsa Suberbielle, Benjamin Schmitt et Daniel Dunia, pour votre partage de votre savoir-faire concernant la culture de neurones. Merci à Cathy Gomila du laboratoire MP3CV d'Amiens, mais aussi à Armelle et Laurie du service de biochimie du CHU de Toulouse pour leur aide lors de notre mise en place de la technique d'extraction des GAGs au laboratoire. Un grand merci à Emily Clement, Laurence Nieto et Evert Haanapple de l'IPBS qui m'ont formée à l'utilisation du NTA et m'ont permis son utilisation pendant plusieurs mois.

L'ensemble des personnes représentant les services communs et les plateaux techniques de l'institut Infinity, sans qui la recherche serait impossible. Merci infiniment aux filles de la zootechnie, Elisabeth Debon, Fanny Chaboud et Elsa Bodin pour leur travail et leur implication dans le suivi de mes accouplements de souris. Merci au plateau de génomique et de transcriptomique mais surtout à Adeline Chaubet qui a réalisé l'ensemble de nos librairies et de nos contrôles qualités d'ARN et aussi à Margot Zahm qui a réalisé nos analyses bio-informatiques et qui a été d'une patience et d'une pédagogie incroyable. Merci à vous deux qui avez su écouter et évaluer toutes nos demandes plus ou moins farfelues. Merci à Sophie Allart, Simon Lachambre et Lhorane Lobjois du plateau d'imagerie cellulaire pour votre disponibilité et pour l'intérêt que vous avez porté à mon projet de thèse.

Les personnes représentant les plateaux techniques hors Infinity, qui ont permis l'obtention de données indispensables à l'accomplissement de ce projet. Merci à Stéphanie Balor et Vanessa Soldan du plateau de microscopie électronique du CBI pour la formation que vous m'avez proposée et pour l'analyse d'échantillons. Merci à Chiara Guerrera, Kévin Roger et Cerina Chhuon du plateau de protéomique SFR Necker à Paris pour la réalisation de l'analyse protéomique ainsi que pour votre aide et vos conseils précieux dans l'analyse bio-informatique des données.

Mes directeurs de thèse, pour la chance qu'ils m'ont donnée de réaliser cette thèse dans leur équipe. Merci à tous les deux de m'avoir accordé votre confiance dès le premier jour et votre soutien jusqu'au dernier. Dès l'entretien j'ai su que j'avais fait le bon choix en vous envoyant cette candidature, mais je ne m'attendais pas à être si bien accueillie, dirigée et épaulée. Grâce à vous deux, je peux dire que j'ai grandi et gagné en maturité scientifique et qu'aujourd'hui je commence à me prendre au rôle de chercheuse. Merci Jérôme d'avoir cru en moi et de m'avoir toujours poussée hors de ma zone de confort en m'envoyant en congrès internationaux présenter mes travaux ou en me donnant des responsabilités. Merci beaucoup pour votre gentillesse et d'avoir toujours fait en sorte que je me sente bien et que je ne manque de rien au laboratoire. Merci Stéphanie d'être la personne et la scientifique que tu es. Tu es un véritable modèle pour moi, tant par ton exigence et ton sérieux que par ta douceur et ton soutien. Cela a été un immense plaisir de travailler à tes côtés et je pense que beaucoup gagneraient à travailler avec toi, car je suis fière de dire que j'ai eu cette chance. Tu as su développer mon esprit scientifique tout en me laissant une grande liberté de réflexion et d'expérimentation, et pour ça tu as toute ma gratitude. Et de par ton investissement permanent, j'ai pu évoluer et me forger, appréhender et me préparer à chaque nouvelle étape. Puis, célébrer les bons moments ou apprendre à relativiser lors des mauvais. Tout cela a permis qu'un lien indescriptible se crée entre nous, un lien qui ne pourrait être décrit en un simple

paragraphe dans mes remerciements. Merci ma cheffe, j'espère de tout cœur avoir l'opportunité de continuer de travailler avec toi dans les années à venir.

Mes premiers encadrants de stage, Sara Salinas et Franck Mennechet qui m'ont transmis leur amour pour la science, m'ont guidée durant mes premières années de paillasse et d'université et qui m'ont ouvert l'esprit sur le monde de la recherche. Je garde de vous un souvenir impérissable et je vous remercie pour tout ce que vous avez fait pour moi.

Les membres de l'équipe de biologie cellulaire de la pathogénie bactérienne du MMSB de Lyon, Suzana Salcedo, Tristan Rubio, Morgane Roussin, Julie Raymond, Arthur Louche et Amandine Blanco, merci pour votre accueil et pour les bons moments passés ensemble. Un merci tout particulier à Tristan et Suzana qui m'ont permis de retrouver le chemin du laboratoire et m'ont soutenue dans mon souhait de réaliser une thèse.

Mes stagiaires, Katia, Guillaume, Camille, Naomi et Tiphaine, merci pour votre travail sérieux qui a contribué à l'accomplissement de ce projet. Merci Katia pour ton investissement dans ce projet, ta détermination et ton éternelle envie de bien faire. J'ai pris beaucoup de plaisir à t'encadrer et à partager tous ces moments avec toi au labo ou en congrès. J'ai hâte de découvrir ce que ton projet de thèse te réserve.

Nissrine, mon binôme, mon pilier. Après un petit flash-back, je me rends aisément compte que vivre sans toi au laboratoire aurait été inimaginable. Et quelle aventure ensemble ! Manips, souris, tris, organisations, présentations, voyages, comité des fêtes... and repeat. J'ai rencontré un esprit unique, brillant, pur, et déterminé, qui m'a tant appris. Merci d'être cette amie en or.

L'ensemble des membres de l'équipe RP/JA, qui m'ont fait me sentir chez moi dès le premier jour et avec qui j'ai tant partagé. Merci à Rémy, Yannick, Fabienne, Michel, Séverine, Hugues, Isabelle, et Jean-Pierre pour votre aide précieuse, votre esprit critique, votre bienveillance et pour toutes les discussions scientifiques que nous avons pu avoir ensemble. Merci à Saber, Ranime, Nicolas et Nissrine, mon premier noyau d'amis du laboratoire, pour vos rires, votre écoute, votre bêtise et votre amitié. J'ai tant aimé vous découvrir, traverser ces années avec vous, et maintenant j'en espère de nouvelles. Merci à Emily, Camille, Mélissa, Katia, et Lisaydi qui ont apporté un vent nouveau dans l'équipe. Votre arrivée a fait qu'à nous tous réunis cette équipe est vraiment incroyable. Je suis heureuse d'avoir encore un peu de temps parmi vous tous, car je côtoie chaque jour des personnes extraordinaires.

L'ensemble des membres de l'équipe OJVM, avec qui j'ai passé des moments géniaux. Je suis encore triste du jour de votre départ du bâtiment A. Un merci tout particulier à Sarah et Sylvia, pour leur soutien et leur amitié précieuse.

L'ensemble des personnes de l'institut Infinity, que j'ai eu la chance de croiser et qui ont rendu cette expérience agréable. Merci.

Mes amis, de toujours, Cécile, Mathilde, Anthéa, Camille, Marie-Clémentine, Pauline, Mathilde, Benjamin, Angéline, Jason, merci de faire encore partie de ma vie après toutes ces années à me supporter, et à me soutenir. Merci de toujours répondre présents dans les moments importants de ma vie et de me donner à travers votre confiance toute cette assurance. Je suis fier d'avoir des amis comme vous, chacun si spécial. Il m'est impossible d'imaginer ma vie sans vous à mes côtés, car avec vous j'ai appris la vraie définition d'amitié.

Mes grands-pères, Gérard et Alvaro qui m'ont transmis la valeur du travail et des sacrifices, mais aussi leur tendresse. Merci d'avoir été des moteurs et des exemples tout au long de ma scolarité et d'avoir toujours cru en mes capacités, ma motivation et mon avenir. Je suis fier de vous dire aujourd'hui : « J'ai réussi, je suis docteur ! »

Maman et Papa, quelle chance inestimable de vous avoir comme parents. Votre éducation et votre amour est le plus grand des cadeaux que j'ai reçu de ma vie. J'ai toujours aspiré à faire votre fierté, à vous ressembler et à vous rendre un petit peu de tout ce que vous m'avez apporté. Merci Maman pour m'avoir transmis ton goût pour la biologie et la paillasse, ton ingéniosité et ta ténacité. Tu aurais fait une incroyable scientifique ! Merci Papa d'être passionné par tout et curieux de tout, d'avoir cette intelligence sans faille et cette soif de connaissance insatiable. Cette envie de découverte m'a tellement toujours fascinée et attirée que me voilà chercheuse ! Merci de m'avoir toujours poussée à donner le meilleur de moi-même. Je vous aime.

Teddy, mon meilleur ami et l'amour de ma vie. Merci pour ton amour, ton soutien et ton sourire. Sans toi, rien n'aurait été possible. Tu as su me relever lorsque j'étais au plus bas, me convaincre que je valais le coup, me suivre et m'encourager au cours de chaque nouvelle étape. J'espère être à la hauteur de tout ce que tu m'apportes au quotidien. Merci d'exister. Je t'aime.

RÉSUMÉ

Caractérisation des vésicules extracellulaires et étude de leur rôle dans la neuropathologie de la mucopolysaccharidose de type III

La mucopolysaccharidose de type III (MPS III) ou syndrome de Sanfilippo est une maladie pédiatrique rare, d'origine génétique, dite de surcharge lysosomale (MSL) et causée par le déficit en enzymes impliquées dans la dégradation de l'héparane sulfate. Le diagnostic tardif et l'absence de traitement curatif entraînent le décès de l'enfant avant l'âge adulte. Cependant les derniers essais cliniques de thérapie génique chez des enfants atteints de MPS III de type B ont donné des résultats prometteurs. L'accumulation progressive d'oligosaccharides d'héparane sulfate (HSOs) anormaux et partiellement dégradés dans le milieu extracellulaire, active directement la production de cytokines pro-inflammatoires par les astrocytes et la microglie. La mise en place précoce d'une neuroinflammation chronique conduit progressivement à la mort neuronale, à l'origine de troubles neurodégénératifs sévères et irréversibles.

Les mécanismes cellulaires liés à la propagation de la neuroinflammation ne sont pas encore élucidés, et une des hypothèses est qu'elle pourrait être médiée par la sécrétion de vésicules extracellulaires (EVs). Chez l'adulte atteint de troubles neurodégénératifs, des travaux récents ont démontré que les EVs provenant de cellules activées et notamment de la microglie, sont chargées d'un contenu moléculaire pathologique spécifique et suscitent un vif intérêt lié à leur utilisation comme biomarqueurs. L'objectif de mon projet de thèse est d'investiguer la contribution des EVs dans la physiopathologie de la MPS III, par i) l'analyse de la composition en protéines et en ARNs des EVs-MPS III et ii) l'évaluation de la réponse biologique des neurones corticaux primaires naïfs au message transmis par ces EVs-MPS III. Dans ce but, j'ai isolé et étudié les EVs provenant de deux modèles de la maladie, le surnageant d'une lignée microgliale activée avec des HSOs de patients MPS III et les tissus cérébraux du modèle murin MPS IIIB.

Par l'analyse de la composition en protéines et micro ARNs des EVs, j'ai pu mettre en évidence que les EVs-MPS III transmettent aux cellules réceptrices du système nerveux central (SNC) un cargo altéré et spécifique impliqué dans la réponse inflammatoire et dans le développement neuronal. Ensuite, grâce à des expériences de transmission des EVs-MPS III sur des neurones sauvages corticaux primaires, j'ai pu démontrer, par microscopie à fluorescence, que la morphologie des compartiments somato-dendritiques est fortement altérée. Ensuite, en utilisant des EVs isolés de cerveaux de souris MPS IIIB âgées de 1 mois, 4 mois et 8 mois, j'ai montré que les EVs induisaient une signature transcriptionnelle des neurones différente en fonction des stades de la maladie.

En résumé, ces résultats suggèrent fortement que chez les patients atteints du syndrome de Sanfilippo, les EVs participent activement à la progression de la pathologie et au dysfonctionnement des neurones, certainement par la propagation de l'inflammation et l'altération des mécanismes de neurotransmission. Mon travail de thèse a permis de décrire dans nos modèles, que les EVs-MPS III transportent un contenu spécifique et caractéristique de la pathologie et de son évolution. Ces découvertes offrent la perspective d'utilisation des EVs comme biomarqueurs d'évaluation de l'efficacité thérapeutique pour les patients inclus dans les futurs essais cliniques.

Mots-clés : Mucopolysaccharidose, Vésicules extracellulaires, Neurodégénérescence, Microglie, Héparane sulfate, Neuroinflammation.

ABSTRACT

Characterization of extracellular vesicles and study of their role in the mucopolysaccharidosis type III neuropathology

Mucopolysaccharidosis type III (MPS III) or Sanfilippo syndrome is a rare pediatric inherited disease classified as a lysosomal storage disorder (LSD), caused by the deficiency of enzymes involved in the degradation of heparan sulfate (HS). Late diagnosis and lack of curative treatment lead to the death of the child before adulthood. However, the latest gene therapy clinical trial in children affected by MPS III type B have showed promising results. The progressive accumulation of abnormal and partially degraded heparan sulphate oligosaccharides (HSOs) in the extracellular space, directly activates the production of pro-inflammatory cytokines by astrocytes and microglia. The early onset of neuroinflammation leads progressively to neuronal death, causing severe and irreversible neurodegenerative deficiencies.

The cellular mechanisms involved in the propagation of the neuroinflammation remains to be elucidated, and one hypothesis is that it could be mediated through the secretion of extracellular vesicles (EVs). In adults with neurodegenerative disorders, recent works demonstrated that EVs, derived from activated cells and in particular from microglia, are loaded with specific pathological molecular content and are arousing great interest for their use as biomarkers. The objective of my PhD is to investigate the contribution of EVs in the pathophysiology of MPS III, by i) analyzing the composition in proteins and RNAs of MPS III-EVs and ii) studying the biological response of naïve primary cortical neurons to the message transmitted by these MPS III-EVs. For this purpose, I isolated and studied EVs from two models of the disease, the supernatant of a microglia cell line activated by HSOs of MPS III patients and the brain tissues of the MPS IIIB mouse model.

By analyzing the proteins and micro RNAs composition of EVs, I was able to demonstrate that MPS III-EVs transmit to the recipient cell of the central nervous system (CNS) a specific and altered cargo involved in inflammatory response and in neuronal development. Then, through transmission experiments of MPS III-EVs to wild-type primary cortical neurons, I was able to demonstrate by fluorescence microscopy, that the morphology of somato-dendritic compartment is strongly altered. Then, using MPS III-EVs isolated from MPS IIIB brains of mice aged of 1 month, 4 months and 8 months, I showed that EVs induced a different transcriptional signature of neuron depending on the stages of the disease.

To summarize, these results strongly suggest that in patients with Sanfilippo syndrome, EVs actively participate to the neuron pathology and dysfunction, certainly through the spreading of inflammation and the alteration of neurotransmission mechanisms. My PhD work is the first report on the content of EVs released by MPS III microglia and reveals a disease-associated signature, providing a framework for future studies on biomarkers to evaluate efficiency of emerging therapies.

Keywords : Mucopolysaccharidosis, Extracellular vesicles, Neurodegeneration, Microglia, Heparan sulfate, Neuroinflammation.

CONFLIT D'INTÉRÊTS

Absence de conflit d'intérêts à déclarer

FINANCEMENTS

Travaux de thèse financés par l'association Vaincre les Maladies Lysosomales

Laboratoire soutenu par l'INSERM, le CNRS et l'Université Toulouse-III-Paul Sabatier

Centre Hospitalo-Universitaire de Toulouse

Agence Nationale de la Recherche



TABLE DES MATIÈRES

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	27
1 LE LYSOSOME ET LES MALADIES DE SURCHARGE LYSOSOMALE	29
1.1 <i>Le lysosome</i>	29
1.1.1 Voies cellulaires de recyclage et de dégradation	29
1.1.2 Structure et fonctions du lysosome.....	34
1.2 <i>Les maladies de surcharge lysosomale</i>	37
1.3 <i>Les mucopolysaccharidoses</i>	40
1.4 <i>Les glycosaminoglycanes et l'héparane sulfate</i>	43
1.4.1 Synthèse et structure des glycosaminoglycanes	43
1.4.2 Structure, classification, fonctions, dégradation des protéoglycanes d'héparane sulfate	46
2 LA MUCOPOLYSACCHARIDOSE DE TYPE III	52
2.1 <i>Caractéristiques cliniques</i>	52
2.1.1 Classification et épidémiologie.....	52
2.1.2 Neuropathologie et l'histoire naturelle de la maladie.....	53
2.1.3 Stratégies thérapeutiques à l'étude.....	55
2.2 <i>Physiopathologie de la mucopolysaccharidose de type III</i>	60
2.2.1 Accumulation d'oligosaccharides d'héparane sulfate et de substrats secondaires.....	60
2.2.2 Altérations de la machinerie cellulaire	63
2.2.3 La gliose et la neuroinflammation	66
2.2.3.1 La gliose	66
2.2.3.2 Le récepteur TLR4	67
2.2.3.3 Le complexe inflammasome NLRP3	70
2.2.4 Altérations neuronales et la neurodégénérescence.....	72
2.2.5 Les modèles d'étude.....	76
3 LES VÉSICULES EXTRACELLULAIRES	79
3.1 <i>Origine et classification des vésicules extracellulaires</i>	79
3.1.1 Historique sur les vésicules extracellulaires	79
3.1.2 Classification des vésicules extracellulaires.....	80
3.2 <i>Aspects moléculaires des vésicules extracellulaires</i>	84
3.2.1 Biogenèse, composition et sécrétion des vésicules extracellulaires	84
3.2.1.1 Biogenèse et recrutement de cargos dépendants du système ESCRT	84
3.2.1.2 Biogenèse et recrutement de cargos indépendants du système ESCRT	89
3.2.2 Sécrétion des vésicules extracellulaires.....	90
3.2.3 Voies d'internalisation et rôle des vésicules extracellulaires dans la cellule cible.....	92
3.3 <i>Physiopathologie des vésicules extracellulaires</i>	95
3.3.1 Altération de la voie des HSPGs et implications dans la communication intercellulaire ...	95
3.3.2 La microglie et ses vésicules extracellulaires.....	96
PARTIE EXPÉRIMENTALE	103
1 HYPOTHESE ET OBJECTIFS	105
2 RESULTATS EXPERIMENTAUX	107
2.1 <i>Article "Extracellular vesicles from mucopolysaccharidosis type III microglia impair neurite growth"</i>	107
2.1.1 Résultats soumis à la publication	107
2.1.2 Résultats complémentaires	160
2.2 <i>Article "Brain-derived extracellular vesicles from a mouse model of Mucopolysaccharidosis type IIIB drive disease stage-dependent neuropathology"</i>	164
3 DISCUSSION ET PERSPECTIVES	196

RÉFÉRENCES	207
ANNEXES	235
1 ANNEXE 1 : ARTICLE “EXTRACELLULAR VESICLES FROM LPS-TREATED MACROPHAGES AGGRAVATE SMOOTH MUSCLE CELL CALCIFICATION BY PROPAGATING INFLAMMATION AND OXIDATIVE STRESS”	237
2 ANNEXE 2 : ABSTRACT “MICROGLIA-DERIVED EXTRACELLULAR VESICLES PROMOTE NEUROPATHOLOGY IN SANFILIPPO SYNDROME”	256
3 ANNEXE 3 : POSTER “MICROGLIA-DERIVED EXTRACELLULAR VESICLES PROMOTE NEUROPATHOLOGY IN SANFILIPPO SYNDROME”	258
4 ANNEXE 4 : POSTER “BRAIN-DERIVED EXTRACELLULAR VESICLES PROMOTE NEUROPATHOLOGY IN A MOUSE MODEL OF SANFILIPPO SYNDROME”	260

LISTE DES ABRÉVIATIONS

– A –

AAV = vecteurs adénoviraux
A β = β -amyloïde
AD = *Alzheimer's disease*
Ag = antigène
ALG-2 = *apoptosis linked gene-2*
ALIX = *apoptosis-linked gene 2-interacting protein X*
AMPA = *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*
ARF6 = *ADP-ribosylation factor 6*
ARRDC-1 = *arrestin domain-containing protein 1*
ARSG = arylsulfatase G
ASC = *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*
Atg = *autophagy-related gene*

– B –

β GC = β -glucocérébrosidase
BHE = barrière hématoencéphalique
BMP = *bone morphogenetic protein*

– C –

CCL2 = *chemokine C-C motif ligand 2*
Cer = céramide
CLEAR = *coordinated lysosomal expression and regulation*
CORVET = *class C core vacuole/endosome tethering*
CS = chondroïtine sulfate
CT = *chaperone therapy*
CXCL10 = *chemokine C-X-C motif ligand 10*

– D –

DAM = *disease associated microglia*
DAMP = *damage associated molecular pattern*
dp = *degree of polymerization*
DQ = quotient développemental
DS = dermatane sulfate

– E –

EAAT = *excitatory amino acid transporter*
EE = *early endosome*
EGFR = *epidermal growth factor receptor*
ELRO = *endolysosome-related organelle*
ER = réticulum endoplasmique

ERK = *extracellular signal-regulated kinase*
ERT = *enzyme replacement therapy*
ESCRT = *endosomal sorting complexes required for transport*
EV = *vésicule extracellulaire*

– F –

FGF = *fibroblast growth factor*
FS = *fente synaptique*

– G –

GAG = *glycosaminoglycane*
Gal = *galactose*
GalNAc = *N-acétyl galactosamine*
GalNAcT I = *N-acétyl galactosamine transférase I*
GFAP = *glial fibrillary acidic protein*
GlcA = *acide glucuronique*
GlcN = *glucosamine*
GlcNAc-PTase = *N-acétylglucosamine-1-phosphotransférase*
GM-CSF = *granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor*
GNS = *N-acétylglucosamine-6-sulfatase*
GT = *gene therapy*

– H –

HA = *acide hyaluronique*
HD = *Huntington's disease*
HGSNAT = *héparane-acétyl-CoA- α -glucosaminide-N-acétyltransférase*
HOPS = *homotypic fusion and vacuole protein sorting*
HS = *héparane sulfate*
HSCT = *hematopoietic stem cell therapy*
HSO = *oligosaccharide d'héparane sulfate*
HSPE = *héparanase active*
HSPG = *protéoglycane d'héparane sulfate*

– I –

Iba1 = *ionized calcium-binding adapter molecule 1*
IdoA = *acide idronique*
IKK = *I kappa-B kinase*
IL-1 β = *interleukine-1 β*
ILV = *intraluminal vesicle*
iPSC = *induced pluripotent stem cells*
IRM = *imagerie à résonance magnétique*

– K –

KA = *kainate*

KO = *knock-out*
KS = *kératane sulfate*

– L –

Lamp-1 et 2 = *lysosomal associated membrane protein 1 and 2*
LCR = *liquide céphalorachidien*
LE = *late endosome*
Limp-2 = *lysosome integral membrane protein 2*
LPS = *lipopolysaccharide*
LRO = *lysosome-related organelle*
LYNUS = *lysosome nutrient sensing*

– M –

M6P = *mannose-6-phosphate*
MAG = *myelin-associated glycoprotein*
MAPKK = *mitogen-activated protein kinase kinase*
MCOL1 = *mucolipin TRP cation channel 1*
ME = *maturing endosome*
MEC = *matrice extracellulaire*
mEPSC = *miniature excitatory post-synaptic current*
mGluR = *metabotropic glutamate receptors*
MIP1 α = *macrophage inflammatory protein 1 α*
miRNA = *micro ribonucleic acid*
MMP = *métalloprotéinases matricielles*
MND = *maladie neurodégénérative*
MP = *membrane plasmique*
MPR = *récepteur M6P*
MPS = *mucopolysaccharidosis*
MPS III = *mucopolysaccharidosis type III*
MPT = *modification post-traductionnelle*
mRNA = *messenger ribonucleic acid*
MSL = *maladie de surcharge lysosomale*
MT = *microtubule*
mtDNA = *ADN mitochondrial*
MTOC = *microtubule organizing center*
mTORC1 = *mammalian target of rapamycin complex 1*
MVB = *multivesicular body*
MyD88 = *myeloid differentiation primary response 88*

– N –

NAGLU = α -N-acétylglucosaminidase
NF- κ B = *nuclear factor kappa-B*
NGS = *next-generation sequencing*
NLRP3 = *NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3*

NMDA = *N-methyl-D-aspartate receptor*

NO = oxyde nitrique

NRE = *non-reducing end*

NRP-1 = neuropiline-1

NT = neurotransmetteur

– O –

ORP1L = *oxysterol-binding protein-related protein 1L*

– P –

PA = potentiel d'action

PAMP = *pathogen associated molecular pattern*

PAS = *periodic acid–Schiff*

PD = maladie de Parkinson

PE = phosphatidyléthanolamine

PG = protéoglycane

piRNA = *piwi RNA*

pro-HSPE = forme précurseur de l'héparanase

PS = phosphatidylsérine

– R –

RBP = *RNA binding protein*

RE = *recycling endosome*

RhoA = *ras homolog family member A*

RIP1 = *receptor interacting protein 1*

ROCK = *RHO-associated protein kinase*

ROS = *reactive oxygen species*

rRNA = *ribosomal RNA*

– S –

SCMAS = sous-unité c de l'ATP synthase mitochondriale

Ser = sérine

SGSH = héparane-N-sulfamidase

Shh = *sonic hedgehog*

SM = sphingomyéline

SMase = sphingomyélinase

SNARE = *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor*

SNC = système nerveux central

snoRNA = *small nucleolar RNA*

snRNA = *small nuclear RNA*

SRT = *substrate reduction therapy*

– T –

TBK1 = *TANK binding kinase 1*

TFEB = *transcription factor EB*
TfR = récepteur à la transferrine
TGN = *trans-Golgi network*
TLR4 = *toll-like receptor 4*
TNF α = *tumor necrosis factor α*
TPC2 = *two-pore channel 2*
tRNA = *transfer RNA*
TRPML1 = *transient receptor potential mucolipin 1*
TSG101 = *tumor susceptibility gene 101*

– U –

Ub = ubiquitine
UC = *ultracentrifugation*

– V –

VSP4 = *vacuolar protein sorting 4-A*

– X –

Xyl = xylose

TABLE DES FIGURES

FIGURE 1 : VOIES CELLULAIRES DE RECYCLAGE ET DE DEGRADATION.....	30
FIGURE 2 : DIFFERENTS LROS EN FONCTION DU TYPE CELLULAIRE ET LES TROUBLES ASSOCIES	33
FIGURE 3 : STRUCTURE DU LYSOSOME	34
FIGURE 4 : LA MACHINERIE LYNUS ET LA REGULATION DE LA TRANSCRIPTION DE TFEB	35
FIGURE 5 : PARCOURS DIAGNOSTIC DES PATIENTS MPS III	42
FIGURE 6 : VOIES DE SYNTHESE ET DE DEGRADATION DES PROTEOGLYCANES D'HEPARANE SULFATE.....	45
FIGURE 7 : DIFFERENTES FORMES DE PROTEOGLYCANES D'HEPARANE SULFATE ET LEUR LOCALISATION CELLULAIRE.....	48
FIGURE 8 : DEGRADATION DES HSPGs	49
FIGURE 9 : SYMPTOMES NEUROLOGIQUES ET SYSTEMIQUES DANS LA MPS III.....	54
FIGURE 10 : STRATEGIES THERAPEUTIQUES DANS LES MSLS.....	56
FIGURE 11 : CORRELATION ENTRE DEVELOPPEMENT COGNITIF ET NEURODEGENERESCENCE CHEZ DEUX PATIENTS MPS IIIB TRAITES PAR THERAPIE GENIQUE.....	59
FIGURE 12 : ACCUMULATIONS CELLULAIRES DANS LE CAS DES MSLS	61
FIGURE 13 : TFEB EST LIE A LA CLAIRANCE DE SUBSTRATS ACCUMULES DANS DES MODELES DE PATHOLOGIES	65
FIGURE 14 : VOIE DE SIGNALISATION TLR4	68
FIGURE 15 : NEUROINFLAMMATION MEDIEE PAR LA MICROGLIE DANS LES MUCOPOLYSACCHARIDOSES.....	71
FIGURE 16 : PHYSIOPATHOLOGIE DE LA MPS III	73
FIGURE 17 : TOXICITE LIEE AU GLUTAMATE	75
FIGURE 18 : FUSION D'UN MVB AVEC LA MEMBRANE PLASMIQUE ET LIBERATION D'EXOSOMES	79
FIGURE 19 : VOIES DE BIOGENESE DES EVs.....	81
FIGURE 20 : FORMATIONS MEMBRANAIRES ET SECRETION D'ECTOSOMES.....	82
FIGURE 21 : CARACTERISTIQUES PHYSIQUES DES DIFFERENTS TYPES D'EVs	83
FIGURE 22 : FONCTIONS CELLULAIRES DU SYSTEME ESCRT	85
FIGURE 23 : MECANISMES DE BIOGENESE DES EVs	86
FIGURE 24 : STRUCTURE ET COMPOSITION MOLECULAIRE D'UNE EV.....	88
FIGURE 25 : BOURGEONNEMENT VESICULAIRE PAR LES PROTEINES ESCRTs	90
FIGURE 26 : SECRETIONS DES VESICULES EXTRACELLULAIRES.....	91
FIGURE 27 : VOIES DE DISSEMINATION ET D'INTERNALISATION DES EVs	93
FIGURE 28 : SIGNALISATION CELLULAIRE ET INTERNALISATION DES EVs PAR LA CELLULE CIBLE	94
FIGURE 29 : CAPACITE ET FONCTIONS CEREBRALES DE LA MICROGLIE.....	97
FIGURE 30 : EVs DU SNC ET NEURODEGENERESCENCE	99
FIGURE 31 : EFFETS DES EVs SECRETEES PAR LA MICROGLIE SUR L'ENSEMBLE DES CELLULES DU SNC	100

TABLE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : DIFFERENTS TYPES DE MALADIES DE SURCHARGE LYSOSOMALE.....	38
TABLEAU 2 : CLASSIFICATION DES MUCOPOLYSACCHARIDOSES	41
TABLEAU 3 : LES DIFFERENTS TYPES DE GLYCOSAMINOGLYCANES.....	44
TABLEAU 4 : CLASSIFICATION DES PROTEOGLYCANES D'HEPARANE SULFATE	47
TABLEAU 5 : DIFFERENTES TYPES DE MUTATIONS DECRITES DANS LE SYNDROME DE SANFILIPPO	52
TABLEAU 6 : CLASSIFICATION DES MPS III.....	53
TABLEAU 7 : HISTOIRE NATURELLE DE LA MALADIE EN FONCTION DU TYPE DE MPS III	54
TABLEAU 8 : MODELES DEVELOPPES POUR L'ETUDE DES MPS III.....	77
TABLEAU 9 : MACHINERIES MOLECULAIRES UTILISEES DANS LES DIFFERENTS MECANISMES DE BIOGENESE ET DE SECRETION DES EVS ..	84

— AVANT-PROPOS —

La mucopolysaccharidose de type III (MPS III) ou syndrome de Sanfilippo est une maladie de surcharge lysosomale (MSL) causée par un déficit enzymatique résultant en l'incapacité du lysosome à dégrader l'héparane sulfate (HS), un glycosaminoglycane (GAG) essentiel. Ce trouble métabolique majeur rare, avec une incidence mondiale moyenne de 1 naissance pour 100 000, provoque une maladie neurodégénérative pédiatrique.

D'origine génétique et avec des bases moléculaires bien décrites, le diagnostic est pourtant rarement statué avant l'âge de 2 ans participant à une prise en charge thérapeutique compliquée. De plus, à ce jour, aucun traitement curatif n'est disponible, rendant le pronostic vital de l'enfant sombre. L'évolution symptomatique devenant rapidement invalidante conduit *in fine* à une forme de démence présentant des caractéristiques communes – telle que la présence d'une neuroinflammation chronique – avec les maladies neurodégénératives de l'adulte et cause généralement le décès avant l'âge adulte.

Une meilleure compréhension 1) des mécanismes sous-jacents à la neurodégénérescence dans le syndrome de Sanfilippo ainsi que 2) la recherche de nouveaux biomarqueurs de suivi de l'efficacité de nouvelles stratégies thérapeutiques chez les jeunes patients deviennent primordiales. Les vésicules extracellulaires (EVs) de par leur capacité à transporter un cargo reflétant l'état physiopathologie de la cellule sécrétrice sont de bons candidats dans l'étude de ces deux problématiques.

Dans ce contexte, nous avons choisi de décrire la composition moléculaire des EVs spécifiques du syndrome de Sanfilippo et de l'évolution des symptômes, ainsi que leur rôle dans le déclenchement de mécanismes inflammatoires et dans la progression de la neuropathologie par le traitement de neurones primaires.

Mes travaux de thèse seront introduits suivant trois grandes parties bibliographiques. La première traitera du lysosome, de l'héparane sulfate et de leur place dans les maladies de surcharge lysosomale. La deuxième, du syndrome de Sanfilippo d'un point de vue clinique, puis de l'état de la connaissance actuelle sur les aspects moléculaires et cellulaires de la physiopathologie associée à ce type de mucopolysaccharidose. La troisième partie s'intéressera à la biologie des EVs ainsi qu'à leur intérêt dans l'étude fondamentale de pathologies ou de leurs applications cliniques.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1 LE LYSOSOME ET LES MALADIES DE SURCHARGE LYSOSOMALE

1.1 LE LYSOSOME

Le lysosome a été découvert et décrit pour la première fois en 1955 par Christian de Duve, prix Nobel de médecine 1974 (De Duve 2005). Le biochimiste et son groupe s'intéressaient à l'interaction dans les hépatocytes entre la glucose-6-phosphatase et l'insuline, pensant que l'action de cette dernière était perturbée par l'enzyme. Par des techniques de centrifugation et de fractionnement des cellules, ils n'ont pas tardé à découvrir que la glucose-6-phosphatase était fortement liée à la membrane d'une vésicule, alors appelée le microsome. De plus, ils ont révélé la présence de 5 autres phosphatases acides associées à la glucose-6-phosphatase, toutes contenues dans ce microsome. En démontrant que ces enzymes devenaient actives à un pH acide bien précis et digéraient un substrat spécifique, le nom de lysosome – étymologiquement « corps digestif » en grec – émergeât (de Duve et al. 1955).

Plus tard, le lysosome a été décrit comme le pôle de recyclage et de dégradation des composants membranaires et de matériaux extracellulaires mais aussi intracellulaires, au carrefour entre les voies de l'endocytose et l'autophagie (De Duve 1983).

1.1.1 Voies cellulaires de recyclage et de dégradation

Les principales étapes de recyclage médiées par les différents endosomes et l'appareil de Golgi et de dégradation par le lysosome sont illustrées dans la Figure 1 et détaillées ci-dessous.

La voie endosomale débute par l'endocytose **(1)** de petites molécules, de fluides, de composants membranaires ou bien de ligands liés à leur récepteur. L'internalisation par invagination membranaire peut être à l'origine de formation de vésicules nues ou recouvertes de clathrine (voie majoritaire de l'endocytose), de cavéoline, de radeaux lipidiques, ou encore

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

issues de la macropinocytose. Dans certaines cellules spécialisées comme les macrophages ou les monocytes, la phagocytose permet de nettoyer le milieu extracellulaire en capturant des particules plus larges comme des corps apoptotiques, des pathogènes, ou encore des débris cellulaires (Cesar-Silva et al. 2022; van Niel, D'Angelo, et Raposo 2018; Yang et Wang 2021). Les vésicules une fois formées par fission membranaire, vont perdre leur revêtement, migrer et fusionner avec l'endosome précoce (EE, pour early endosome) porteur de la protéine GTPase Rab5 et du complexe ESCRT (pour endosomal sorting complexes required for transport) (2). Également appelé endosome de tri, il va réaliser grâce à son pH interne faiblement acide une première séparation des différents cargos et en fonction de leur nature les diriger dans des vacuoles endocytiques – ou vésicules intraluminales (ILVs, pour

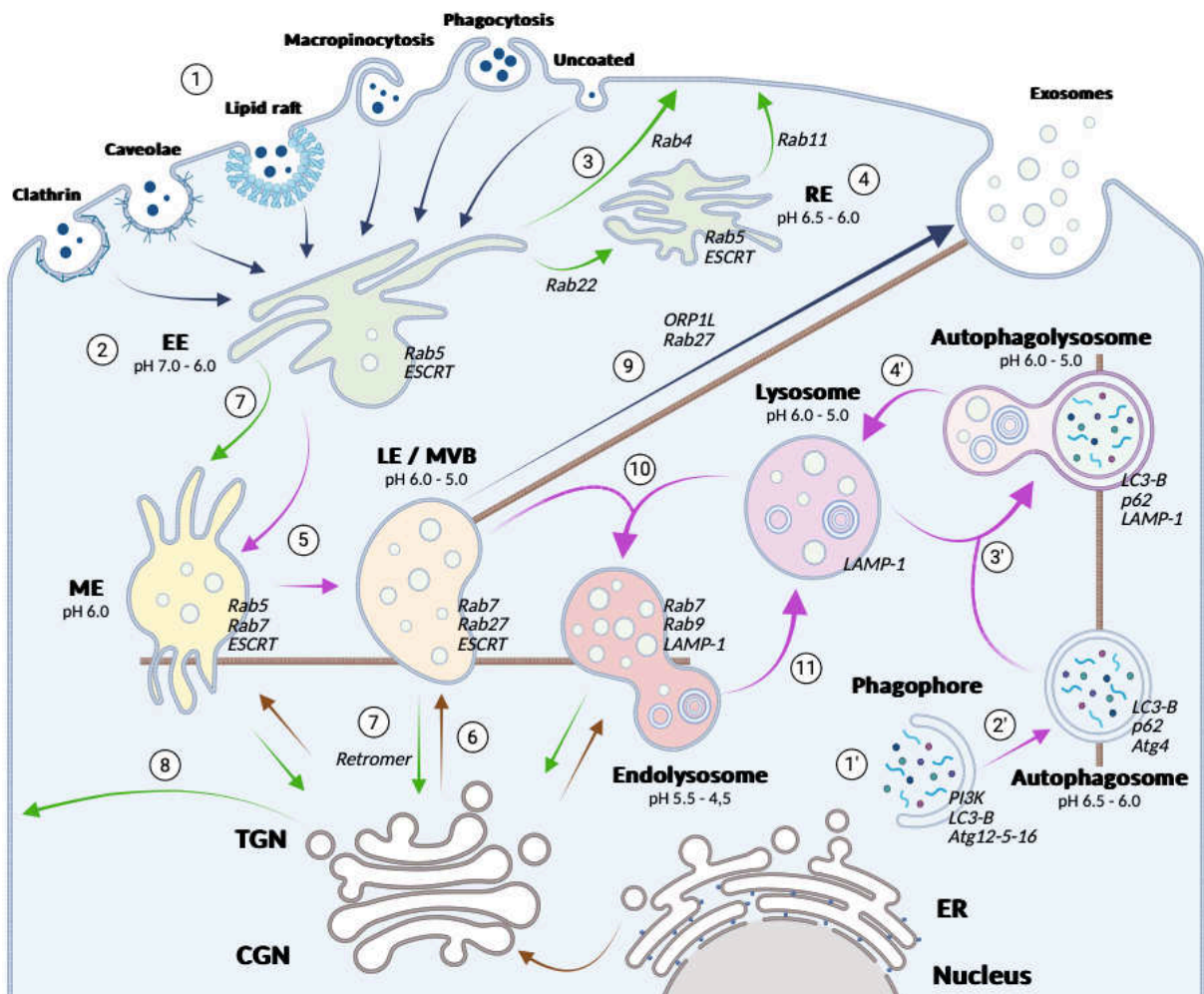


Figure 1 : Voies cellulaires de recyclage et de dégradation

Figure créée sur BioRender d'après Cesar-Silva et al. 2022 ; Cullen et Steinberg 2018 ; Hong 2019 ; Huotari et Helenius 2011 ; van Niel, D'Angelo et Raposo 2018 ; van Niel et al. 2022 et Yang et Wang 2021.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

intraluminal vesicles) – vers les voies de recyclage (flèches vertes) pour la plupart ou de dégradation (flèches violettes) (Cesar-Silva et al. 2022).

Un enrichissement en Rab4 des ILVs permet un recyclage direct des matériaux depuis la zone tubulaire de l'EE jusqu'à la MP **(3)** tandis que Rab22 permet un transit par l'endosome de recyclage (RE, pour recycling endosome) avant un adressage à la membrane par Rab11 **(4)**. Les molécules recyclées via ce tri rapide, sont généralement des solutés extracellulaires ou des composants de la membrane plasmique, qui procède au recyclage d'au moins 50% de sa surface chaque heure (Hong 2019; Huotari et Helenius 2011).

En vue d'une dégradation des produits non recyclés, l'endosome va mûrir depuis la périphérie jusqu'au centre de la cellule suivant les microtubules (MTs) érigés le long de la zone périnucléaire grâce au centre organisateur des microtubules (MTOC, pour microtubule organizing center). Le domaine vacuolaire de l'endosome qui est le centre de la maturation va s'acidifier et contenir de plus en plus d'ILVs au vu de son devenir en endosome maturant (ME, pour maturing endosome) puis en endosome tardif (LE, pour late endosome) aussi appelé corps multivésiculaire (MVB, ou encore endosome multivésiculaire ; MVE) **(5)**. Ce phénomène de maturation est possible grâce à plusieurs étapes clés dont 1) la perte progressive de Rab5 pour l'adoption de Rab7, 2) l'apport par le réseau trans du Golgi (TGN, pour trans-Golgi network) depuis le ER des hydrolases lysosomales indispensables à la dégradation endolysosomale **(6)**, et 3) la rétractation des extensions tubulaires mettant fin à sa capacité de recyclage vers la membrane (Huotari et Helenius 2011).

Il est à noter qu'il existe des mécanismes de recyclage tardifs, permettant une dernière fois au cargo des ILVs d'échapper à leur dégradation. L'un dépendant du rétromère, assure un transport entre l'endosome à différentes maturités et le TGN **(7)**, qui à son tour va favoriser un réadressage à la membrane d'une partie des ILVs **(8)** (Cullen et Steinberg 2018; Hong 2019; Huotari et Helenius 2011).

Le LE/MVB suite à sa maturation est également capable de fusionner avec le lysosome mais aussi avec la membrane plasmique (MP). Après adressage et migration jusqu'à la MP le long des MTs dépendante de la kinésine et des protéines de transport ORP1L (pour oxysterol-binding protein-related protein 1L) et Rab27, le LE/MVB pourra délivrer ses ILVs dans le milieu extracellulaire devenant ainsi des exosomes **(9)** (Huotari et Helenius 2011; van Niel et al. 2022).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

La fusion est un mécanisme essentiel au LE/MVB qui lui permet de délivrer au lysosome les hydrolases et le contenu à dégrader, devenant – par une fusion partielle dite « kiss and run » ou complète – l'endolysosome maintenant porteur de Rab9 et du marqueur lysosomal Lamp-1 (pour lysosomal associated membrane protein). Cet endolysosome adopte également un pH entre 4,5 et 5,5 qui est optimal pour l'activation des hydrolases digestives **(10)** (Cesar-Silva et al. 2022; Yang et Wang 2021). Son travail effectué, le LE/MVB peut se séparer du lysosome qui retrouve un pH plus neutre, inactivant les hydrolases qu'il stockera jusqu'à la prochaine fusion **(11)** (Huotari et Helenius 2011).

La voie de l'autophagie en association avec le lysosome permet le nettoyage intracellulaire en procédant à la dégradation sélective d'organites endommagés comme le réticulum endoplasmique ou les mitochondries mais aussi à l'élimination de molécules accumulées comme cela est le cas dans des pathologies neurodégénératives telles que le syndrome de Sanfilippo ou la maladie d'Alzheimer (AD, pour Alzheimer's disease) (Cao et al. 2019; Eskelinen et Saftig 2009). La sélection autophagique se fait à l'aide d'un système de reconnaissance de la molécule qui peut être marquée par des phospholipides ou encore conjuguée avec quatre protéines d'ubiquitine (Ub), comme c'est le cas pour certaines protéines qui n'ont pas directement été dégradées par le complexe protéasome (Dikic et Elazar 2018).

Également dépendante d'une faible teneur en nutriments cellulaires, l'autophagie non sélective permet le catabolisme de métabolites cytoplasmiques comme des protéines, lipides, acides nucléiques apportant rapidement de l'énergie à la cellule (Mejlvang et al. 2018).

Le processus commence par la formation d'une double membrane lipidique appelée le phagophore **(1')** qui va englober les produits de dégradation par l'utilisation d'un complexe des protéines Atg (pour autophagy-related gene) 12, 5 et 16 et de LC3-A qui par sa conjugaison à la phosphatidyléthanolamine (PE) deviendra LC3-B et entraînera la fermeture du phagophore en autophagosome **(2')** (Cesar-Silva et al. 2022; Dikic et Elazar 2018).

De la même manière que pour l'endosome, l'autophagosome suivra un cycle de maturation, de fusion **(3')** et de fission **(4')** avec le lysosome.

Malgré toutes les découvertes à ce sujet, la voie endolysosomale reste complexe avec l'émergence de nouveaux acteurs comme les LROs (pour lysosome-related organelle) aussi

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

appelés ELROs (pour endolysosome-related organelle) qui partagent des caractéristiques communes avec le lysosome. Puisqu'ils sont à l'origine d'un mécanisme que l'on appelle exocytose lysosomale, ils sont souvent associés aux MVBs, dont ils pourraient provenir (Reddy, Caler, et Andrews 2001). Ces LROs sont retrouvés dans un vaste nombre de types cellulaires et ont des fonctions associées principalement à l'immunité innée de par leur capacité de stockage et de sécrétion de molécules impliquées dans la médiation de l'inflammation, la dégradation de pathogènes ou de macromolécules ou encore le recrutement plaquettaire. De manière évidente, leur dysfonctionnement conduit à des désordres inflammatoires et auto-immuns (Figure 2) (Banushi et Simpson 2022; Delevoye, Marks, et Raposo 2019; Huizing et al. 2008; Platt et al. 2018; Saftig et Klumperman 2009; Settembre et al. 2013).

L'ensemble de ces mécanismes sont étroitement liés avec la biogenèse, la sécrétion et le devenir des vésicules extracellulaires, qui seront largement détaillées dans la troisième partie bibliographique (page 68).

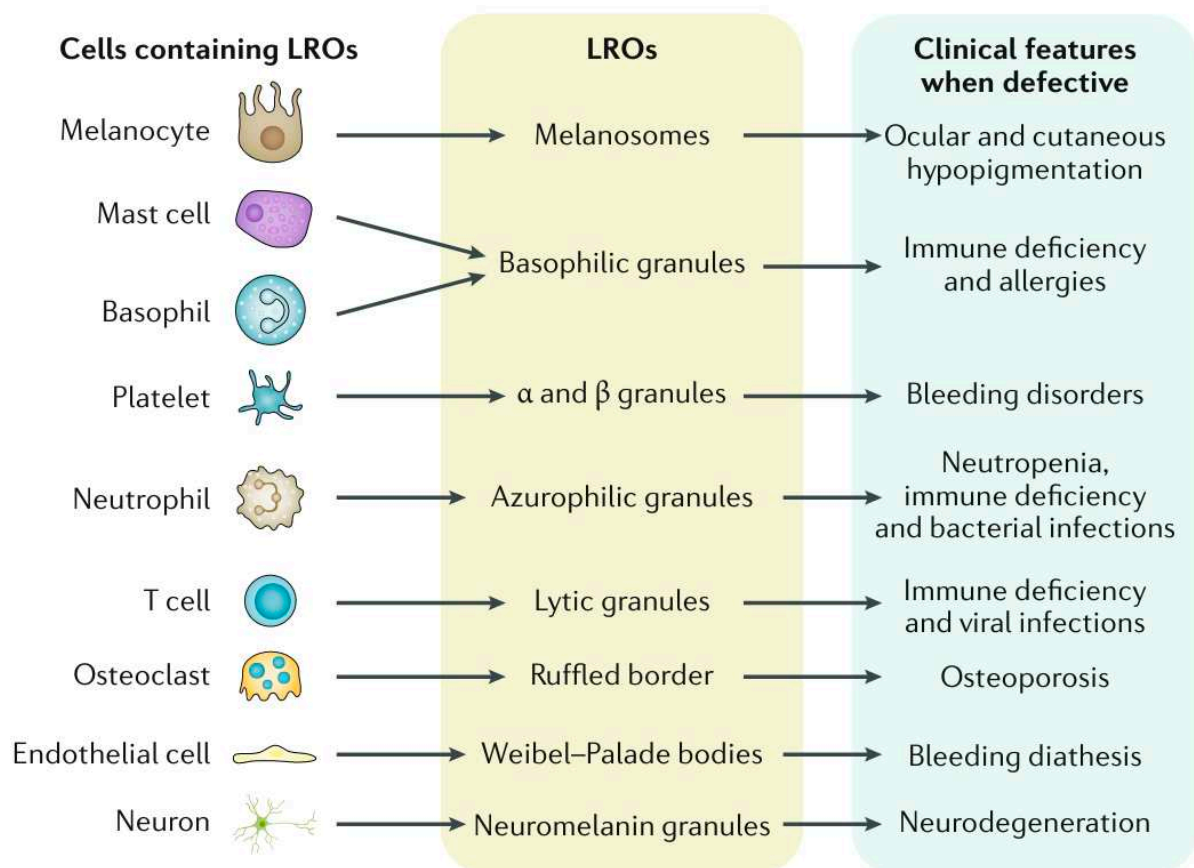


Figure 2 : Différents LROs en fonction du type cellulaire et les troubles associés

D'après Platt et al. 2018.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1.2 Structure et fonctions du lysosome

D'un point de vue morphologique le lysosome est une vacuole mesurant entre 100 et 1000 nm composée d'une simple membrane lipidique riche en phospholipides et pauvre en cholestérol. La membrane est protégée sur sa face interne par un glycocalyx constitué de polysaccharides, permettant ainsi d'isoler son contenu intraluminal acide (Figure 3) (Bright, Davis, et Luzio 2016; Schulze, Kolter, et Sandhoff 2009; Settembre et al. 2013).

Au niveau membranaire, le lysosome exprime un large éventail de protéines formant des canaux ioniques, pompes, récepteurs ou même transporteurs, lui permettant de remplir ses fonctions cellulaires dont la première est de toute évidence la dégradation (Ballabio et Bonifacino 2020; Platt et al. 2018).

Les protéines les plus représentées sont Lamp-1 et 2, exprimées à pas moins de 80% de la surface du lysosome et utilisées comme marqueurs spécifiques. Lamp-1 permet son transport

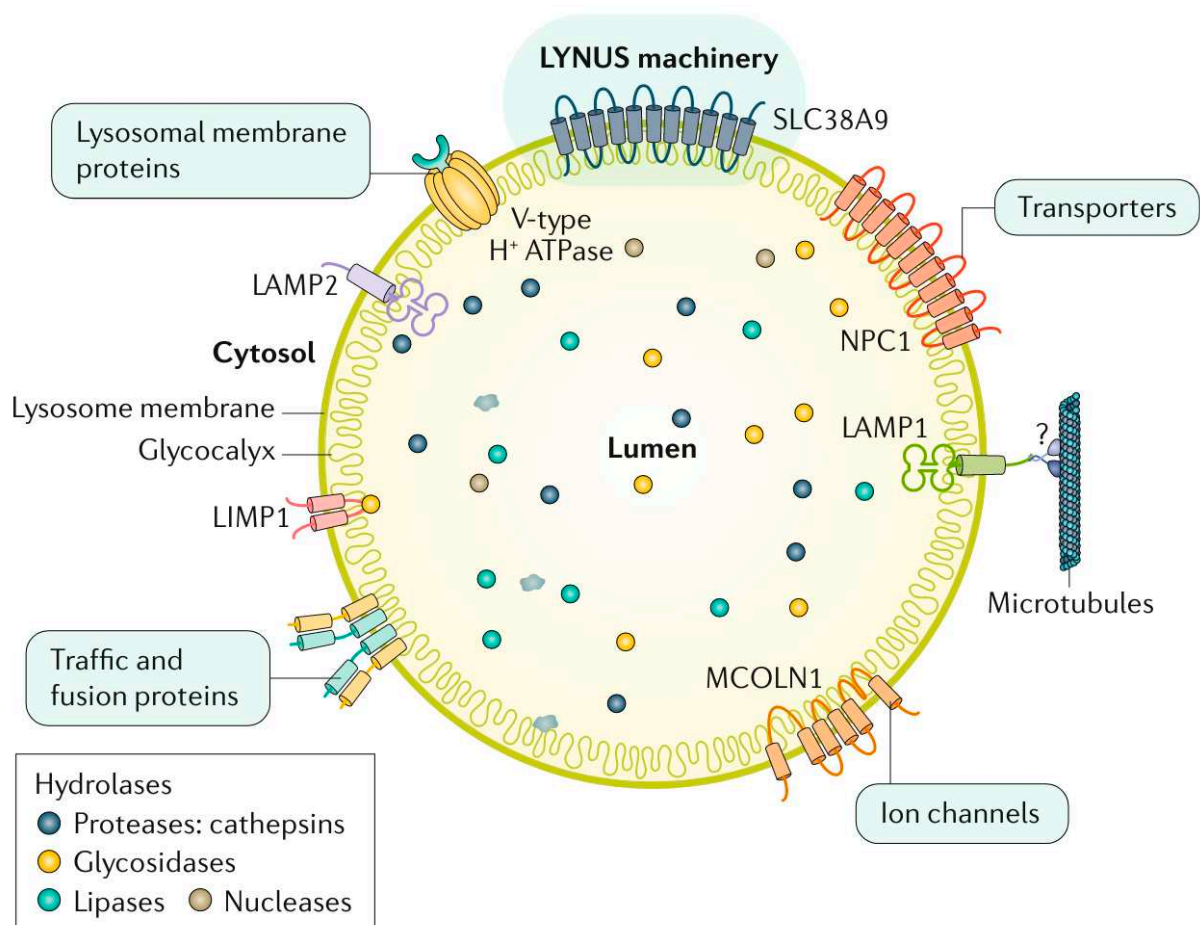


Figure 3 : Structure du lysosome

D'après Platt et al. 2018.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

intracellulaire dépendant d'un ancrage aux MTs et Lamp-2 va être essentiel dans une voie autophagique alternative, l'autophagie médiée par les chaperonnes en prenant en charge le transport intraluminal de protéines à dégrader. Évidemment, il présente aussi des protéines transmembranaires impliquées dans la fusion et la migration telles que les Rabs et les SNAREs déjà évoquées précédemment.

La présence de sa pompe V à protons combinée aux canaux cationiques comme MCOL1 (pour mucolipin TRP cation channel 1) ou TPC2 (pour two-pore channel 2) permettant l'efflux de calcium dans le cytosol sont obligatoires à la régulation et au maintien de son pH acide. Également, le calcium et MCOLN1 joueront un rôle central dans la reformation du lysosome après fission avec l'endosome. (Saftig et Klumperman 2009; Settembre et al. 2013; Winchester 2001; Yang et Wang 2021).

Longtemps surnommé la « poubelle cellulaire » puis considéré seulement par sa capacité dégradative, les derniers travaux sur le lysosome ont révélé de nouvelles fonctions cellulaires de par ses nombreuses interactions avec d'autres compartiments cellulaires comme la mitochondrie (Todkar, Ilamathi, et Germain 2017) ou le noyau (Ballabio 2016; Settembre et al. 2012) et dont l'acteur central serait le « master gene » TFEB (pour transcription factor EB) (Perera et Zoncu 2016).

A travers la machinerie LYNUS (pour lysosome nutrient sensing), véritable senseur de nutriments le lysosome est un centre régulateur important dans le métabolisme des lipides et de l'autophagie (Figure 4). Lors de carence cellulaire, le complexe mTORC1 (pour mammalian

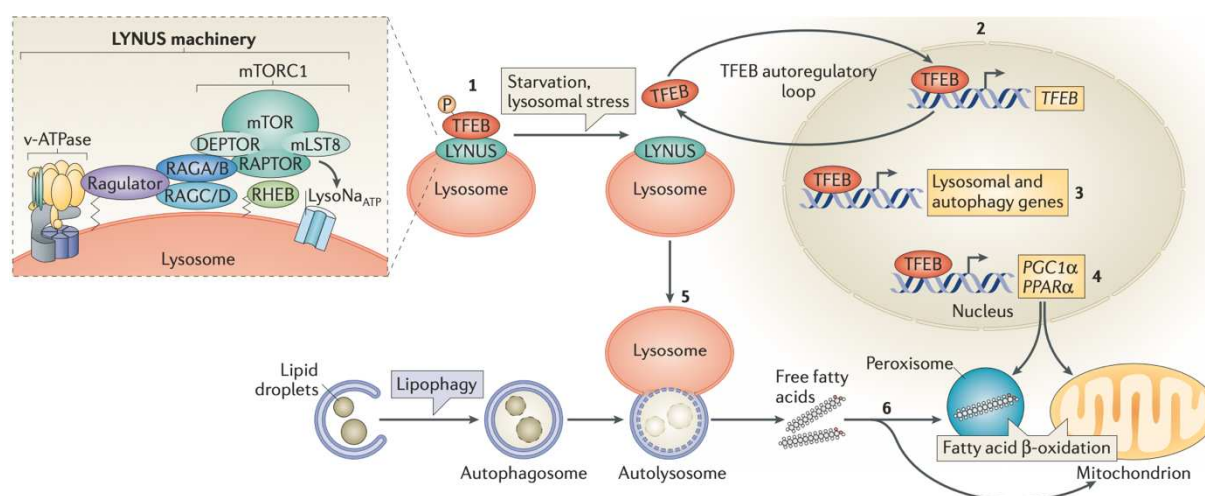


Figure 4 : La machinerie LYNUS et la régulation de la transcription de TFEB

D'après Settembre et al. 2013.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

target of rapamycin complex 1), en permettant le relargage de Ca^{2+} dans le cytosol par MCOLN1, va activer par un rétrocontrôle positif transcriptionnel de TFEB la production d'énergie par la mitochondrie grâce à la β -oxydation lipidique. MCOLN1 est aussi réactif au stress cellulaire médié par la production mitochondriale de ROS, et de la même manière la transcription de TFEB va induire l'autophagie de mitochondries qui seraient défectives. (Settembre et al. 2008, 2013; Todkar et al. 2017).

Plus largement, il a été montré que TFEB régie un réseau CLEAR (pour coordinated lysosomal expression and regulation) comprenant de nombreuses enzymes responsables de la dégradation de substrats. De manière intéressante, par le biais de l'autophagie selon le même mécanisme décrit précédemment, la surexpression de TFEB permet la clairance de substrats accumulés dans de nombreux modèles de maladies tels que les maladies neurodégénératives (MND) (Ballabio 2016; Palmieri et al. 2011; Settembre et Medina 2015).

Le lumen du lysosome peut contenir pas moins de 60 hydrolases différentes dont l'activité catalytique est possible à pH acide suite à la fusion avec l'endosome ou l'autophagosome.

Après leur synthèse dans l'ER, les hydrolases sont transférées dans l'appareil de Golgi où elles vont subir des modifications post-traductionnelles dont l'ajout d'un résidu mannose-6-phosphate (M6P), pouvant se lier à son récepteur M6P (MPR) dans le TGN. Ce couple ligand-récepteur va être adressé via une vésicule recouverte de clathrine aux endosomes en maturation, capables de dissocier l'enzyme de son récepteur pour finalement la confier au lysosome lors de sa fusion avec ce dernier.

Il existe aussi deux autres voies non canoniques pour ce transport protéique au lysosome, concernant des enzymes impliquées dans le catabolisme des lipides : celle dépendante du récepteur lysosomal Limp-2 (pour lysosome integral membrane protein 2) pour la prise en charge sélective de la β -glucocérébrosidase (β GC) ou celle utilisant la sortiline pour capter la forme pro de la saposine et la sphingomyélinase acide.

Ces enzymes lysosomales peuvent être des protéases, des lipases, des nucléases ou encore des glycosidases capables de cliver par hydrolyse un large panel de molécules. La perte de fonction de ces enzymes sera à l'origine de défauts de dégradation de substrats cellulaires puis à la surcharge du lysosome entraînant des dysfonctions cellulaires majeures à l'origine de

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

pathologies sévères appelées les maladies de surcharge lysosomales (MSL) (Braulke et Bonifacino 2009; Griffiths et al. 1988; Saftig et Klumperman 2009; Settembre et al. 2013).

1.2 LES MALADIES DE SURCHARGE LYSOSOMALE

En 1963, Henri-Géry Hers qui faisait partie du groupe de De Duve lors de la découverte du lysosome, continua d'étudier le catabolisme des sucres. Il a observé que l'absence d'activité de l'enzyme α -glucosidase acide (ou maltase acide) résulte en l'accumulation de glycogène dans des tissus musculaires de patients atteints d'une maladie d'origine génétique, la glycogénose de type II ou maladie de Pompe, d'abord décrite par le docteur Pompe. En montrant que le glycogène était fortement concentré dans les lysosomes où l'enzyme α -glucosidase acide est normalement active, il a ainsi découvert la première MSL (De Duve 2005; Hers 1963, 1965).

Les MSLs appartiennent à un large groupe d'au moins 70 pathologies. Elles ont une causalité très hétérogène mais la majorité de ces maladies résulte d'un défaut d'activité d'une l'hydrolase, entraînant l'accumulation du substrat qu'elle catabolise, comme le glycogène, les mucopolysaccharides (aussi appelées glycosaminoglycanes ou GAGs), les sphingolipides et autres lipides, et les glycoprotéines. Elles sont classées en fonction du substrat accumulé et ainsi nommées respectivement les glycogénoses, mucopolysaccharidoses, sphingolipidoses, ou les glycoprotéinoses et oligosaccharidoses (Tableau 1) (Platt et al. 2018).

La surcharge du lysosome peut aussi faire suite à un défaut d'adressage des enzymes fonctionnelles depuis le TGN, comme c'est le cas des mucopolysaccharidoses de type II et III où la dysfonction de l'enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransférase (GlcNAc-PTase) dans le cis-Golgi empêche la formation du résidu M6P essentiel au transfert de l'hydrolase (Dogterom et al. 2021).

L'absence d'une protéine membranaire lysosomale comme un transporteur ou un canal ionique va aussi provoquer des surcharges de métabolites dégradés en impactant leur export. Ces défauts de protéines membranaires peuvent également affecter le maintien du pH qui est

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 1 : Différents types de maladies de surcharge lysosomale

Adapté de Platt et al. 2018.

Type of lysosomal storage disorder	Diseases
Sphingolipidosis	Fabry disease / Faber lipogranulomatosis / Gaucher disease types I, II, III and perinatal lethal form / GM1 gangliosidosis types I, II and III / GM2 gangliosidosis Tay-Sachs disease, Sandhoff disease and GM2 activator deficiency / Globoid cell leukodystrophy (also known as Krabbe disease) / Metachromatic leukodystrophy / Niemann-Pick disease types A and B
Mucopolysaccharidosis	MPS I Hurler syndrome, Hurler-Scheie syndrome and Scheie syndrome / MPS II (also known as Hunter syndrome) / MPS types III A, B, C and D (also known as Sanfilippo syndrome A, B, C and D) / MPS IV types A and B (also known as Morquio syndrome A and B) / MPS VI (also known as Maroteaux-Lamy syndrome) / MPS VII (also known as Sly disease) / MPS IX
Glycogen storage disease (GSD)	GSD II, also known as Pompe disease
Glycoproteinosis and oligosaccharidosis	α -Mannosidosis types I, II and III / β -Mannosidosis / Fucosidosis / Aspartylglucosaminuria / Schindler disease types I (also known as infantile-onset neuroaxonal dystrophy), type II (also known as Kanzaki disease), and type III / Sialidosis type I (also known as cherry-red spot myoclonus syndrome) / Sialidosis type II (also known as mucopolipidosis I) / Galactosialidosis
Lipid storage diseases	Acid lipase deficiency (Wolman disease and cholesterol ester storage disease)
Post-translational modification defects	Multiple sulfatase deficiency / Mucopolipidosis II α/β I-cell disease and pseudo-Hurler polydystrophy / Mucopolipidosis III variant pseudo Hurler polydystrophy
Integral membrane protein disorders	Cystinosis, Danon disease / Action myoclonus-renal failure syndrome / Sialic acid storage disease ISSD / Niemann-Pick / Mucopolipidosis IV
Neuronal ceroid lipofuscinosis	CLN types 1 to 14 (CLN1 is also known as Haltia-Santavuori disease and INCL / CLN2 as Jansky-Bielschowsky disease / CLN3 as Batten-Spielmeyer-Sjogren disease / CLN4 as Parry disease and Kufs type A and B / CLN6 as Lake-Cavanagh / CLN12 as Kufor-Rakeb syndrome)
LRO disorders	Hermansky-Pudlak disease types 1 to 9 / Griscelli syndrome 1 (also known as Elejalde syndrome) and 2 / Chédiak-Higashi disease

essentiel à l'activité des hydrolases solubles ou directement entraver la biogenèse du lysosome.

Quant aux céroïdes lipofuscinoses neuronales, elles forment un groupe de 13 maladies neurodégénératives particulier, puisque la dysfonction du lysosome peut être due à chacun de ces niveaux d'altérations décrits.

Finalement, une partie des MSLs est liée aux défauts de LROs, de leur biogenèse à leur trafic intracellulaire en passant par l'adressage de leur protéines synthétisées *de novo*, comme c'est le cas dans la maladie de Hermansky-Pudlak où les mélanocytes défectueux causeront l'albinisme du patient (Pará, Bose, et Pshezhetsky 2020; Parenti, Medina, et Ballabio 2021; Platt et al. 2018; Vitner, Platt, et Futerman 2010).

Les MSLs font partie du groupe des erreurs innées du métabolisme, causées par des mutations monogéniques dont la plupart sont transmises de manière autosomique récessive et seulement trois sont liées à l'X. Lorsqu'elles sont considérées séparément, les MSLs sont décrites comme des maladies rares, mais leur incidence globale est d'une naissance pour 5000, les rendant plutôt fréquentes. Les plus représentées sont les maladies de Pompe, Fabry,

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Gaucher et la leucodystrophie métachromatique avec une incidence supérieure à une naissance pour 50000.

L'âge de développement de la pathologie est très variable, ce qui conditionnera la sévérité, la nature des symptômes et le diagnostic, mais de manière générale les premières atteintes se manifestent déjà chez le nourrisson ou dans l'enfance.

Les MSLs ont des affections nombreuses et diverses, qui peuvent être périphériques avec généralement des anomalies musculosquelettiques, hépatospléniques ou cardiaques, ou centrales avec des atteintes sévères du système nerveux central (SNC). Plus de la moitié des patients présentent des atteintes neurologiques, et les MSLs représentent ainsi la cause majeure de développement d'une MND chez l'enfant (Platt et al. 2018).

En outre, la plupart des patients présentent des organomégalies, des malformations squelettiques et des dysmorphies faciales identifiables par un qui permettra d'orienter le diagnostic vers une MSL. Afin de confirmer le diagnostic, l'examen clinique sera combiné avec un examen biochimique par dosage urinaire ou sanguin du métabolite puis quand cela est possible par dosage de l'activité enzymatique.

La confirmation du diagnostic peut aussi se faire par séquençage NGS (pour next-generation sequencing) qui cible les gènes codant pour les hydrolases connues afin d'identifier la mutation à l'origine de la baisse ou de l'absence de leur activité enzymatique. L'identification de la mutation sera essentielle au conseil génétique qui peut être consulté dans le cas d'une fratrie ou pour effectuer un diagnostic prénatal au sein d'une même famille (Filocamo et Morrone 2011; Héron et al. 2011; Kingma, Bodamer, et Wijburg 2015; Michaud et al. 2020; Platt et al. 2018).

Malheureusement, dans le cas de nombreuses MSLs, les signes cliniques et physiques apparaissent tardivement ou encore s'apparentent à d'autres pathologies, pouvant mener à une errance diagnostique. Si bien que dès que le diagnostic est statué, les atteintes sont déjà irréversibles rendant la perspective thérapeutique très restreinte. Ce qui ne permet généralement pas un traitement étiologique efficace et sont alors proposées des thérapies afin de contrer l'avancée rapide des symptômes. Or, plusieurs stratégies thérapeutiques sont à l'étude ou permettent déjà la guérison de certaines MSLs comme les thérapies par remplacement de l'enzyme défectueuse (ERT pour enzyme replacement therapy), par des petites molécules pour la réduction de production du substrat (SRT pour substrate reduction

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

therapy) ou la prise en charge par protéine chaperone de l'enzyme mal conformée (CT pour chaperone therapy). Sont possibles également le traitement par greffe de cellules souches hématopoïétiques (HSCT pour haematopoietic stem cell therapy) ou par thérapie génique (GT pour gene therapy). Ces options thérapeutiques seront développées dans la partie bibliographique sur la MPS III (page 44 à 49).

Ce constat rend primordial le développement d'un outil permettant le diagnostic plus précoce et offrant une prise en charge optimale au patient. Dans certains pays, mais pas encore en France, la stratégie de dépistage néonatal est en plein développement dans le cas de certaines MSLs pour lesquelles un traitement efficace peut être proposé si le diagnostic est prononcé avant l'apparition des symptômes, comme c'est le cas de la mucopolysaccharidose de type I (MPS I) et de la maladie de Pompe (Clarke et al. 2020; Gelb et al. 2018; Kingma et al. 2015).

1.3 LES MUCOPOLYSACCHARIDOSES

Les mucopolysaccharidoses (MPSs) résultent de l'incapacité du lysosome à dégrader les GAGs qui sont des sucres essentiels dans de nombreuses fonctions de la cellule et de la matrice extracellulaire (MEC). Elles se distinguent en fonction du ou des GAGs accumulés, c'est-à-dire la chondroïtine sulfate (CS), le dermatane sulfate (DS), l'héparane sulfate (HS), le kératane sulfate (KS) ou l'acide hyaluronique (HA). Elles sont classées en 7 types cliniques et suivant la mutation de 11 gènes différents codant chacun pour une enzyme spécifique. Seule la MPS II ou syndrome de Hunter est causée par une mutation récessive d'un gène présent sur le chromosome X, toutes les autres ont une transmission autosomique récessive (Tableau 2).

Les MPSs sont considérées comme des maladies rares puisque leur incidence moyenne est comprise entre 1/100000 à 1/250000 naissances, sauf pour la MPS IX ou syndrome de Natowicz qui est extrêmement rare. La prévalence qui représente l'ensemble des cas relevés dans les différentes MPSs, varie en fonction de la zone géographique, par exemple, la MPS II est beaucoup plus fréquente en Asie de l'Est qu'ailleurs dans le monde, tandis que la MPS I serait plus représentée dans les pays scandinaves, ou encore la MPS III dénombre plus de cas

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 2 : Classification des mucopolysaccharidoses

D'après Heon-Roberts et al. 2020, Kaboyashi 2019, Michaud 2020, et Platt et al. 2012 et 2018. IDUA : α -L-Iduronidase, IDS : Iduronate 2-sulfatase, SGSH : N-Sulfoglucosamine sulfohydrolase, NAGLU : N-Sulfoglucosamine sulfohydrolase, HGSNAT : Heparan- α -glucosaminide-N-acetyltransferase, GNS : N-acetylglucosamine-6-sulfatase, GALNS : N-acetylgalactosamine-6-sulfatase, GLB : β -galactosidase, ARSB : Arylsulfatase B, GUSB : β -Glucuronidase, HYAL1 : Hyaluronidase 1. AR : Autosomal recessive inheritance, XLR : X-linked inheritance. CS : Chondroitin sulfate, DS : Dermatan sulfate, HS : Heparan sulfate, KS : Keratan sulfate, HA : Hyaluronic acid. HSCT : Hematopoetic stem cell therapy, ERT : Enzyme replacement therapy, SRT : Substrate reduction therapy, S/S : Symptomatic and supportive therapies.

Clinical type	Syndrome	Lysosomal protein defect (Gene symbol)	Genetic form	GAG accumulation	Onset	CNS disease	Somatic disease	Approved therapies	Mean birth incidence
I	Hurler	IDUA	AR	DS/HS	Infantile	Severe	Severe	HSCT	1 : 100,000
	Scheie				Juvenile	None to mild		ERT	1 : 100,000
II	Hunter	IDS	XLR	DS/HS	Infantile, Juvenile	None to severe	Severe	ERT	1 : 140,000
III A	Sanfilippo	SGSH	AR	HS	Late infantile	Severe	Mild	S/S	1 : 100,000
III B		NAGLU			Juvenile				
III C		HGSNAT			Juvenile				
III D		GNS			Juvenile				
IV A	Morquio	GALNS	AR	KS/CS	Late infantile	None	Severe	ERT	1 : 200,000
IV B		GLB		KS	Late infantile, juvenile			S/S	
VI	Marotraux-Lammy	ARSB	AR	DS	Late infantile and juvenile	None	Severe	ERT	1 : 240,000
VII	Sly	GUSB	AR	DS/CS/HS	Infantile and late infantile	Severe	Severe	ERT	1 : 250,000
IX	Natowicz	HYAL1	AR	HA	Juvenile	None	Mild to moderate	S/S	Extremely rare

en Europe de l'Est et du Sud. De manière générale les MPSs sont très représentées en Arabie Saoudite, au Brésil ou en Australie (Celik et al. 2021; Khan et al. 2017).

A l'exception des syndromes de Scheie, Morquio, Marotraux-Lammy et Natowicz, dont les patients présentent majoritairement voire exclusivement des altérations périphériques, les premiers symptômes remarqués chez le patient atteint de MPS sont l'hyperactivité, l'agressivité et les troubles du sommeil, qui reflètent l'apparition précoce d'atteintes neurologiques graves et irréversibles et dont la forme la plus sévère est la MPS III.

Un des problèmes majeurs dans la direction du patient vers un diagnostic MPS est que les symptômes développés sont très communs à ceux de maladies du neurodéveloppement conduisant le médecin à explorer d'autres pistes telles que des pathologies liées aux troubles de l'attention, de l'hyperactivité ou encore du spectre autistique.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

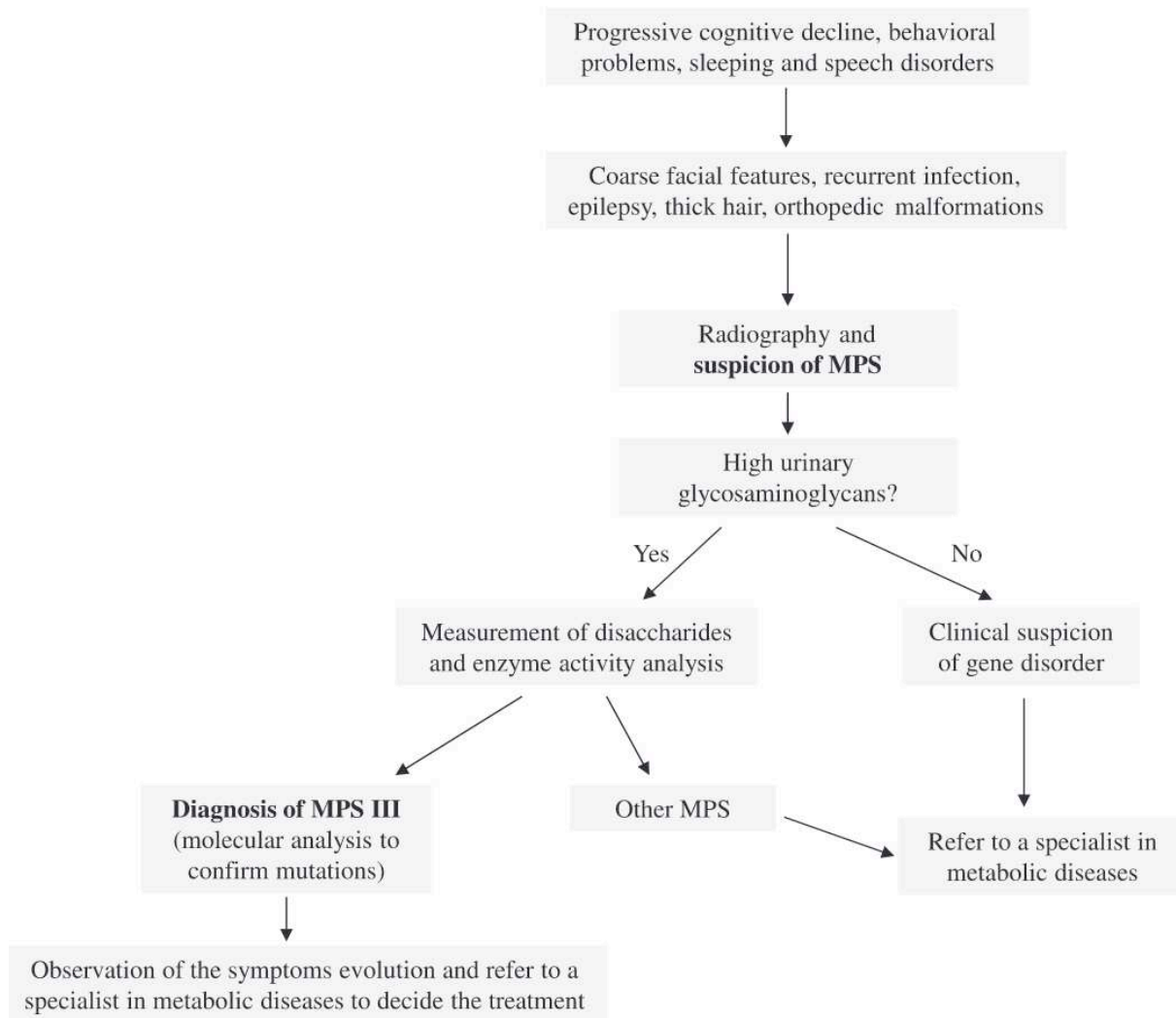


Figure 5 : Parcours diagnostic des patients MPS III

D'après Andrade et al. 2015.

Mais, à l'instar de la plupart des MSLs, les patients MPS présentent une dysmorphie faciale avec des traits épais et une hypertrichose mais qui apparaissent assez tardivement et se développent avec l'âge. Également, une des caractéristiques communes aux MPSs est la posture courbée des patients traduisant la présence de malformations squelettiques mais qui elles aussi peuvent être apparentées à des retards de croissance et trompent le diagnostic du pédiatre qui peut être statué tard dans l'enfance ou pendant l'adolescence du patient, compliquant la prise en charge thérapeutique pour les formes sévères et tardives.

Le parcours diagnostic d'une MPS commence par la confirmation des suspicions à l'examen clinique et notamment des altérations orthopédiques par radiographie, ce qui permet de demander un dosage des GAGs dans les urines (Piraud et al. 1993). Le type de GAGs

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

accumulés oriente vers un type de MPS puis le dosage de l'activité enzymatique permet la confirmation du diagnostic mais aussi d'évaluer si une activité résiduelle est présente afin d'adapter au mieux la perspective thérapeutique à proposer au patient (Figure 5) (Andrade et al. 2015; Michaud et al. 2020; Pará et al. 2020; Winner et al. 2023).

Comme pour certaines MSLs, les options thérapeutiques sont encore très limitées, et seulement des patients diagnostiqués suffisamment jeunes et atteints de certains types de MPS (I, II, IV A, VI, VII) peuvent bénéficier d'ERT ou de HSCT qui permettra d'augmenter leur espérance de vie (Tableau 2) (Michaud et al. 2020; Platt, Boland, et van der Spoel 2012).

1.4 LES GLYCOSAMINOGLYCANES ET L'HEPARANE SULFATE

1.4.1 *Synthèse et structure des glycosaminoglycanes*

Les glycosaminoglycanes (GAGs) ou mucopolysaccharides sont des sucres hydrophiles exprimés au sein de la MEC qui entoure et soutien l'ensemble des types cellulaires. Couplés à des protéines, ils forment des protéoglycanes (PGs) ancrés ou non dans la membrane plasmique (MP) et ont des rôles primordiaux dans la signalisation cellulaire tels que la croissance, le développement ou la transduction du signal. De plus, en établissant l'architecture de la MEC, les GAGs assurent le maintien des cellules en son sein.

Les GAGs sont des chaînes d'unités disaccharidiques répétées, chargées négativement, linéaires et sans ramifications. Leur charge négative est conditionnée par leur teneur en groupements acides, leur niveau de sulfatation et leur longueur. Celle-ci avoisine la centaine de nm et peut varier de 20 à 200 unités disaccharidiques qui équivaut à un poids moléculaire entre 5 à plus de 100 kDa pour la plupart.

Chaque unité est composée d'un groupement d'acide uronique (acide iduronique (IdoA) ou acide glucuronique (GlcA)) ou d'un galactose puis d'une hexosamine N-acétylée (glucosamine (GlcNAc) ou galactosamine (GalNAc)), dont la nature va permettre de les classer en 5 groupes : l'HS, la CS, le DS, le KS et l'HA (Tableau 3).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

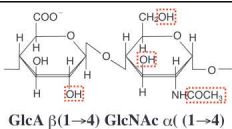
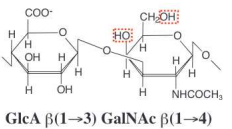
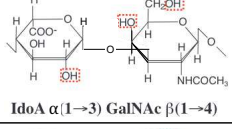
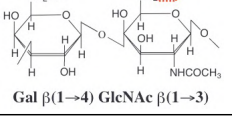
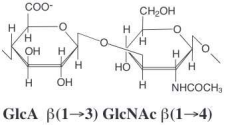
L'HA est particulier car il n'est ni sulfaté, ni rattaché à une protéine et peut peser jusqu'à 8000 kDa avec plus de 2500 unités disaccharidiques. L'HS présente un isoforme structural appelé l'héparine, qui est un GAG intracellulaire deux fois plus sulfaté et acide que l'HS et avec un groupement IdoA à la place du GlcA (Afratis et al. 2012; Bandtlow et Zimmermann 2000; Gandhi et Mancera 2008; Vynios, Karamanos, et Tsiganos 2002).

A l'exception du KS et de l'HA, les chaînes de GAGs sont synthétisées dans l'appareil de Golgi de manière séquentielle par l'ajout d'unité disaccharidique après leur liaison à leur protéine cœur qui sont-elles synthétisées dans le réticulum endoplasmique (ER).

L'attachement des GAGs à leur protéine se fait par un point d'ancrage constitué d'un résidu sérine (Ser) couplé à une liaison tétrasaccharidique composée d'un xylose (Xyl), deux galactoses (Gal) et un GlcA (Figure 6). La synthèse de cette liaison est catalysée par l'activité des enzymes UDP-Xyl transférase, UDP-Gal transférase I et II, UDP-GlcA transférase I respectivement.

Tableau 3 : Les différents types de glycosaminoglycanes

Tableau créé d'après Gandhi et Mancera 2008 et Prydz et Dalen 2000. Les différents sites de sulfatation sont encadrés en rouge.

Glycosaminoglycan	Dissaccharide units	Uronic acid or Galactose	Hexosamine	Molecular weight (kDa)	Characteristics	Repartition
Heparan sulphate	 GlcA $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc $\alpha(1\rightarrow4)$	D-glucuronic acid (GlcA)	D-glucosamine (GlcNAc)	10-70	Major component of ECM in mammals	Basement membrane and as a ubiquitous component of cell surfaces
Chondroitin sulphate	 GlcA $\beta(1\rightarrow3)$ GalNAc $\beta(1\rightarrow4)$	D-glucuronic acid (GlcA)	D-galactosamine (GalNAc)	5-50	Most abundant GAG in the body Bind to proteins (like collagen) to form proteoglycan aggregates	Cartilage, tendon, ligament, aorta
Dermatan sulphate	 IdoA $\alpha(1\rightarrow3)$ GalNAc $\beta(1\rightarrow4)$	L-iduronic acid (IdoA)	D-galactosamine (GalNAc)	15-40	Most abundant GAG in the skin	Skin, blood vessels, heart valves, lungs
Keratan sulphate	 Gal $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc $\beta(1\rightarrow3)$	Galactose (Gal)	D-glucosamine (GlcNAc)	4-19	Most heterogeneous GAG	Cornea, cartilage (aggregated with CS)
Hyaluronic acid	 GlcA $\beta(1\rightarrow3)$ GlcNAc $\beta(1\rightarrow4)$	D-glucuronic acid (GlcA)	D-glucosamine (GlcNAc)	4-8000	Non-sulphated Non-covalently attached to proteins in the ECM Also found in bacteria	Synovial fluid, vitreous humour, ECM of loose connective tissue

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

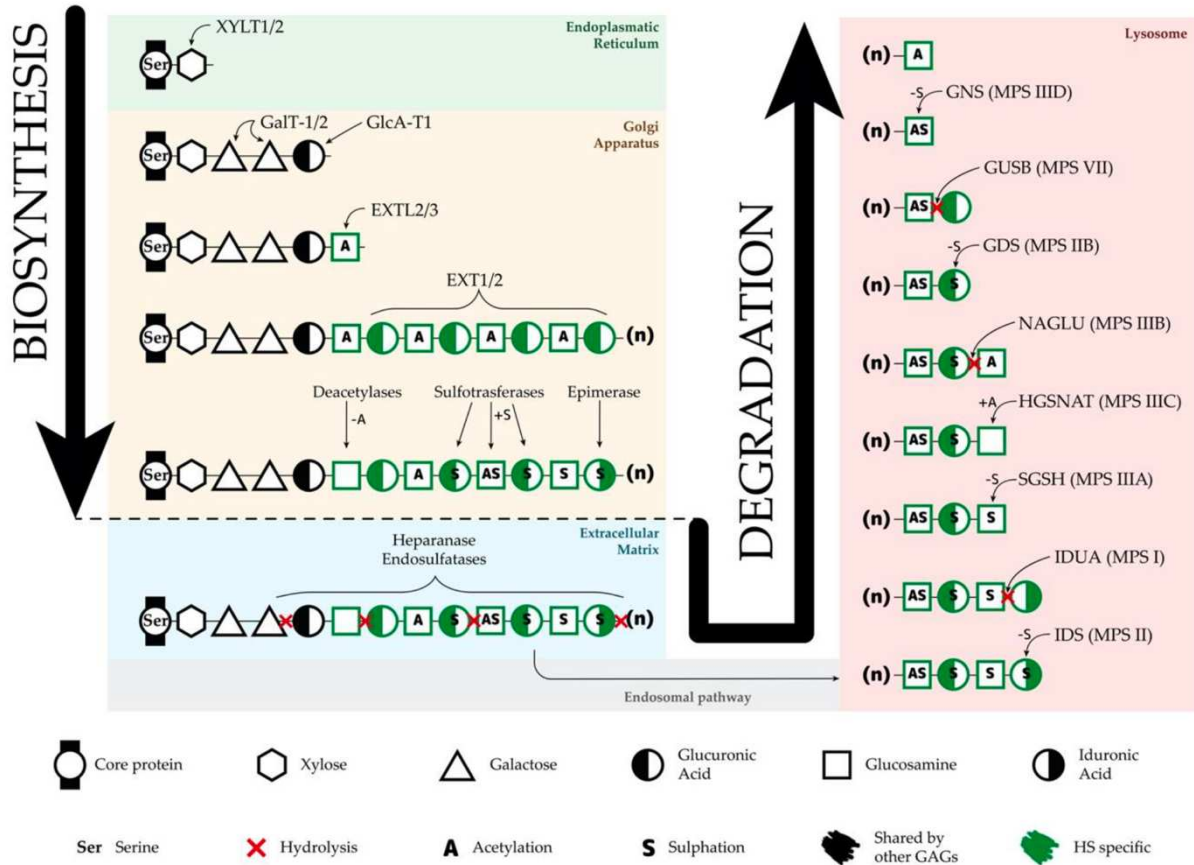


Figure 6 : Voies de synthèse et de dégradation des protéoglycanes d'héparane sulfate
D'après Benetó et al. 2020.

Le devenir du GAG synthétisé sur ce tétrasaccharide va être déterminé par deux activités enzymatiques distinctes. La GlcNAcT I (pour N-acétyl glucosamine transférase I) – dépendante des deux gènes EXTL2 et EXTL3 – par l'ajout d'un GlcNAc va amorcer la synthèse d'une chaîne HS ou héparine et la GalNAcT I (pour N-acétyl galactosamine transférase I) qui en ajoutant un GalNAc va potentialiser la synthèse d'une chaîne DS ou CS (Benetó et al. 2020; Prydz et Dalen 2000; Sarrazin, Lamanna, et Esko 2011). La préférence pour le type de GAG synthétisé est régie par la nature de la protéine mais aussi selon différents mécanismes de régulation, tels que la conformation du premier sucre ajouté sur le tétrasaccharide ou par le contrôle du transport dans le Golgi des UDP- transférases. Également, des modifications secondaires du tétrasaccharide peuvent avoir lieu avec l'addition de résidus d'acides aminés sur la Ser, la modification de ses sucres par phosphorylation, sulfatation ou épimérisation (Prydz et Dalen 2000).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1.4.2 *Structure, classification, fonctions, dégradation des protéoglycanes d'héparane sulfate*

Suite à l'ajout du premier résidu GlcNAc, le squelette du protéoglycane d'HS (HSPG) prend forme grâce à la prise en charge par le complexe enzymatique EXT1/2 de l'élongation du polymère d'HS permettant l'addition alternée d'un résidu GlcA ou d'un GlcNAc.

Finalement, le GAG synthétisé va subir plusieurs types de transformations comme le transfert d'un groupement sulfate par sulfatation, la modification d'un GlcNAc en glucosamine (GlcN) par désacétylation ou d'un GlcA en IdoA par épimérisation (Benetó et al. 2020).

Ces modifications définies par ce qu'on pourrait appeler le « HS code » – à l'instar de l'« histone code » au niveau épigénétique – vont permettre l'obtention de divers HSPGs qui seront tissus voire cellules-spécifiques. Mais surtout, ces modifications vont offrir aux HSPGs de nombreuses possibilités d'interactions en créant des sites de liaison aux ligands comme c'est le cas des facteurs de croissance FGF (pour fibroblast growth factor) par la sulfatation des HSs (Bishop, Schuksz, et Esko 2007; Bülow et Hobert 2004; Condomitti et de Wit 2018).

Les HSPGs appartiennent à un groupe protéique d'au moins 17 membres avec une grande variabilité de forme et de taille qui sera déterminante pour le « HS code » et la définition de leur fonction, puisque leur nature sera dépendante de leur lieu d'adressage après leur maturation dans le Golgi. Ainsi, leur zone d'expression va permettre leur classification en HSPGs transmembranaires (syndécans), ancrés à la MP grâce à un motif GPI (glypicans), associés à la MEC (perlécan, agrine, collagène XVIII) ou intracellulaires contenus dans une vacuole destinée à être sécrétée (serglycine) (De Pasquale et Pavone 2019; Sarrazin et al. 2011). Certains sont même caractérisés de protéoglycanes « part-time » qui au contraire des protéoglycanes « full-time » ne sont pas toujours liés à un GAG comme c'est le cas du récepteur neuropiline-1 (NRP-1) qui au sein du système nerveux central (SNC) est exprimé par le neurone et au cours du développement a un rôle prépondérant dans le guidage axonal (Figure 7 et Tableau 4) (Afratis et al. 2012; De Pasquale et Pavone 2019; Prydz et Dalen 2000; Sarrazin et al. 2011; Zhang, Wang, et Sheng 2016).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 4 : Classification des protéoglycanes d'héparane sulfate

D'après Colin-Pierre et al. 2022, De Pasquale et Pavone 2019 et Sarrazin et Lamanna et Esko 2011.

Class	Proteoglycan	Molecular weight (kDa)	Nature and number of GAG chains	Repartition	Functions
Transmembrane	Syndecan-1	31-45	3-4 HS 1-2 CS	Radial glia, oligodendrocyte precursor cells	Growth factor co-receptors, Adhesion, Cytoskeletal remodeling, Migration
	Syndecan-2		2-3 HS	Immature and mature neurons, oligodendrocytes	
	Syndecan-3		3-4 HS 1-2 CS	Immature and mature neurons, oligodendrocyte precursor cells	
	Syndecan-4		2-3 HS	Astrocytes, oligodendrocytes	
	Betaglycan (TGFβIII) "part-time" PG	110	1-2 HS or CS	Ubiquitously-expressed	
	Neuropilin-1 "part-time" PG	130	1 HS or CS	Neurons	
	CD44v3	37	1 HS and CS	Endothelial cells	
Membrane-anchored	Glypican-1	57-69	1-3 HS	Neural progenitor cells, immature and mature neurons, radial glia, astrocytes, progenitor and differentiated oligodendrocytes	Regulation of cell signaling during tissue or organ development and regeneration
	Glypican-2			Neurons	
	Glypican-3			Neurons of the spinal cord and dorsal root ganglia	
	Glypican-4			Neural progenitors cells, mature neurons, radial glia, astrocytes	
	Glypican-5			Precursors and mature oligodendrocytes	
	Glypican-6			Astrocytes	
Extracellular matrix	Perlecan	400	1-4 HS	Astrocytes, oligodendrocytes	Integrity and function of basement membranes
	Agrin	212	2-3 HS	Axons, dendrites, neuromuscular synapses	
	Collagen XVIII	150	1-3 HS	Neuroblasts in the central and peripheral nervous system	
Secretory vesicles	Serglycin	10-19	10-15 Heparin and CS	Mast cells, hematopoietic cells, macrophages, endothelial cells and in embryonic stem cells	Inflammatory response

La plupart des HSPGs sont impliqués dans la modulation de différentes voies de signalisation cellulaire de par leur capacité à s'associer au niveau de la surface cellulaire à des ligands et leurs récepteurs, comme ceux appartenant à la grande famille des FGFs, jouant ainsi le rôle de corécepteur.

Également, ils se lient aux protéines BMPs (pour bone morphogenetic proteins), Shh (pour sonic hedgehog) et Wnt, montrant leur rôle fondamental dans la croissance et le développement cellulaire et qui plus est au niveau du SNC (Bishop et al. 2007; Colin-Pierre et al. 2022; De Pasquale et Pavone 2019). Effectivement, ces protéines sont connues pour être

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

essentielles dans la mise en place du neur ectoderme pendant le développement embryonnaire, dans la croissance et le guidage axonal mais aussi la synaptogenèse ayant lieu après la mise en place des neurones au sein des couches corticales. La maturation du cortex fait également appel à des HSPGs extracellulaires exprimés dans la membrane basale, qui en lien étroit avec les protéines de la MEC vont jouer un rôle de support aux cellules impliquées lors de la migration des progéniteurs neuronaux le long de la glie radiaire, mais aussi dans la croissance et la direction axonale (Benetó et al. 2020; Colin-Pierre et al. 2022; Long et Huttner 2019; Poulain et Yost 2015).

La serglycine, seul HSPG contenu dans des granules sécrétoires, est capable de fixer de nombreux ligands à la fois grâce à sa composition en chaînes d'héparine hautement sulfatées. Elle est largement représentée chez les cellules immunitaires et impliquée dans la réponse inflammatoire en délivrant des cytokines, chimiokines, protéases ou encore des granules

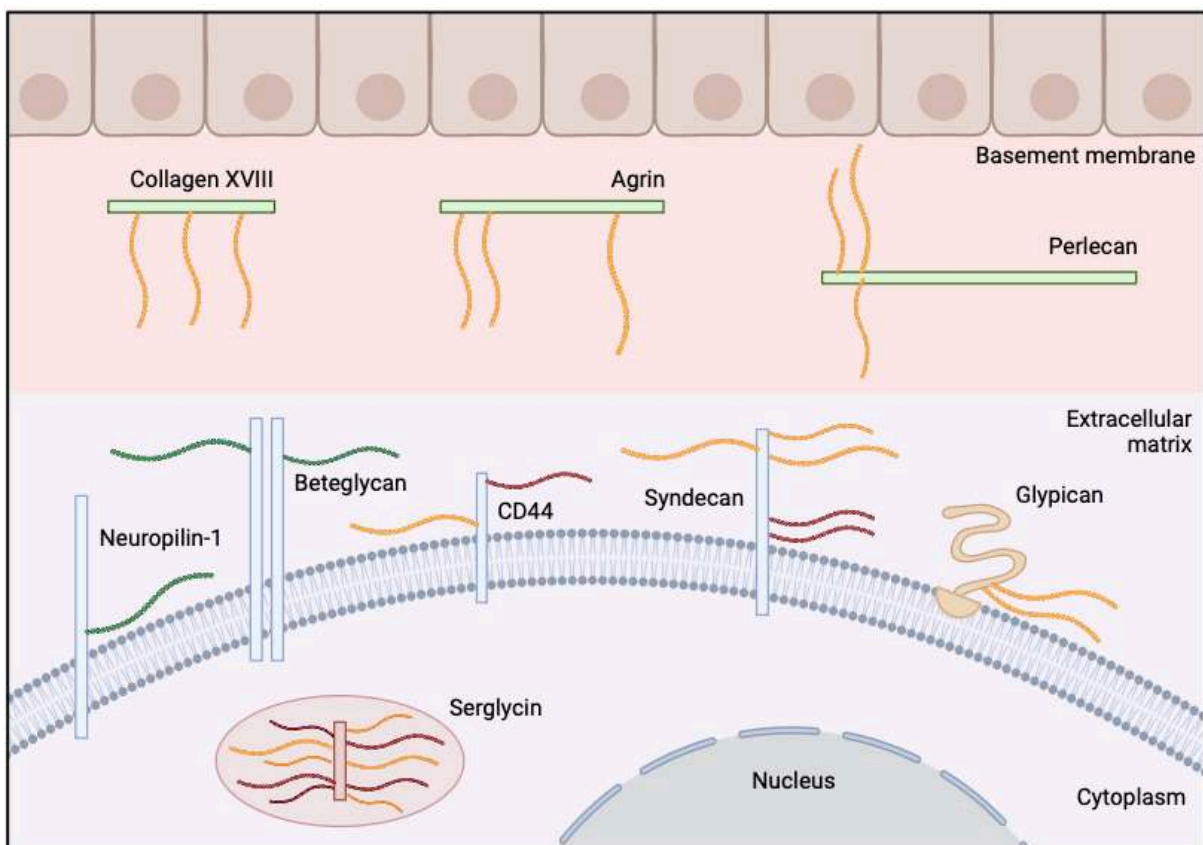


Figure 7 : Différentes formes de protéoglycannes d'héparane sulfate et leur localisation cellulaire

Figure créée sur BioRender d'après Colin-Pierre et al. 2022 et Edwards 2021. Les chaînes d'HS sont représentées en jaune et celles de CS en rouge. Lorsque les chaînes peuvent être soit d'HS ou de CS elles sont représentées vert.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

riches en histamine dans le cas de la régulation de l'allergie par les mastocytes (Bishop et al. 2007; Colin-Pierre et al. 2022; Sarrazin et al. 2011).

Concernant l'inflammation, la serglycine n'est pas le seul HSPG y jouant un rôle, puisqu'il a largement été démontré que les HSs libres, les HSPGs associés à la MEC ou encore membranaires interagissent et activent directement le récepteur TLR4 (pour Toll-like receptor 4) et médient une forte réponse pro-inflammatoire de la même manière que son ligand principal le lipopolysaccharide (LPS) bactérien (Ausseil et al. 2008; Collins et Troeberg 2019; O'Callaghan, Zhang, et Li 2018). L'effet inflammatoire médié par les HSPGs est dépendant de la sulfatation de ses chaînes et peut aussi être lié à la protéolyse des syndécans transmembranaires par les métalloprotéinases matricielles (MMPs), permettant de libérer un ectodomaine soluble du HSPG (Figure 8). Ce dernier sera capable d'induire une signalisation dans les cellules adjacentes en interagissant avec d'autres récepteurs aussi bien que de favoriser le transport dans la MEC d'un grand nombre de ligands liés aux domaines sulfatés des HSs (Betriu et al. 2021).

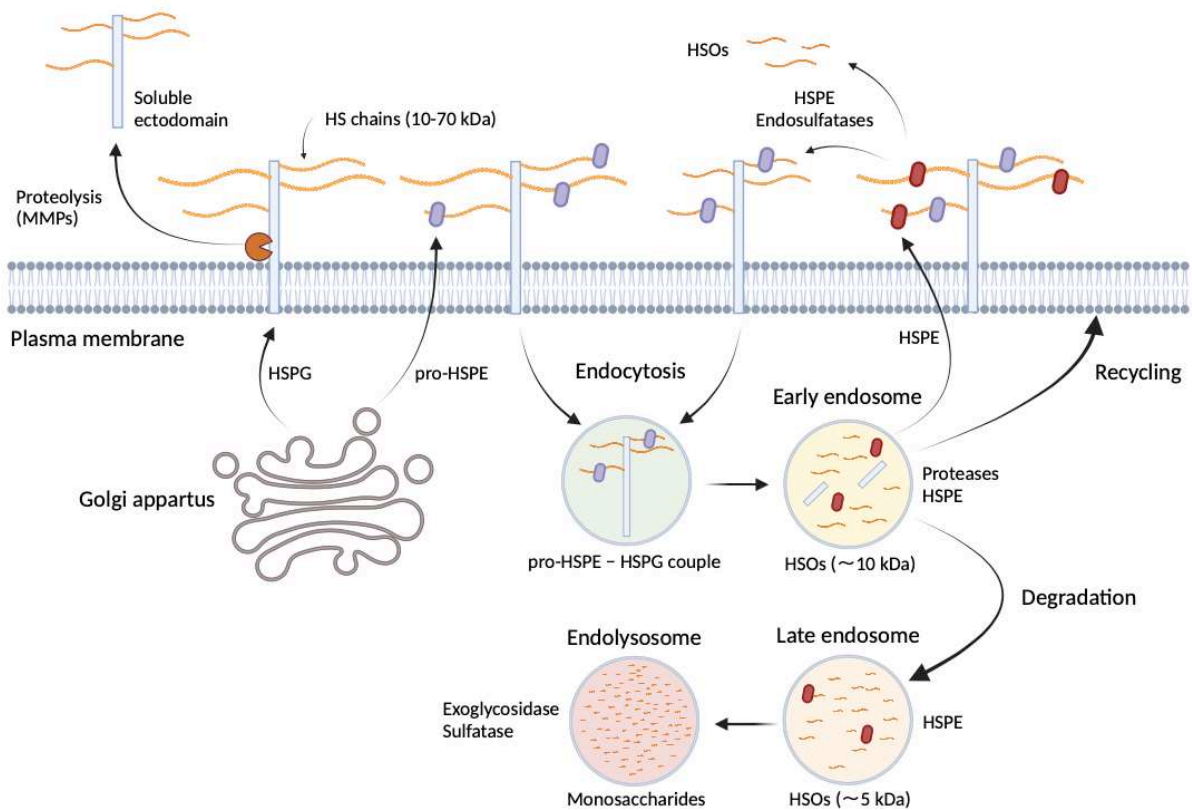


Figure 8 : Dégradation des HSPGs

Figure créée sur BioRender d'après Rabelink et al. 2017 et Yanagishita et Hascall 1992.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Finalement, qu'il soit soluble ou qu'il provienne de la MP, l'HSPG sera endocyté en vue de son recyclage à travers la voie endosomale ou bien de sa dégradation lysosomale. Avant l'endocytose de l'HSPG, les HSs se verront retirer certains de leurs groupements sulfates par l'action des endosulfatases et la forme précurseur de l'héparanase (pro-HSPE) va se lier spécifiquement aux chaînes d'HSs et terminer sa maturation dans l'endosome précoce grâce à la cathepsine L. L'héparanase active (HSPE) est une endoglycosidase spécifique du clivage des disaccharides au niveau de la liaison β entre les résidus GlcA et GlcNAc résultant en la digestion primaire des HSs en HSOs dans les endosomes précoce et tardif, mais aussi au niveau extracellulaire puisque l'HPSE peut être exocytée une fois mature. La partie protéique du PG est séparée de ces chaînes d'HSO et peut être recyclée à la membrane ou dégradée par des protéases. Suite à la fusion avec le lysosome, le pH acide de l'endolysosome va engager la dégradation totale des HSOs en monosaccharides par l'activité successive de 11 enzymes spécifiques pouvant être des exoglycosidases, sulfatases ou acétyltransférase (Figure 6 et 8) (Rabelink et al. 2017; Yanagishita et Hascall 1992).

Dans le cas des MPSs, l'incapacité de catalyse par l'une de ces 11 hydrolases lysosomales – déterminée en fonction du sous-type de MPS – va entraîner une surcharge en fragments d'HSOs du lysosome qui aura des effets dévastateurs au niveau du métabolisme de la cellule. Les HSOs s'accumulant aussi dans le milieu extracellulaire entre autres à cause de l'activité fonctionnelle de l'HSPE vont se retrouver en grande concentration dans tous les fluides biologiques y compris dans les urines à partir desquelles la première étape du diagnostic, le dosage des GAGs, de cette maladie sera réalisée (Figure 6) (Benetó et al. 2020; Goodall et al. 2014).

Comme évoqué précédemment, les HSOs sont largement impliqués dans la transmission de l'inflammation qui peut être un des moteurs dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives, comme la MPS III, par le biais de la microglie, le macrophage résident du SNC (Ausseil et al. 2008; Martins et al. 2015; Siddiqui, Oshima, et Hippensteel 2022). D'importants travaux ont aussi démontré l'incidence directe des HSPGs dans la maladie de Parkinson (PD) ou les tauopathies dont la AD, de par leur facilité d'interaction avec la protéine tau et leur aptitude pour prendre en charge son internalisation par activation de l'endocytose. Egalement présents au sein des plaques β -amyloïdes ($A\beta$), les HSPGs vont

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

potentialiser leur genèse et leur aggrégation (Dudas et Semeniken 2012; van Horssen et al. 2003; Snow, Cummings, et Lake 2021). Finalement, une étude récente a même démontré que le « HS code » pourrait jouer un rôle primordial dans la prise en charge de tau en induisant en fonction des sites sulfatation des chaînes d'HS soit l'internalisation, la phosphorylation, ou encore l'aggrégation de la protéine (Mah et al. 2021).

L'ensemble de ces découvertes soutien le rôle déterminant d'un défaut du lysosome dans l'ensemble des maladies neurodégénératives et l'accumulation de molécules altérées.

2 LA MUCOPOLYSACCHARIDOSE DE TYPE III

2.1 CARACTERISTIQUES CLINIQUES

2.1.1 Classification et épidémiologie

Le syndrome de Sanfilippo ou MPS de type III est une MPS avec une atteinte neurologique sévère et très peu d'atteintes périphériques qui ne découlent pas directement des symptômes centraux.

Elle est classée en quatre sous-types A, B, C et D, en fonction de la mutation d'un gène codant pour l'une des quatre exoglycosidases différentes impliquées dans la dégradation séquentielle de l'HS : l'héparane-N-sulfamidase (SGSH) dans la MPS IIIA, l' α -N-acétylglucosaminidase (NAGLU) dans la MPS IIIB, l'héparane-acétyl-CoA- α -glucosaminide-N-acétyltransférase (HGSNAT) dans la MPS IIIC, et la N-acétylglucosamine-6-sulfatase (GNS) dans la MPS IIID (Figure 6 et 8).

Avec une grande hétérogénéité allélique, les mutations différentes sont nombreuses et de différents types mais conduisent toutes au déficit de l'activité enzymatique et à l'accumulation d'HS partiellement dégradé (Tableau 5) (Benetó et al. 2020).

Récemment, un nouveau sous-type MPS IIIE a été décrit dans des modèles murin et canin, est causé par la mutation génique codant pour l'enzyme arylsulfatase G (ARSG) aussi appelée N-glucosamine-3-O-sulfatase impliquée au même titre que les 4 autres enzymes dans le catabolisme de l'HS (Fedele 2015; Kowalewski et al. 2012; Spahiu et al. 2021). Comme la SGSH, la ARSG permet le retrait d'un groupement sulfate sur le résidu GlcNAc (Figure 1). Cependant, cette mutation de l'ARSG n'a pas encore été décrite chez l'homme.

Tableau 5 : Différentes types de mutations décrites dans le syndrome de Sanfilippo

D'après Benetó et al. 2020.

	Total Mutations	Missense/ Nonsense	Small Deletions	Small Insertions	Small Indels	Splicing	Gross Deletions	Gross Insertions and Duplications	Complex Rearrangements
A (SGSH)	155	118	20	9	1	3	3	1	0
B (NAGLU)	229	167	29	16	1	8	4	4	0
C (HGSNAT)	77	43	6	6	1	15	4	1	1
D (GNS)	25	7	5	4	1	4	2	0	2

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 6 : Classification des MPS III

D'après Andrade et al. 2015, Celik et al. 2021, Héron et al. 2010 et Zelei et al. 2018.

Clinical type	Incidence (mean)	Geographic region with highest prevalence	Frequency (%)	Onset (years)	Age at diagnosis (years, mean)	Death (years)
III A	1 : 100,000	Northern and Eastern Europe	60	1.5 – 4	3.5 – 4.9	< 20
III B	1 : 200,000	Southern Europe (Greece)	30	1 – 4	3.5 – 4.9	< 20
III C	1 : 1,500,000	Netherlands, Portugal, Australia	4	3 – 7	4.5 – 19	> 20
III D	1 : 1,000,000	Turkey, Italy	6	2 – 6	8.3	< 20

La MPS IIIA est la forme la plus fréquente et présente les symptômes les plus sévères, qui se manifestent dès la première année de vie d'où son diagnostic généralement plus précoce, même si globalement le syndrome de Sanfilippo est diagnostiqué entre 2 et 6 ans. De plus, les différentes MPS III ont une distribution géographique, avec par exemple une plus grande proportion de cas MPS IIIB dans le sud de l'Europe et plus particulièrement en Grèce (Tableau 6) (Andrade et al. 2015; Celik et al. 2021; Fedele 2015; Héron et al. 2011; Muschol et al. 2022; Valstar et al. 2010; Zelei et al. 2018).

2.1.2 Neuropathologie et l'histoire naturelle de la maladie

Les enfants atteints du syndrome de Sanfilippo, vont acquérir des premiers apprentissages moteurs et cognitifs à des âges attendus, tels que le déplacement en rampant, la capacité de marche indépendante ou la mémorisation de quelques mots (Tableau 7). Or, très rapidement les jeunes patients présenteront des retards de développement neurocognitif visibles au moment de l'élaboration de phrases courtes, une compétence qu'ils n'acquerront qu'entre 3 et 4 ans, tandis que les enfants non atteints en sont capables entre 2 et 3 ans, mais également de construire des phrases complexes dès l'âge de 4 ans (Tableau 7 et Figure 9). Ces retards seront accompagnés de troubles du comportement, de l'hyperactivité et du sommeil qui seront pour la moitié des enfants aussi bien causes que conséquences de l'établissement plus tardif de crises épileptiques généralisées et dans la plupart des cas de type tonico-cloniques (Scarpa, Lourenço, et Amartino 2017).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 7 : Histoire naturelle de la maladie en fonction du type de MPS III

D'après Héron et al. 2010. Les âges d'apparition des symptômes sont exprimés en moyenne.

Clinical type	Number of patients	Independent walking (years)	Two-word combinaison (years)	Onset of cognitive delay (years)	Abnormal behavior (years)	Loss of independent walking (years)	Loss relational interaction (years)
III A	76	1.4	3.1	3.2	4.4	11.1	10.0
III B	16	1.2	3.9	3.7	5.8	16.0	11.2
III C	13	1.3	3.4	5.3	5.1	20.3	17.2
III D	6	1.3	2.3	6.6	7.4	13.4	13.0

Suivant la progression de la maladie, les enfants MPS III se verront perdre leurs acquis causés par des déficits intellectuels de plus en plus lourds qui seront mesurables par le quotient développemental (DQ) établi selon différents tests cognitifs comme ceux de Brunet-Lezine, Vineland ou le PEP-3. La chute du DQ est souvent corrélée à une neurodégénérescence associée à la perte généralisée de la matière grise composant le cortex et des noyaux gris centraux et l'augmentation du volume des ventricules, visible par une imagerie à résonance magnétique (IRM) cérébrale. L'utilisation de l'IRM et d'évaluation du DQ sont essentiels afin d'adapter un protocole thérapeutique et pour l'inclusion de patients dans des essais cliniques (Figure 11) (Deiva et al. 2021; Tardieu et al. 2017; Winner et al. 2023).

La mort neuronale est massive et présente dans de nombreuses structures cérébrales mais majoritaire dans le cortex – où elle débute –, la substance noire, le thalamus, le striatum, le cervelet et le tronc cérébral (Harm et al. 2021). De plus, l'apparition précoce et l'évolution

Systemic disease

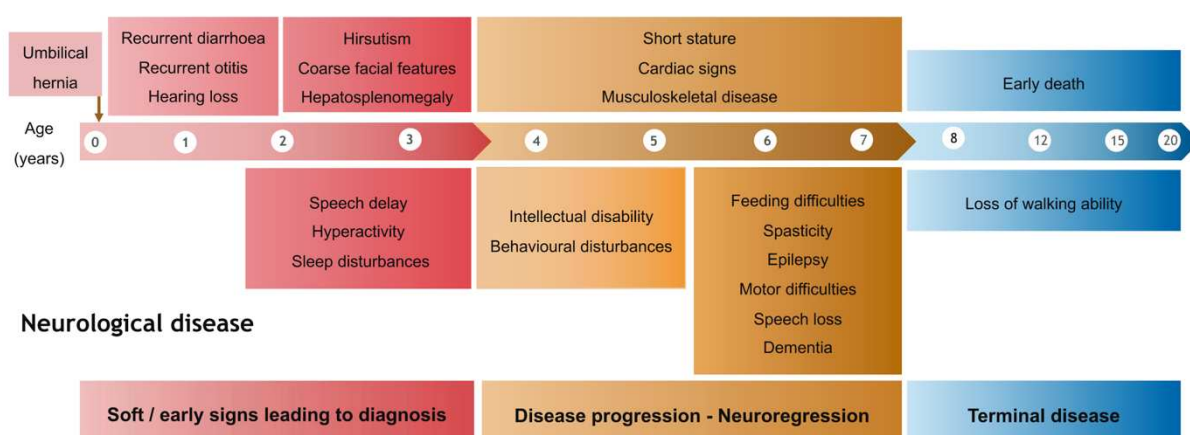


Figure 9 : Symptômes neurologiques et systémiques dans la MPS III

D'après Seker Yilmaz et al. 2020.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

rapide de la neurodégénérescence finira par conduire à une forme de démence présentant des caractéristiques communes avec les maladies neurodégénératives de l'adulte. La perte du langage accompagnée de l'aggravation des troubles de l'audition conduisent les patients vers une rupture totale sociale avec leur entourage (Tableau 7 et Figure 9).

L'évolution finale de la maladie conduira à une régression motrice quasi totale entraînant des difficultés de mouvement et de mobilité et obligeant le patient dans ses dernières années de vie à recourir à une assistance pour se nourrir et se déplacer.

Les formes les plus sévères de la maladie conduisent au décès avant l'âge adulte, tandis que les formes moins sévères avec une espérance de vie plus longue peuvent mener à des symptômes neuropsychiatriques de l'adulte tels que de la dépression ou des troubles psychotiques (Tableau 7 et Figure 9) (Andrade et al. 2015; Fedele 2015; Héron et al. 2011; Pará et al. 2020).

2.1.3 Stratégies thérapeutiques à l'étude

A l'heure actuelle, aucun traitement étiologique efficace n'existe pour traiter le syndrome de Sanfilippo, dont le défi majeur consiste à assurer le passage de la barrière hématoencéphalique (BHE) au traitement curatif. Cette barrière permet à la fois de maintenir une protection du SNC contre les agents pathogènes circulants par exemple, mais qui complique le développement de thérapie ayant pour cible le cerveau (Benetó et al. 2020; Kong et al. 2020; Sawamoto et al. 2019; Seker Yilmaz et al. 2021).

L'avancée de la recherche translationnelle sur les MSLs a tout de même permis l'amélioration de la qualité de vie des patients atteints de pathologies comme le syndrome de Sanfilippo où seuls les traitements symptomatiques ou de soutien existent. Également, l'espérance de vie a été améliorée pour d'autres MSLs où des thérapies étiologiques peuvent être proposées.

Dans tous les cas, en fonction de la mutation génétique la prise en charge s'envisagera suivant différentes approches thérapeutiques (Figure 10).

L'HSCT par transplantation de moelle osseuse **(1)** peut être utilisée dans les maladies neurologiques et périphériques dès les premiers moments de vie comme dans le cas de la MPS

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I (Hurler) ou de la leucodystrophie à cellules globoïdes (maladie de Krabbe). Cette approche permet d'apporter au patient des cellules souches d'origines hématopoïétiques avec des enzymes fonctionnelles. Ces cellules circulantes vont pouvoir migrer et atteindre les tissus touchés par la maladie, leur permettant de rétablir l'activité enzymatique et la réduction du substrat. Cette technique permet également un apport en macrophage efficient, capable de phagocyter et de digérer de grandes quantités de métabolites accumulés.

La HSCT, à l'étude dans les MPS IIIA et B, serait une thérapie intéressante par sa capacité à remplacer la microglie pro-inflammatoire chronique par une microglie compétente qui par l'expression de l'enzyme active est capable de phagocyter et de dégrader les HSOs. Malheureusement, le processus est trop lent et n'empêche pas les dommages d'être causés, rendant tout de même intéressante sa combinaison à une transplantation de cellules souches neurales (Ebrahimi et al. 2021) ou à la thérapie génique en utilisant des cellules souches génétiquement modifiées dont les résultats semblent prometteurs (Holley et al. 2018).

L'ERT (2) est la plus utilisée des thérapies et est montrée comme étant particulièrement efficace dans le cas des affections pulmonaires, articulaires ou hépatospléniques. Elle est

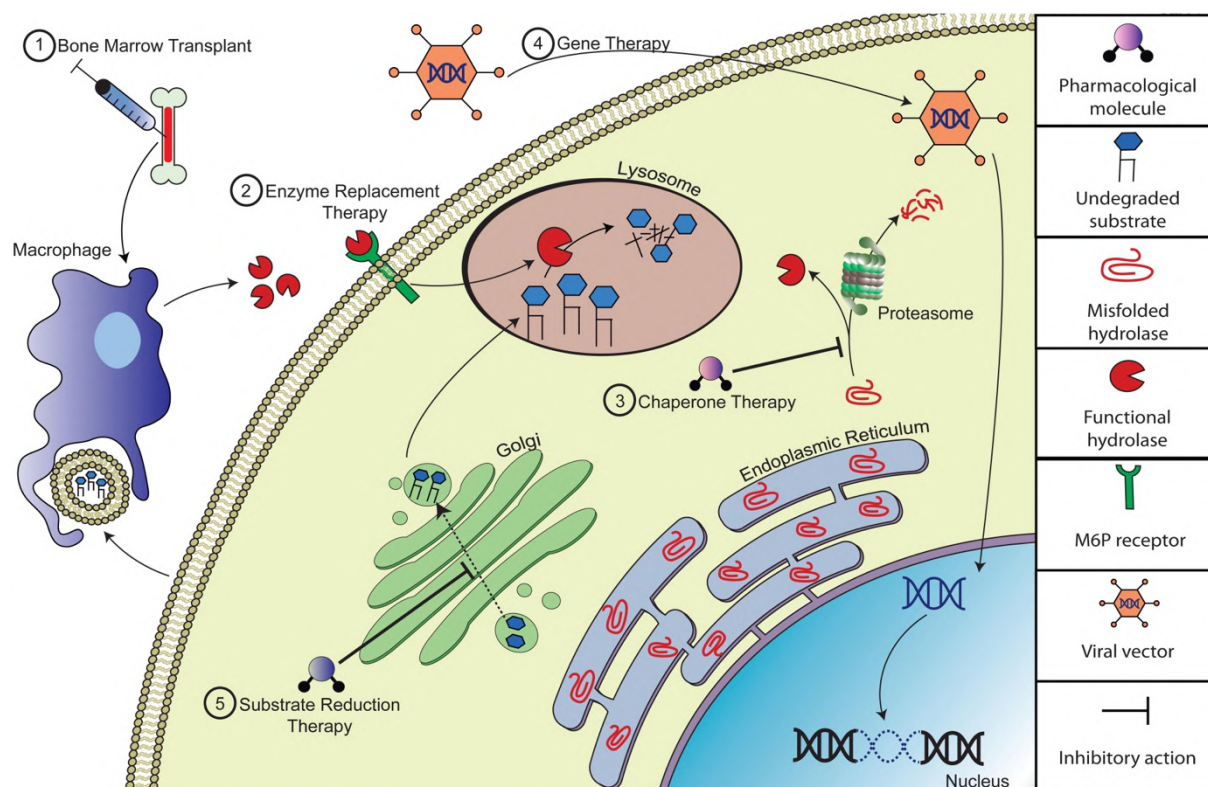


Figure 10 : Stratégies thérapeutiques dans les MSLs

D'après Favret et al. 2020.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

proposée dans le cas où le transport de l'hydrolase est défectueux et peut être rétabli par une bonne conformation de l'enzyme avec un résidu M6P.

Dans le cas des MPS III, l'ERT n'est pas recommandée, puisque injectée dans la circulation sanguine systémique, la porosité de la BHE ne permet pas à l'enzyme d'atteindre le SNC, contrairement à la SRT **(5)** qui utilise des molécules de petites tailles auxquelles la BHE est permissive.

La SRT permet de directement inhiber la synthèse du substrat accumulé mais représente directement une limite à cette option puisqu'il faut réussir à garder une balance physiologique de synthèse/dégradation du substrat enzymatique. Dans le cas où les GAGs seraient le produit accumulé, l'utilisation des ARNs interférents est à l'étude afin d'empêcher l'activité des enzymes responsables de la formation de la liaison tétrasaccharidique entre les GAGs et leur protéine. Également, plusieurs molécules comme les isoflavones ont été proposées telle que la génistéine pour le traitement par voie orale de la MPS IIIA et B. Après des phases précliniques encourageantes, des études cliniques montrent que la synthèse d'HS est bien réduite et également que la concentration de HSOs accumulés est diminuée dans les urines mais pas significativement dans le liquide céphalorachidien (LCR). De plus, il ne semblerait pas y avoir de diminution de stockage des HSOs dans les neurones et surtout aucun progrès d'un point de vue neurocomportemental chez l'homme n'a été observé.

Cette stratégie thérapeutique serait applicable dans le cas de mutations ne conduisant pas à une déficience totale en l'enzyme et qu'une activité résiduelle est présente, ce qui la rendrait aussi envisageable dans le cas d'une thérapie combinée. En effet, pour une prise en charge efficace, la combinaison des thérapies peut être envisagée comme c'est le cas par exemple avec la GT et la HSCT. Également, l'importance d'un traitement complémentaire est soulevé pour rétablir la fonction d'organites cellulaires altérée suite à la surcharge lysosomale comme l'autophagie ou de signalisations cellulaires comme l'inflammation qui se trouve souvent exacerbée dans les MPSs (Benetó et al. 2020; Favret et al. 2020; Kobayashi 2019; Parenti, Andria, et Ballabio 2015; Platt et al. 2018).

La CT **(3)** ne peut être envisagée que dans le cas où la mutation génétique n'empêche pas la synthèse protéique mais entraîne un défaut post-translationnel de repliement de l'enzyme. L'enzyme pourrait être prise en charge par une molécule chaperonne et la rendre

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

fonctionnelle, ainsi certains derniers essais montrent de plus en plus de résultats favorables dans la MPS IIIC par exemple (Matos et al. 2014).

La GT **(4)** reste la dernière éventualité et celle qui est la plus étudiée puisqu'elle permet la synthèse d'une enzyme fonctionnelle suite à l'apport du gène non muté généralement par le biais d'un vecteur viral. La thérapie génique est très prometteuse puisque le rétablissement de 10 à 15% de l'activité enzymatique serait suffisant pour empêcher la surcharge lysosomale et restaurer le phénotype, si les dégâts causés par la pathologie ne sont pas trop avancés. En effet, ce n'est pas le cas dans les MSLs neuropathologiques puisqu'il faudrait une activité d'au moins 50% pour inhiber l'accumulation de substrat et éviter des dégâts neuronaux. Récemment il aurait été montré que les personnes présentant une hétérozygotie pour certaines enzymes, bien qu'elles soient actives, serait un facteur de risque dans le développement de MND à l'âge adulte (Andrade et al. 2015; Pará et al. 2020).

Dans le cas des MPS III, la GT par supplémentation reste tout de même l'option thérapeutique la plus encourageante, puisqu'elle est applicable à l'ensemble des mutations découvertes, dont les non-sens et faux-sens qui représentent la majorité des mutations (Tableau 5). Seule certaines mutations non-sens avec un codon STOP éloigné de la séquence codant pour le site actif de l'enzyme pourraient être traitées par des thérapies par saut d'exon (Gómez-Grau et al. 2015).

Initialement, pour contourner la BHE, les vecteurs étaient systématiquement délivrés dans le SNC par injection directe dans le parenchyme ou dans les ventricules cérébraux producteurs du LCR permettant une meilleure diffusion dans les différentes structures cérébrales. Le désavantage majeur de ces sites d'injection est l'aspect très invasif du geste chirurgical, avec des effets inflammatoires et toxiques qui peuvent être néfastes pour le jeune patient.

De plus, l'essai clinique par GT dans la MPS IIIB a montré que, malgré une nette amélioration de la production de l'enzyme avec une activité qui persiste au cours du temps, les capacités intellectuelles et motrices de l'enfant ne sont améliorées que si le traitement a lieu avant que la maladie ne soit symptomatique (soit avant l'âge de 2 ans) et que le DQ est au moins supérieur à 60 (Deiva et al. 2021; Tardieu et al. 2017). Le patient MPS IIIB 1 a été inclus dans le protocole de TG à 20 mois, avec un développement neurocognitif proche de celui d'un enfant non atteint (DQ >70, donnée non montrée) et ne présentait pas de perte de volume

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

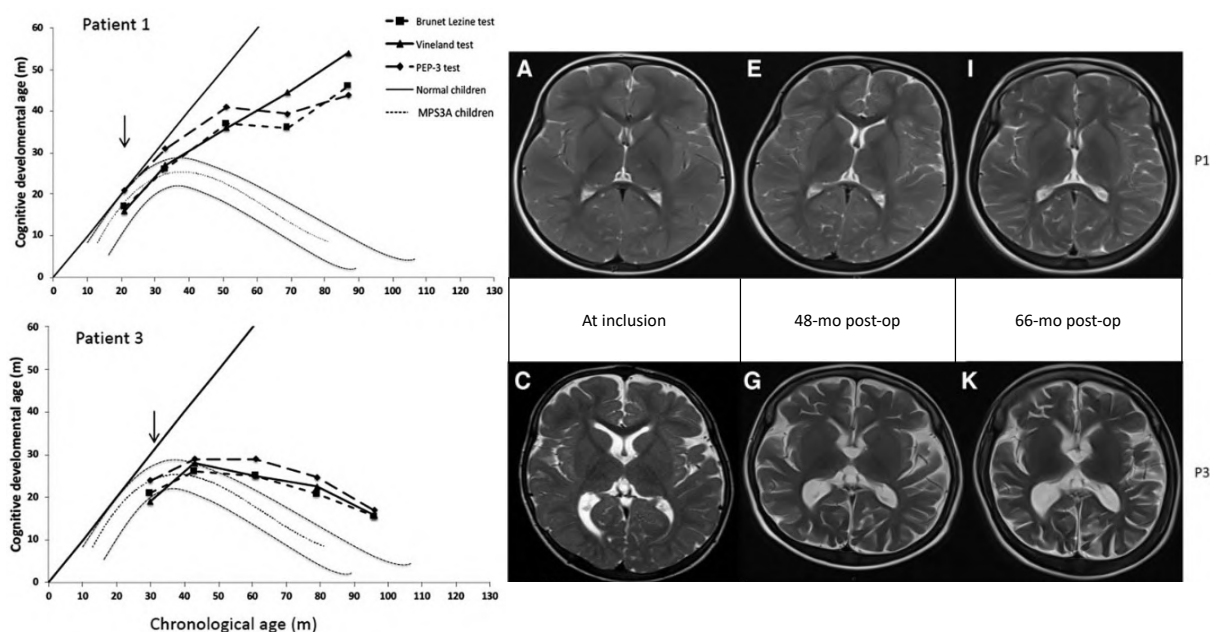


Figure 11 : Corrélation entre développement cognitif et neurodégénérescence chez deux patients MPS IIIB traités par thérapie génique

D'après Deiva et al. 2021. En haut patient 1 et en bas patient 3. **A** Les courbes représentent pour chaque patient leur développement cognitif mesuré selon les tests de Brunet-Lezine (courbe à points carrés), Vineland (courbe à points triangles) et PEP-3 (courbe à points losanges) en fonction de leur âge. La trajectoire du développement neurocognitif des patients est comparée avec le développement d'enfants non affectés et la moyenne des trajectoires attendues chez des patients MPS IIIA avec une pathologie à progression rapide. La flèche représente l'âge du patient au moment de son inclusion dans l'essai clinique de TG. **B** Scans cérébraux par IRM selon une coupe axiale et une pondération en T2.

cérébral contrairement au patient 3 inclus à 30 mois, ce qui a conditionné l'échec de la TG (Figure 11). En effet, chez le patient 1 les résultats sont encourageants, tandis que chez le patient 3 la projection de son développement neurocognitif est comparable à l'histoire naturelle des patients MPS IIIA et les images IRM présentent une augmentation avec le temps de l'atrophie cérébrale.

La recherche avance rapidement et plusieurs essais en phase préclinique utilisent des vecteurs adénoviraux (AAV) avec des tropismes variables, pour la plupart neuronaux mais surtout capables de traverser la BHE, permettant d'envisager l'injection intra-veineuse. De plus, les neurones, contrairement aux cellules gliales, sont des cellules post-mitotiques et de par leur incapacité à se diviser ou à se différencier, permettent une persistance du gène nouvellement apporté par les vecteurs viraux et favorisent leur expression dans le temps (de Castro et al. 2021).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Malgré que la TG soit la stratégie thérapeutique la plus prometteuse elle est souvent réservée aux plus jeunes de la fratrie, diagnostiqués précocement pour la MPS III suite au diagnostic du frère ou de la sœur plus âgé (Hassiotis et al. 2014). Se posent donc à nouveau les problèmes de diagnostics trop tardifs, nécessitant une meilleure compréhension de la physiopathologie cellulaire – malgré une cause très bien décrite – essentielle pour le développement de meilleurs outils dont le dépistage néonatal.

2.2 PHYSIOPATHOLOGIE DE LA MUCOPOLYSACCHARIDOSE DE TYPE III

2.2.1 *Accumulation d'oligosaccharides d'héparane sulfate et de substrats secondaires*

Au niveau cellulaire, la physiopathologie de la MPS III découle directement de la déficience en enzymes lysosomales, essentielles à la phase de dégradation terminale des HSOs en monosaccharides obligatoire à leur catabolisme énergétique (Figure 6, page 30). Leur absence conduit premièrement à la surcharge et la dysfonction lysosomale (Figure 12).

L'immunomarquage des protéines membranaires Lamp-1 et Lamp-2 dans différents modèles murins de MPS IIIA, B et C, a révélé que l'accumulation des HSOs au sein du lysosome va d'abord induire l'augmentation de leur nombre et de leur taille (Ausseil et al. 2008; Hocquemiller et al. 2010; Pan et al. 2022; Vitry et al. 2010; Wilkinson et al. 2012).

Généralisée dans toutes les cellules et de manière ubiquitaire aux tissus centraux et périphériques, le stockage délétère de HSOs dans les lysosomes est particulièrement important dans les neurones à cause de leur incapacité à se diviser. En effet, il a été observé dans des tissus nerveux de patients MPS IIIA que les neurones corticaux, du tronc cérébral, du diencephale mais surtout les cellules de Purkinje sont marqués positivement au bleu de toluidine qui est réactif aux glucides (Dekaban et Constantopoulos 1977). Ces observations ont

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

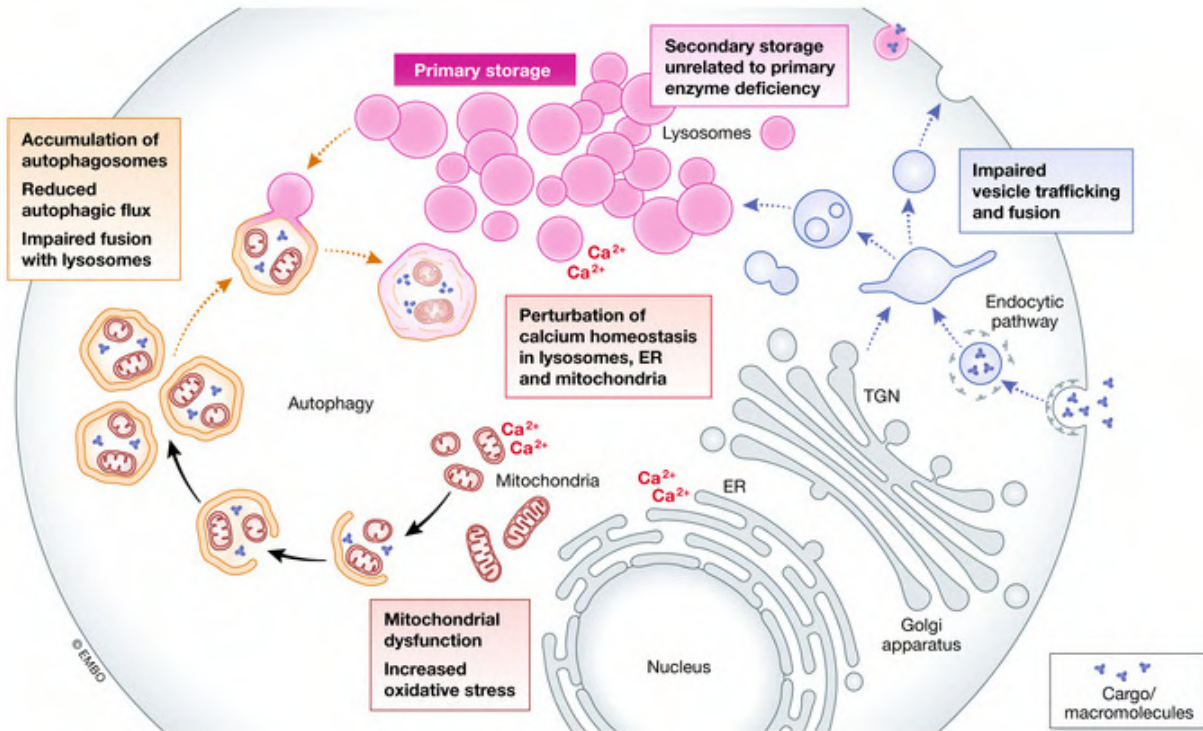


Figure 12 : Accumulations cellulaires dans le cas des MSLs

D'après Parenti et al. 2021.

été nombreuses et répétées dans le modèle canin et chez l'homme atteints de différentes MPS III et par l'utilisation d'une variété de colorations comme celle de Sudan, avec le fer colloïdal ou le PAS (pour periodic acid-Schiff) qui permettent de détecter les polysaccharides acides, sulfatés ou encore des lipides accumulés (Harm et al. 2021).

L'incapacité du lysosome à dégrader les HSOs responsables de sa surcharge et donc de son dysfonctionnement va rapidement résulter en la présence et l'agrégation de HSOs et de GAGs dans l'espace extracellulaire, les tissus et les fluides, (Mandolfo, Parker, et Bigger 2022) comme dans le LCR ou les urines dont leur quantité peut augmenter jusqu'à 15 ou 25 fois respectivement par rapport à des sujets contrôles (Dekaban et Constantopoulos 1977). Cette accumulation des HSOs à l'extérieur de la cellule sera également causée par les défauts d'internalisation et de sécrétion de la cellule suite à l'encombrement général du transport de matériel intracellulaire entre les différents organites (Pará et al. 2020).

Les HSOs solubles seront de natures différentes suite à l'action conjointe ou bien isolée de 1) l'HSPE et des endosulfatases à la surface cellulaire et dans la MEC et de 2) l'HSPE et d'endoglycosidases lysosomales actives au niveau intracellulaire (pages 34 et 35) avant un

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

relargage par la cellule morte – majoritairement les neurones – de fragment d’HSs partiellement dégradés et accumulés.

Même si la quantité d’HSOs augmente dans son ensemble, il a été montré que les HSOs pathogènes sont majoritairement des chaînes de tailles supérieures ou égales à 8 résidus (dp8 pour degree of polymerisation 8), des dp14 ou un mélange de chaînes de HSs non digérées (Bruyère et al. 2015).

De manière générale, la dégradation des sucres se fait de manière séquentielle à partir de la terminaison NRE (pour non-reducing end). Puisque partiellement dégradés, la quantité de HSOs mais aussi des GAGs présentant des NRE augmente et peut être quantifiée par spectrométrie de masse. Ces GAGs-NRE pourraient représenter un biomarqueur aidant au diagnostic car ils sont détectables très tôt dans la pathologie (Dwyer et al. 2017; Lawrence et al. 2014; Mandolfo et al. 2022).

Pour finir, il a été décrit dans la MPS I, IIIA et B une augmentation globale des polysaccharides d’HSs hautement sulfatés en positions N-, 3-O ou 6-O sur le GlcNAc ou 2-O sur le GlcAc (Tableau 3, page 29) (Mandolfo et al. 2022; Wilkinson et al. 2012). Surtout, il a été montré dans un modèle cellulaire de MPS IIIA que les HSs 2-O-sulfatés contrairement aux autres, induisent une réponse pro-inflammatoire via la voie TLR4 par la production d’interleukine-1 β (IL-1 β) (Parker et al. 2020).

Les HSOs ne seront pas les seuls substrats à s’accumuler dans la MPS III puisque les défauts de fonction du lysosome vont résulter en sa rétention de substrats secondaires comme c’est le cas des gangliosides GM2 et GM3 (Figure 13) (Parenti et al. 2021; Vitner et al. 2010). Les gangliosides sont des glycosphingolipides essentiels exprimés par toutes les cellules du SNC et qui au même titre que les GAGs sont impliqués dans le maintien de leur homéostasie. De par leurs caractéristiques physico-chimiques ils sont capables d’interagir avec le cholestérol et les autres sphingolipides de la MP et sont impliqués dans sa formation et son modelage en influant par exemple sur ses invaginations durant l’endocytose. Grâce à leur liaison à la membrane cellulaire les gangliosides sont en lien étroit avec les HSPGs et à l’instar de ces derniers jouent le rôle de corécepteur, comme c’est le cas avec la protéine MAG (pour myelin-associated glycoprotein), indispensable à l’élaboration de la gaine de myéline et au maintien de sa stabilité. Ainsi, les gangliosides occupent une place centrale dans la transmission nerveuse mais aussi dans le neurodéveloppement, faisant que leur dérégulation représente

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

un fort risque de développer une MND (Sipione et al. 2020). En effet, les maladies de Sandhoff et de Tay-Sachs sont deux autres MSLs causées par la déficience en β -hexosaminidase impliquée dans la dégradation des GM2 mais aussi d'oligosaccharides (Platt et al. 2018).

Dans le syndrome de Sanfilippo, l'accumulation secondaire de GM2 et GM3 dans le lysosome a largement été observée dans plusieurs modèles dont la microglie (Pan et al. 2017; Ryazantsev et al. 2007), les neurones corticaux du modèle de souris MPS IIIA (McGlynn, Dobrenis, et Walkley 2004), les tissus cérébraux des souris MPS IIIB et C (Ausseil et al. 2008; Pan et al. 2022; Roy et al. 2012), du chien MPS IIIB (Ellinwood et al. 2003; Story et al. 2020) ou encore de patients MPS IIIA, C et D (Viana et al. 2020).

Dans des vacuoles Lamp1+ et GM2/GM3+ observées au niveau des couches corticales de la souris MPSIIIB il a été rapporté une augmentation de l'expression de la sous-unité c de l'ATP synthase mitochondriale (ScMAS), à l'origine de certaines céroïdes-lipofuscinoses neuronales telle que la maladie de Batten, appartenant également aux MSLs (Ryazantsev et al. 2007). ScMAS fait partie du complexe F_0 qui est inséré dans la membrane interne de la mitochondrie, faisant partie prenante de l'ATP synthase, elle joue un rôle majeur dans la phosphorylation oxydative mitochondriale par la production d'ATP.

2.2.2 Altérations de la machinerie cellulaire

Dans des conditions de stress cellulaire, une étude récente supporte que ScMAS serait un peptide dit amyloïdogénique capable de changer de conformation et d'adopter un repliement causant son agrégation, de manière comparable au peptide $A\beta$ dans l'AD. Cette accumulation de ScMAS également rencontrée dans le cerveau des patients atteints de MPS I, II et IIIA et de différents modèles murins MPS fait écho à une dysfonction de l'activité mitochondriale résultant en l'excès de calcium intracellulaire et en l'augmentation de production des ROS (pour reactive oxygene species) (Figure 13) (Elleder, Sokolová, et Hřebíček 1997; Psheshetsky 2015). Dans ce sens, il a été montré chez la souris MPS IIIB dans des stades précoces de la maladie que l'augmentation du stress oxydant serait indépendante de l'inflammation liée au TLR4 (Trudel et al. 2015). Finalement, ScMAS serait impliquée dans un phénomène de stress tardif appelé « mitochondrial permeability transition » dont

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

l'augmentation de la perméabilité de la membrane mitochondriale a pour finalité la mort cellulaire par apoptose (Amodeo et al. 2021; Bonora et al. 2013). Dans les neurones de la souris MPS IIIC, le déséquilibre de la perméabilité mitochondriale pourrait se traduire par une augmentation de volume de la mitochondrie et à une désorganisation de la membrane interne puis *in fine* à un stress de l'ER (Leal et al. 2023; Pshezhetsky 2015).

La mitochondrie n'est pas le seul organite touché par la rupture de l'homéostasie cellulaire provoquée par la perturbation de la voie lysosomale. Comme expliqué précédemment le lysosome, la mitochondrie et l'autophagie font partie d'une même boucle d'activation dépendante des flux calciques, médiés par le canal calcique MCOLN1 dans la membrane lysosomale, associé au complexe LYNUS et à TFEB (page 20 et 21).

Dans un contexte physiopathologique, l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire et du stress oxydant liés à l'incapacité fonctionnelle de la mitochondrie mais aussi l'accumulation de substrats via le système CLEAR vont conduire à l'initiation du flux autophagique (Figure 13). Or, la dégradation du contenu n'étant pas effective à cause de la surcharge lysosomale, le nombre de vacuoles autophagiques LC3-B+ formées et chargées de contenu pathologique augmente dans les modèles murins de MPS IIIA, C et D (Figure 12) (Ballabio 2016; Leal et al. 2023; Pshezhetsky 2016; Viana et al. 2020). Ces altérations cellulaires menant à l'incapacité de la prise en charge par l'autophagie ou le protéasome et finalement par le lysosome de protéines mal repliées ou agrégées comme tau, A β hyperphosphorylées, ou poly ubiquitinyllées est une des caractéristiques de la MPS III décrite dans les neurones chez l'homme et la souris, et commune aux autres MND de l'adulte (Cao et al. 2019; Ginsberg et al. 1999; Ohmi et al. 2009; Pshezhetsky 2015). De plus, une étude a également montré que dans le cas de MSL, TFEB va induire l'exocytose lysosomale et donc la fusion directe des lysosomes avec la MP leur permettant de libérer leur contenu pathologique dans le milieu extracellulaire afin de palier à leur incapacité de dégradation (Medina et al. 2011).

Finalement, l'augmentation de l'expression de GM130 – protéine de matrice de l'appareil de Golgi – est synonyme de la désorganisation de l'appareil de Golgi et de la formation aberrante de vacuoles GM130+ dans les neurones corticaux primaires de la MPS IIIB (Vitry et al. 2010). La colocalisation de GM130 avec Lamp-1 dans ces vacuoles sur-représentées dans le Golgi, traduit une altération du trafic vésiculaire de matériel destiné à la biogenèse et

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

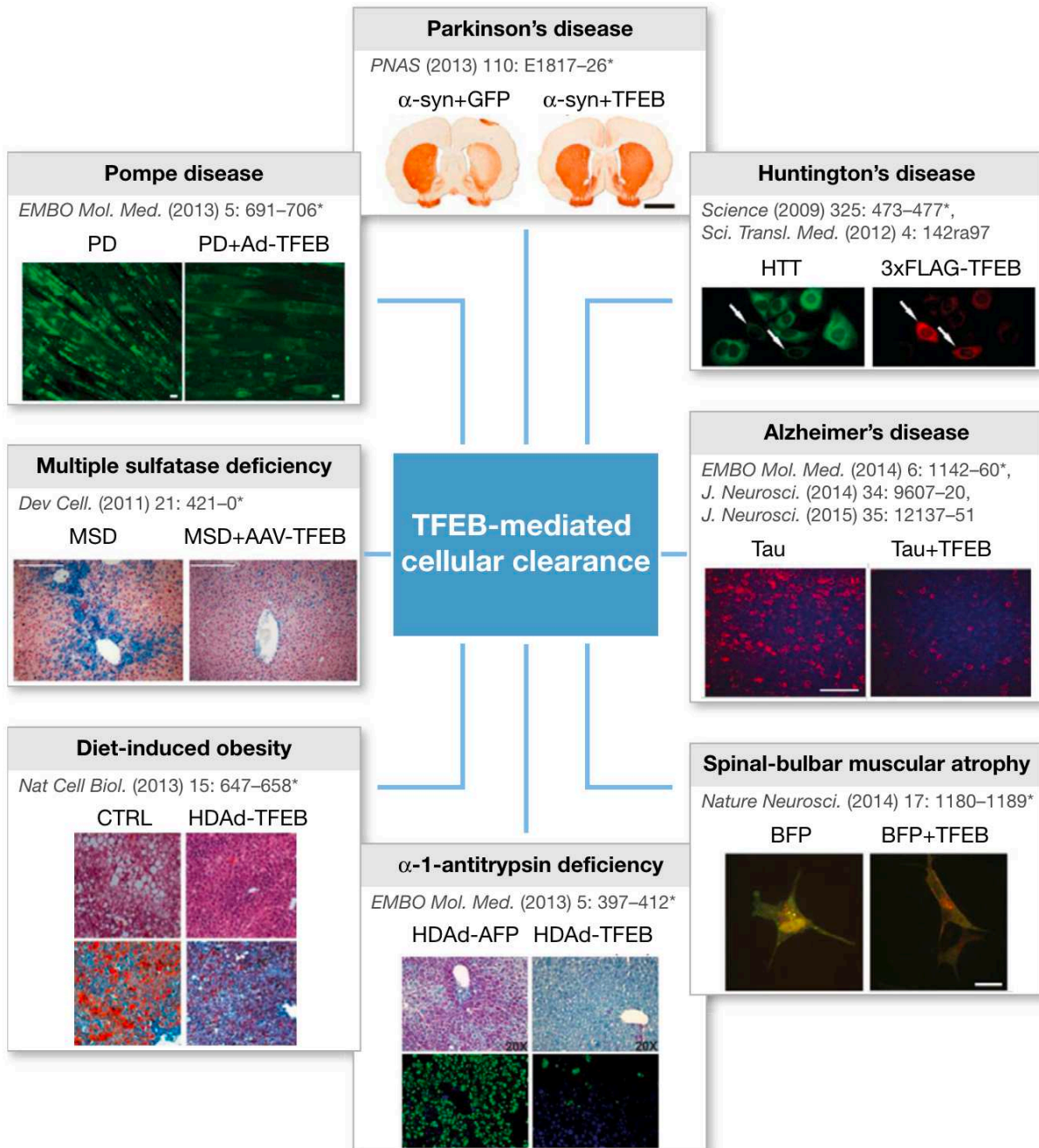


Figure 13 : TFEB est lié à la clairance de substrats accumulés dans des modèles de pathologies
 D'après Ballabio, 2016.

aux fonctions du lysosome ou à l'apport en hydrolases formées *de novo* et fonctionnelles, directement lié au défaut de dégradation d'autres substrats endolysosomaux (Roy et al. 2012). De plus, il paraît évident que la surcharge cellulaire en vacuoles lysosomales, autophagiques, et golgiennes va impacter physiquement les processus d'endocytose et donc de recyclage de contenu extracellulaire ou encore d'exocytose par défaut de transport des MVB ou de fusion avec la MP (Figure 12) (Parenti et al. 2021).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Ce phénomène de vacuolisation est un des marqueurs anatomiques de la pathologie associé au gonflement du corps cellulaire de l'ensemble des cellules du SNC, qui est observé sur les coupes de cerveaux de patients, de souris et de chiens MPS III (Ausseil et al. 2008; Bigger et al. 2018; Hamano et al. 2008; Harm et al. 2021).

Cette cascade d'altérations secondaires et majeures va progressivement mener au dépassement de la machinerie cellulaire dans son ensemble, dont la seule issue est souvent la mort de la cellule pour le neurone mais qui peut aussi être liée au phénomène de gliose qui reflète l'activation des cellules gliales, les astrocytes et la microglie.

2.2.3 La gliose et la neuroinflammation

2.2.3.1 La gliose

Sur des coupes histologiques, l'activation de la microglie résidente est rapportée par augmentation de l'expression de marqueurs spécifiques tels que CD11b ou Iba1 (pour ionized calcium-binding adapter molecule 1) dans le modèle de souris MPS IIIA (Wilkinson et al. 2012) et dans le cortex et le cervelet du chien MPS IIIB (Egeland et al. 2020) ou par l'isolectine B4 dans la souris MPS IIIA (Parker et al. 2020). Ces marqueurs membranaires permettent également de décrire la morphologie de la microglie qui est très révélatrice de son activation, qui en adoptant une forme rétractée avec une diminution de ces dendrites montre sa réactivité et sa direction vers un phénotype pro-inflammatoire. Finalement, l'augmentation de l'expression d'IB4 a également été relevée dans ces modèles et traduit aussi la transmission de l'inflammation par la microglie, de la même manière que le marqueur CD68 exprimé dans le cortex des souris MPS IIIC âgées de 4 mois (Martins et al. 2015; Pan et al. 2022).

La réactivité des astrocytes est montrée par l'augmentation de l'expression de la GFAP (pour glial fibrillary acidic protein) par immunofluorescence dans des cerveaux de souris MPS IIIA, B et C dès l'âge de 3 mois, qui soulignera également la prolifération des astrocytes (Ausseil et al. 2008; Bigger et al. 2018; Dwyer et al. 2017; Martins et al. 2015; Wilkinson et al. 2012).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Dans cet état réactif, les astrocytes, de la même manière que la microglie, sont capables de présenter des antigènes (Ag) et de procéder au recrutement local et périphérique de cellules immunitaires. De par leur interaction étroite avec la BHE – puisqu'ils sont physiquement responsables de son architecture avec les péricytes – les astrocytes peuvent directement sécréter dans le système sanguin des chimiokines attractives telles que la CCL2 (pour chemokine C-C motif ligand 2) ou la CXCL10 (pour chemokine C-X-C motif ligand 10) permettant la migration de monocytes, macrophages ou lymphocytes T circulants et leur entrée dans le SNC par diapédèse (Linnerbauer, Wheeler, et Quintana 2020).

Ce phénomène appelé astrocytose se met en place lorsque la microglie ne parvenant pas à éliminer la menace présente, est incapable de retrouver un phénotype homéostatique, entre en état de microgliose et sécrète une quantité massive de molécules pro-inflammatoires et oxydantes dans le milieu extracellulaire (Figure 15) (Mandolfo et al. 2022).

Effectivement, la présence de microgliose et d'astrocytose (également appelée gliose lorsque considérée comme un ensemble) est largement décrite dans le cerveau de patients de MPS III et les modèles murins de MPS IIIA, B et C dès l'âge de 4 mois (Hassiotis et al. 2014; Pará et al. 2020; Parker et al. 2020; Viana et al. 2020; Wilkinson et al. 2012). Le gliose est directement liée au gonflement et à la vacuolisation des cellules gliales, visibles sur tranches de tissus par immunohistochimie ainsi que par l'augmentation des marqueurs d'activation déjà décrits précédemment pour la microglie (Bigger et al. 2018; Harm et al. 2021). Outre l'altération de la machinerie cellulaire et des phénomènes dévastateurs qu'elle engendre, cette gliose entre aussi en jeu suite à l'activation de la glie par l'induction de la voie TLR4 par les HSOs extracellulaires (Ausseil et al. 2008).

2.2.3.2 Le récepteur TLR4

Le récepteur TLR4 fait partie de la grande famille des TLRs, médiatrice de l'immunité innée et fortement exprimée par les cellules de la lignée myéloïde, représentée par la microglie au sein du SNC. Les TLRs sont spécialisés dans la reconnaissance d'un grand nombre de ligands, de natures moléculaires différentes et provenant de pathogènes externes appelés PAMPs (pour pathogen associated molecular pattern) ou issus du soi appelés DAMPs (pour damage associated molecular pattern) tels que les HSOs partiellement dégradés et sulfatés.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

La réponse inflammatoire médiée par les TLRs est dépendante de la présence au niveau intracellulaire de protéines adaptatrices et du lieu d'expression constitutive du récepteur qui peut être à la surface cellulaire ou au sein de l'endosome.

Le TLR4 transmembranaire associé avec MyD88 (pour myeloid differentiation primary response 88) initie des cascades de signalisation dépendantes des MAPKK (pour mitogen-activated protein kinase kinase) ou du complexe de régulation de NF- κ B (pour nuclear facteur kappa-B) composé des protéines kinases IKK (pour I kappa-B kinase) impliquées dans la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF α (pour tumor necrosis factor α) (Li et al. 2021). Il est à noter que dans un contexte de MPS et de MND telle que la PD, le stress du ER est également à l'origine de l'expression anormale d'une enzyme impliquée dans l'ubiquitination des protéines, l'UBE2L3 qui en inhibant la séquestration par

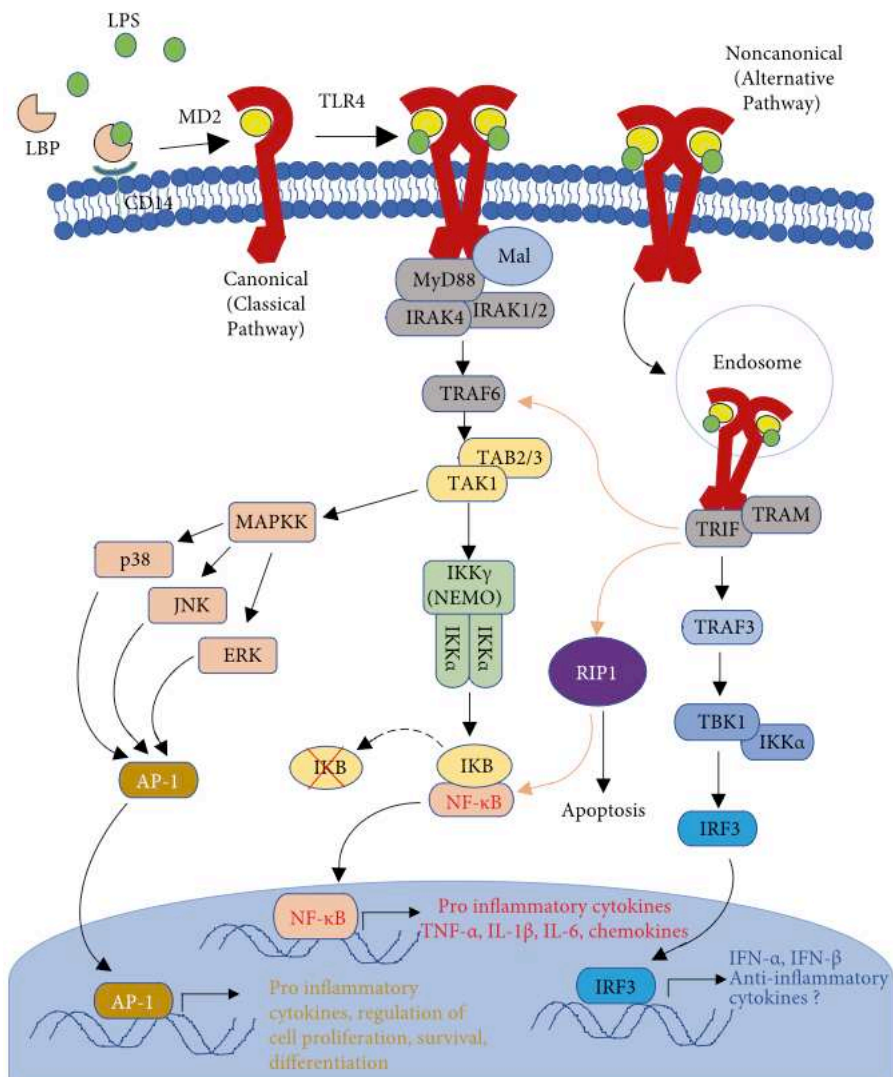


Figure 14 : Voie de signalisation TLR4

D'après Aboudounya et Heads 2021.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

IKB de NF- κ B favorise sa translocation dans le noyau et l'activation de cette voie (Leal et al. 2023; Zhang et al. 2022).

Il existe une voie alternative du signal TLR4 suite à l'endocytose du couple ligand-récepteur, médiée par les adaptateurs RIP1 (pour receptor interacting protein 1) menant à l'activation de l'apoptose dépendante des caspases ou TBK1 (pour TANK binding kinase 1) lié à une IKK menant à une réponse interféron de type 1 (Figure 14) (Aboudounya et Heads 2021).

Dans le cas de la MPS III, il a été montré dans un modèle de microglie primaire que l'activation de la voie TLR4 est dépendante des HSOs extraits à partir d'urine de patients MPS IIIB par comparaison avec l'absence d'effet des GAGs issus de sujets non affectés, de l'héparine, ou encore de l'HS bovin.

La signalisation TLR4 dans plusieurs modèles de MPS III conduit à la production par la microglie de TNF α , IL-1 β et MIP1 α (pour macrophage inflammatory protein 1 α) démontrant que la voie est dépendante du facteur de transcription NF- κ B (Ohmi et al. 2003; Pan et al. 2022; Puy et al. 2018; Wilkinson et al. 2012). De plus, l'utilisation d'un modèle murin double KO (pour knock-out) *Naglu* (l'enzyme déficiente dans la MPS IIIB) et *MyD88* en comparaison à un modèle KO *Naglu* démontre l'absence d'inflammation dès l'âge de 10 jours, par l'absence du marqueur de surface microglial CD11b et valide ainsi que l'adaptateur dont dépend le récepteur TLR4 dans la MPS IIIB est MyD88 (Ausseil et al. 2008). Finalement, la neuroinflammation médiée par la microglie est dépendante de TLR4 puisque le traitement avec du poly(I:C), le ligand spécifique du TLR3 ne conduit pas à la production de cytokines pro-inflammatoires mais aussi que la microglie provenant d'un double KO *Naglu* et *Tlr4*, ne montre pas d'activation (Ausseil et al. 2008).

Tout comme la microglie, les astrocytes expriment des récepteurs aux cytokines et le TLR4. L'activation de la voie NF- κ B leur permet de participer et d'amplifier la neuroinflammation déjà présente par leur production des cytokines pro-inflammatoires déjà décrites (Ausseil et al. 2008) mais aussi de GM-CSF (pour granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor) capable d'activer en retour la microglie (Linnerbauer et al. 2020). Les neurones présentent aussi à leur membrane de manière constitutive des récepteurs TLR4 et aux cytokines même si leurs taux d'expression sont très faibles, ils sont aussi capables de sécréter des cytokines pro-inflammatoires. Mais surtout, de par leur très grande proportion

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

de mitochondries – essentielles à une neurotransmission efficace –, les neurones en conditions pathologiques sont de grands producteurs de ROS qu'ils relargueront dans le milieu extracellulaire (Leow-Dyke et al. 2012; Mandolfo et al. 2022; Puy et al. 2018).

C'est pourquoi, de plus en plus d'études s'intéressent aux effets secondaires liés à l'accumulation de substrat, dont la neuroinflammation. Le TLR4 est une cible qui a été étudiée dans d'autres MPSs par l'utilisation d'antagonistes du TNF α et ont prouvé la diminution de l'inflammation chez des rats MPS VI (Simonaro et al. 2010).

L'utilisation de molécules anti-inflammatoires déjà sur le marché comme l'aspirine mais nécessitant une trop forte dose pour obtenir un effet désirable a été abandonnée (Arfi et al. 2011), pourtant d'autres types de molécules sont étudiées pour être couplées à une technique qui permettrait une restauration de l'activité enzymatique (Seker Yilmaz et al. 2021).

Cette induction de la réponse TLR4 et de sécrétion de cytokines par la microglie et les astrocytes n'est qu'une première phase dite d'initiation et dans une phase d'activation de nombreux acteurs tel que l'inflammasome NLRP3 (pour NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3) vont supplémenter cette inflammation primaire, accompagnée de toutes les altérations d'organites cellulaires et de la gliose décrites précédemment des suites de l'accumulation des substrats intracellulaires (Figure 15) (Mandolfo et al. 2022).

2.2.3.3 Le complexe inflammasome NLRP3

La voie TLR4–MyD88–NF- κ B–NLRP3 est centrale et intégrée dans un cycle inflammatoire, qui s'il n'est pas rétrocontrôlé est capable de s'auto-alimenter et de mener à une neuroinflammation chronique dévastatrice et spécifique de la physiopathologie de la MPS III. Cette neuroinflammation est soulignée par la présence de taux élevés dans le plasma, le sérum et le LCR d'IL-1 β et du récepteur IL-1Ra, antagoniste du récepteur IL-1R à l'IL-1 β chez des patients et des souris atteints de MPS IIIA (Parker et al. 2020).

NF- κ B induit également la transcription de NLRP3, qui va engendrer, conjointement au recrutement de la pro-caspase-1, l'augmentation de l'activité mitochondriale dépendante de la teneur en Ca²⁺ intracellulaire (Swanson, Deng, et Ting 2019). Le récepteur purinergique P2X7R contribuera à la modulation de la charge ionique cellulaire grâce à sa fonction de canal transmembranaire. Son activation par l'ATP va d'une part potentialiser l'influx de Ca²⁺, qui

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

outre son effet sur la mitochondrie et l'induction de la production de ROS, va aussi permettre leur sécrétion dans le milieu extracellulaire et impacter directement les neurones environnants. D'autre part le P2X7R favorise l'efflux de K^+ et donc la diminution de la concentration en K^+ intracellulaire ressentie par le NLRP3 inactif permet la formation du complexe inflammasome NLRP3–pro-caspase-1–ASC (pour apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD ; aussi connu sous le nom de PYCARD). ASC est mobilisé par l'efflux de Cl^- et une fois le complexe fonctionnel, il induit le clivage de la pro-caspase-1 en caspase-1 (Chen, Lin, et Tao 2021; Hemonnot et al. 2019; Swanson et al. 2019) dont l'augmentation de l'activité a été montrée chez la souris MPS IIIA et directement liée à l'augmentation de la cytokine IL-1 β (Parker et al. 2020). Effectivement, l'induction de la voie NF- κ B par le TLR4 ne permet que la production de la forme précurseur de l'IL-1 β , qui ensuite adopte sa forme mature grâce au clivage par la caspase 1 (Mandolfo et al. 2022).

De manière intéressante, à l'instar du signal TLR4, les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β et le TNF α par le biais de leur récepteur IL-1R1 et TNFR, sont capables d'induire la translocation de NF- κ B dans le noyau (Swanson et al. 2019).

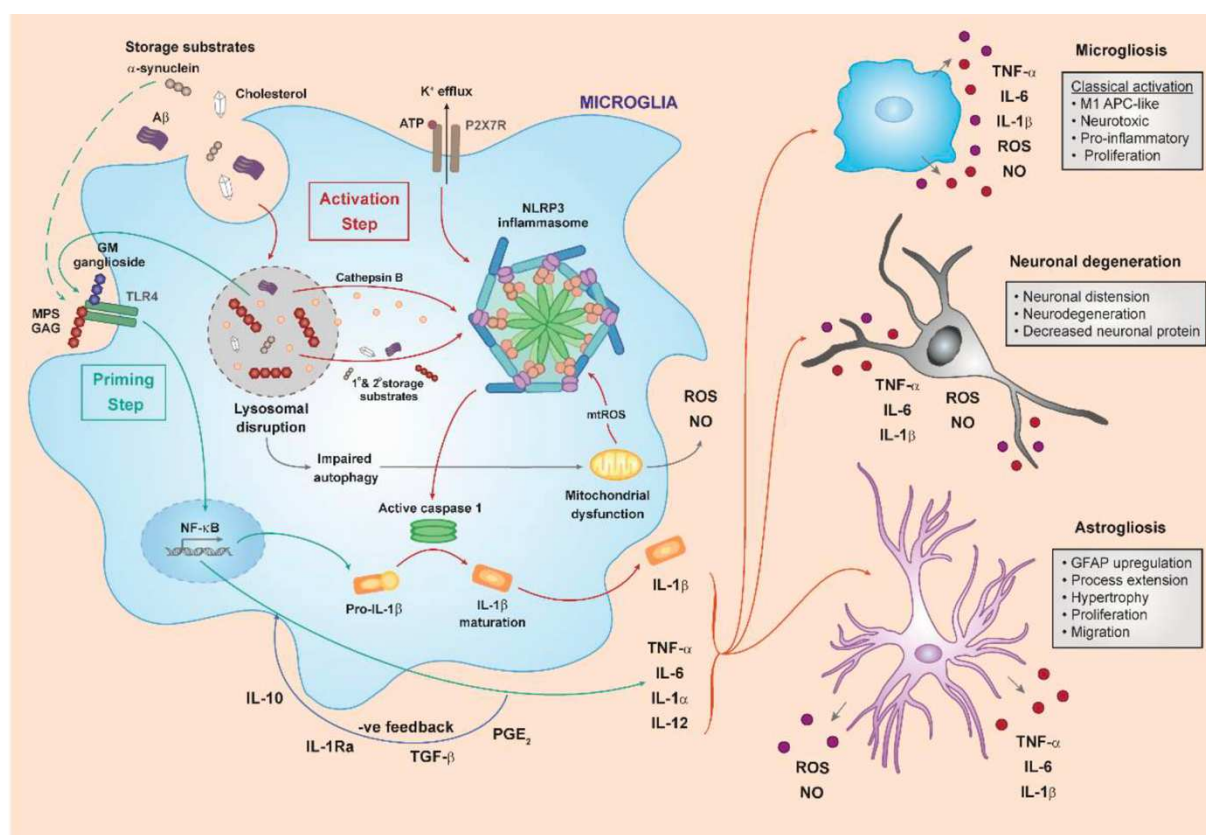


Figure 15 : Neuroinflammation médiée par la microglie dans les mucopolysaccharidoses
D'après Mandolfo et al. 2022.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

L'excès de production et de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, de molécules dérivées de l'oxygène par les cellules du SNC et de l'infiltrat immunitaire vont engendrer l'emballement du système immunitaire. Cette inflammation chronique et la gliose vont conduire à la rupture permanente de la BHE. L'astrocyte réactif n'assurant plus ses fonctions homéostatiques va se désolidariser des cellules endothéliales, permettant l'entrée irrésistible de cellules périphériques participant à travers une multitude de mécanismes à la neurodégénérescence (Bigger et al. 2018; Leng et Edison 2021; Ohmi et al. 2003; Sofroniew 2015; Wilkinson et al. 2012).

2.2.4 *Altérations neuronales et la neurodégénérescence*

Rappelons que l'altération des lysosomes et le défaut de clairance des HSOs et des substrats secondaires touche l'ensemble des cellules, causant des dysfonctionnements internes et se reflétant chez la cellule par la perte de ses fonctions physiologiques (Settembre et al. 2013).

Le neurone demeure la cellule la plus impactée, avec très peu de mécanismes de défenses efficaces, et dont la survie dépend du soutien apporté par les cellules gliales, sans quoi la mort du neurone aura des conséquences dramatiques puisque c'est une cellule post-mitotique (Figure 16). L'encombrement et la vacuolisation du soma du neurone, l'accroissement de l'autophagie et du nombre de mitochondries pathologiques débordées par la production de ROS vont directement toucher la transmission d'informations par le neurone (Hamano et al. 2008; Seager et al. 2020; Son et al. 2012).

Ainsi, il a été rapporté dans les différents types de MPS III et dans les MNDs de l'adulte, des défauts de réception du message nerveux par les dendrites suite à un gonflement somato-dendritique (Hamano et al. 2008; Pará et al. 2020). De même, l'augmentation du volume de l'axone et l'apparition de structures sphéroïdes, impacte sa fonction de transport le long des MT l'empêchant d'assurer l'envoi du message nerveux, et sera annonciateur d'une future dégénérescence (Beard et al. 2017; Mandolfo et al. 2022).

Effectivement, le transport rétrograde (depuis la terminaison axonale vers le soma) est réservé au recyclage d'organites et de molécules présents au niveau synaptique et son défaut va conduire à une accumulation de déchets au niveau terminal de l'axone. Le transport

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

antérograde (depuis le soma vers la terminaison axonale) prend en charge le transfert des mitochondries, essentielles à l'apport d'ATP, dont le neurone est dépendant pour le processus de transmission nerveuse extrêmement coûteux en énergie. Par exemple, au niveau d'une synapse chimique, l'axone dépourvu d'ATP ne pourra pas activer la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane pré-synaptique de l'axone, et donc libérer les neurotransmetteurs (NTs) dans la fente synaptique (FS) (Winner et al. 2023).

La FS représente l'espace entre l'axone (pré-synaptique) et la dendrite (post-synaptique) où l'accumulation de HSOs va accentuer ces défauts d'influx nerveux notamment par l'encombrement des récepteurs post-synaptiques sensibles aux NTs (Dwyer et al. 2017; Pará et al. 2021, 2020; Soles et al. 2023). Mais également, la surcharge lysosomale dans la terminaison axonale va altérer le transport, le recyclage et l'exocytose du contenu des vésicules synaptiques conduisant à la réduction de leur nombre et finalement à des défauts de neurotransmission (Pará et al. 2020; Winner et al. 2023).

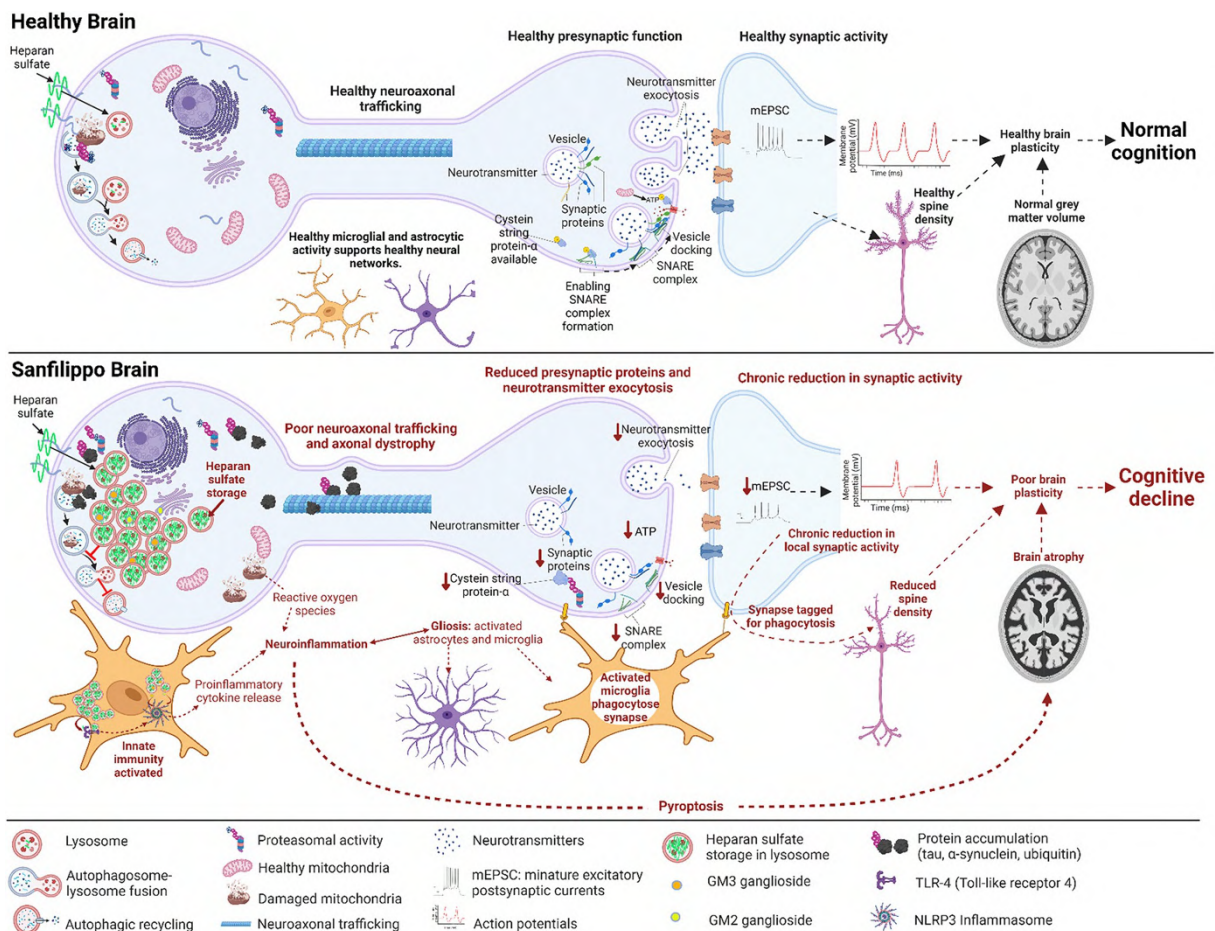


Figure 16 : Physiopathologie de la MPS III

D'après Winner et al. 2023

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Par l'ensemble des mécanismes exposés précédemment, la microglie MPS III de par son incapacité à digérer des métabolites phagocytés, l'activation de son TLR4 et donc sa suractivation, va proliférer et être accompagnée de macrophages nouvellement recrutés. Conduisant à une augmentation de la phagocytose incontrôlée et dirigée contre les neurones, et plus particulièrement des dendrites dont la perte a été reportée par une diminution de la densité synaptique (Pará et al. 2021; Winner et al. 2023). Évidemment, la microglie peut aussi induire directement l'apoptose du neurone ou la pyroptose via l'inflammasome NLRP3 et la cathepsine B (Hamano et al. 2008; Mandolfo et al. 2022; Swanson et al. 2019).

Les astrocytes sont étroitement liés aux neurones pour lesquels ils assurent de nombreuses tâches dans le maintien de leurs fonctions et de leur homéostasie. Ils vont participer à la formation de la synapse, à la régulation et la synthèse des NTs présents dans la FS mais aussi à la modulation de l'environnement nutritif et aqueux, et la gestion des déchets (Patani, Hardingham, et Liddelow 2023).

Dans le contexte neuroinflammatoire des MPS III, en plus de la sécrétion de cytokines et de la transmission de stress oxydant via l'oxyde nitrique (NO), les astrocytes ne seront plus capables d'assurer leurs fonctions physiologiques et vont directement impacter la transmission synaptique. D'une part, par le relargage dans le milieu extracellulaire de HSOs accumulés dans son cytoplasme, et du NT glutamate suite à l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire, participant à leur accumulation au niveau de la FS (Giusti et al. 2024; Linnerbauer et al. 2020). D'autre part, la réduction du nombre de transporteurs au glutamate EAATs (pour excitatory amino acid transporter) exprimés à sa MP va causer le défaut de recyclage du glutamate (Todd et Hardingham 2020).

Le glutamate – au travers de la stimulation de deux types de récepteurs glutamatergiques – est à l'origine de la neurotransmission excitatrice, sa sécrétion par le neurone pré-synaptique et sa recapture par les EAATs sont finement régulés pour l'accomplissement de la majorité des fonctions cognitives. Les récepteurs mGluR (pour metabotropic glutamate receptor) sont couplés à une protéine G et leur signalisation par le biais de l'ER va augmenter le Ca^{2+} intracellulaire. L'activation des canaux-récepteurs AMPA (pour α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid), NMDA (pour N-methyl-D-aspartate receptor), ou KA (pour kainate) est capable d'induire une dépolarisation de la membrane du neurone post-synaptique suite à l'influx de Ca^{2+} au travers de leur canal.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

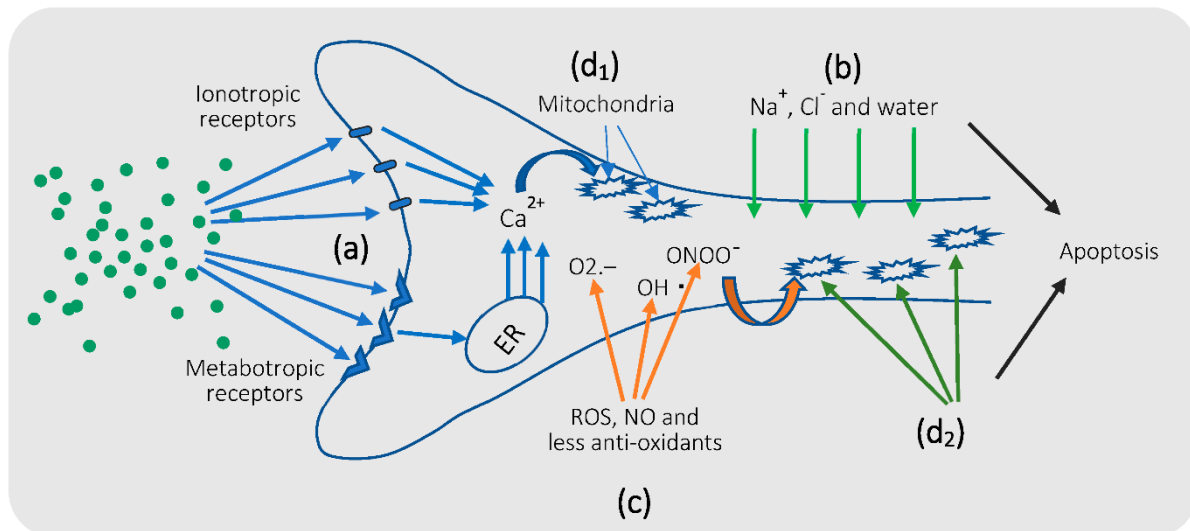


Figure 17 : Toxicité liée au glutamate

D'après Mahmoud et al. 2019

Physiologiquement, la dépolarisation de la membrane permet le déclenchement d'un potentiel d'action (PA) qui par la génération d'un courant électrique est à l'origine de la transmission de l'information. Ce mécanisme de potentialisation est essentiel et est utilisé par exemple dans le processus de plasticité synaptique à l'origine de la mémorisation.

Or, lorsque les astrocytes deviennent réactifs et que le glutamate est présent en excès au niveau de la FS il devient toxique et peut conduire à l'apoptose du neurone par l'augmentation en nombre des mitochondries et de leur production de stress oxydant (Figure 17) (Linnerbauer et al. 2020; Mahmoud et al. 2019; Satarker et al. 2022).

Également, les astrocytes par la sécrétion de toutes ces molécules toxiques provoqueront l'apoptose des oligodendrocytes qui sont les cellules responsables de la production de la gaine de myéline qui entoure l'axone et qui est indispensable dans la vitesse de conduction de la charge nerveuse. Cette perte de la gaine de myéline, a déjà été décrite dans le cerveau des patients MPS III, et pourrait être liée à l'altération de la transmission nerveuse glutamatergique reflétée par la diminution des courants mEPSCs (pour miniature excitatory post-synaptic current) dans le neurone post-synaptique (Bigger et al. 2018; Li et al. 2002; Linnerbauer et al. 2020; Pan et al. 2022; Pará et al. 2021).

Dans leur ensemble, ces défauts neuronaux et gliaux dans le cerveau atteint de MPS III sont responsables de la perte de plasticité synaptique qui peut être visible par 1) une

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

diminution de la densité d'épines synaptiques matures (Pará et al. 2021), 2) la perte d'expression de protéines essentielles comme la synaptophysine (Vitry et al. 2009) ou GAP43 (Hocquemiller et al. 2010), 3) une neurodégénérescence accompagnée de l'atrophie cérébrale, l'augmentation du volume des ventricules cérébraux et la perte de substance grise (Figure 16) (Bigger et al. 2018).

Or, de plus en plus d'études démontrent le rôle des EVs dans la potentialisation des mécanismes neuroinflammatoires et neurodégénératifs. Leur dissémination offre la perspective d'une communication à plus grande échelle, non plus uniquement micro-environnementale mais d'une structure cérébrale à l'autre et même systémique.

2.2.5 Les modèles d'étude

Le développement et le choix de modèles animaux ou cellulaires adaptés sont indispensables à la progression de la recherche biomédicale pour la guérison de la MPS III ainsi qu'à la description des mécanismes physiopathologiques et des marqueurs cellulaires qui y sont associés.

Dans ce but, pour chaque type de MPS III, au moins un modèle murin a été modifié génétiquement et présente les caractéristiques de la maladie documentée chez l'homme – telles que l'hyperactivité, des troubles de la mémoire et moteurs, ainsi que de l'anxiété – faisant suite à une baisse partielle ou totale de l'activité enzymatique dans les tissus. En fonction de la construction génétique, l'âge de l'apparition de la neuropathologie varie entre 2 et 10 mois avec des formes plus ou moins sévères de la maladie, mais surtout avec des signes de neurodégénérescence plus tardifs que chez l'homme, se manifestant souvent dans les derniers mois de vie. Mais de manière générale, les souris présentent une accumulation généralisée de GAGs entre 1 et 3 mois associée à une neuroinflammation souvent décrite dès le premier mois de vie et qui devient chronique en milieu de vie.

Très récemment, une équipe de recherche a développé pour l'étude des MPS IIIA, B et C des modèles de poisson-zèbre qui, malgré leur éloignement avec le génome humain avec environ 80% de gènes communs, présentent des avantages nombreux. Ils se reproduisent facilement et rapidement, disposent d'environ 26000 gènes codants faisant d'eux un modèle de choix

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 8 : Modèles développés pour l'étude des MPS III

Adapté d'après Favret et al 2020, Heon-Roberts et al 2020, Story et al 2020. + : présente, < : forme modérée, > : forme sévère.

Clinical type	Gene	Model	Generalized GAG accumulation (months)	Onset (months)	Age of death (months)	Neuropathology	
III A	SGSH	Mouse	<i>Sgsh</i> ^(-/-) (Bhaumik et al., 1999)	?	7	7-10	+
			<i>Sgsh</i> ^(D31N) (Bhattacharyya et al., 2001)	0.5	4	?	+
			<i>Cg-Sgsh</i> ^(-/-) (Crawley et al., 2006)	3	5	9-12	+
			<i>Sgsh</i> ^(CKO) (Lau et al., 2017)	0.5	4	?	>
		Dog	Dachshund (Fischer et al., 1998)	?	36	> 60	+
			Huntaway (Jolly et al., 2007)	?	18	60	>
III B	NAGLU	Mouse	<i>Naglu</i> ^(-/-) (Li et al., 1999)	2	4.5	8-12	+
		Dog	Schipperke (Ellinwood et al. 2003)	?	12	< 60	+
			Schipperke x unaffected Beagle (Harm et al., 2021)	2	10	60	>
III C	HGSNAT	Mouse	<i>Hgsnat</i> ^(-/-) (Martins et al., 2015)	2	6-8	15	+
			<i>Hgsnat</i> ^(-/-) (Marcó et al., 2016)	2	2	18-25	<
			<i>Hgsnat</i> ^(P304L) (Pan et al., 2022)	2	2-4	9	>
III D	GNS	Mouse	<i>Gns</i> ^(-/-) (Roca et al., 2017)	2	6	< 20	+
		Goat	Nubian goat (Jones et al., 1998)	?	1.5-44	19-44	+
III E	ARGS	Mouse	<i>Args</i> ^(-/-) (Kowalewski et al., 2012)	?	10	?	<

dans la manipulation génétique, mais surtout ils sont transparents et sont très utilisés dans le suivi de molécules fluorescentes *in vivo* (Gerken et al. 2023).

Des modèles plus grands comme le chien dans la MPS IIIA et B ou la chèvre dans la MPS IIID ont été découverts de par leur mutation naturelle de l'enzyme lysosomale et sont utilisés exclusivement à des fins d'études précliniques. Contrairement au modèle murin, ne sont permis lors de l'hébergement de l'animal que des prélèvements de fluides biologiques et l'observation de leur comportement, puis post-mortem une description des caractéristiques

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

anatomopathologiques et de l'accumulation d'HS. Inversement à l'humain, les premiers symptômes développés et remarqués très tôt (entre 1 et 3 ans) chez ces animaux sont moteurs, dont l'ataxie qui entraîne des difficultés à marcher et à sauter et qui sont des facultés obligatoires à la survie de ces animaux. La neurodégénérescence est caractérisée par une perte massive des cellules de Purkinje dans le cervelet et la présence de neuroinflammation a été également décrite (Tableau 8) (Favret et al. 2020; Heon-Roberts, Nguyen, et Pshezhetsky 2020; Story et al. 2020).

Au-delà de la description phénotypique et fonctionnelle *in vivo*, la compréhension des cascades de signalisations cellulaires et des mécanismes moléculaires sous-jacents sont essentiels et nécessitent l'utilisation de modèles cellulaires.

L'accumulation de GAGs dans les fluides biologiques représente un avantage considérable dans leur utilisation en recherche puisqu'il est possible de les extraire biochimiquement à partir d'urines de patient et de stimuler *in vitro* des lignées cellulaires.

Mais surtout, l'avènement des cellules iPSC (pour induced pluripotent stem cells) a permis de développer à partir de fibroblastes humains un large panel de nouveaux modèles cellulaires avec un fond génétique identique à celui du patient, permettant de reproduire les accumulations intra- et extracellulaires de HSOs dues à l'absence de l'enzyme lysosomale. En neurosciences, les iPSC sont un véritable atout car elles offrent la possibilité de cultiver différents types cellulaires, telle que la microglie ou les neurones qui, provenant d'un tissu très organisé, sont très difficiles à isoler à partir de cerveaux de souris adultes (Benetó et al. 2020).

3 LES VESICULES EXTRACELLULAIRES

3.1 ORIGINE ET CLASSIFICATION DES VESICULES EXTRACELLULAIRES

3.1.1 Historique sur les vésicules extracellulaires

Au milieu des années 60, Wolf ne le sait pas encore mais il observe pour la première fois au microscope électronique des EVs après une ultracentrifugation de plasma. En montrant que ces particules riches en phospholipides ont des propriétés coagulantes, il avance qu'elles pourraient être dérivées des plaquettes, et les qualifie ainsi de « poussière de plaquettes » (Wolf 1967).

La recherche sur les EVs va prendre un autre tournant dès lors que Nunez en 1974 amène la première preuve dans des cellules folliculaires de la thyroïde de chauve-souris, de la fusion avec la membrane apicale du MVB contenant des vésicules mesurant entre 1 et 10 nm (Nunez, Wallis, et Gershon 1974).

Une décennie plus tard, Johnstone, Stahl et Harding font plusieurs observations de la libération dans le milieu extracellulaire par les MVB de ce qu'ils appelleront pour la première fois les « exosomes ». En s'intéressant au recyclage du récepteur à la transferrine (TfR) lors de la maturation de réticulocytes de rat, ils ont montré par microscopie électronique que les TfR

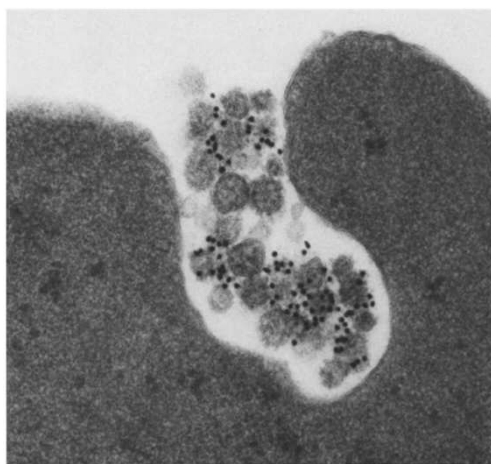


Figure 18 : Fusion d'un MVB avec la membrane plasmique et libération d'exosomes

D'après Pan et al. 1985.

Image prise par microscopie électronique d'ILVs d'environ 50 nm contenant des TfR marqués par particules d'or colloïde (points noirs).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

d'abord marqués par des particules d'or colloïdal sont internalisés par endocytose, transitent par la voie endosomale avant d'être relargués par la cellule dans des ILVs par exocytose du MVB (Figure 18) (Harding, Heuser, et Stahl 1983; Johnstone 2005; Johnstone et al. 1987).

Ainsi, les exosomes sont d'abord vus comme des transporteurs de déchets cellulaires et il faudra attendre 10 années supplémentaires avant que l'intérêt biologique et fonctionnel des exosomes soit révélé par Graça Raposo. Ses travaux ayant montré que les exosomes sécrétés par des lymphocytes B et des cellules dendritiques ont des propriétés antitumorales de par leur capacité de transport et de présentation d'antigène (Couch et al. 2021; Stahl et Raposo 2019).

Ces études ont ouvert le champ des possibles et offrent la perspective d'utilisation des exosomes dans la recherche biomédicale, comme biomarqueurs mais aussi comme particules actives dans un contexte thérapeutique.

L'intérêt grandissant pour ce domaine de recherche apporte des connaissances sur les mécanismes de biogenèse et de sécrétion des EVs en dévoilant l'existence de nouvelles catégories et ne les limitant donc plus qu'aux exosomes. C'est alors qu'un effort dans la classification et l'obtention d'une nomenclature adaptée à ces objets extracellulaires extrêmement variés est engagé par la communauté scientifique.

Émane en 2014 un guide de recommandations pour l'étude des EVs, le « minimal information for studies of extracellular vesicles » (MISEV). L'évolution constante et rapide de ce domaine de recherche, rythmée par les découvertes de nouveaux types de vésicules avec des fonctions et des caractéristiques discutables, nécessite un consensus constant et la mise à jour du MISEV en 2018 puis de nouveau en 2023 (Lötvall et al. 2014; Théry et al. 2018; Welsh et al. 2024).

3.1.2 Classification des vésicules extracellulaires

De manière générale, les EVs sont tout d'abord classées en fonction de leurs voies de biogénèse qui sont à l'origine de deux grands mécanismes de sécrétion, l'exocytose et le bourgeonnement d'EVs (Figure 19).

Comme évoqué dans la première partie d'introduction (page 14-17 et Figure 1), les exosomes (**a**) – appelés ILVs avant leur exocytose – proviennent de la voie endolysosomale et

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

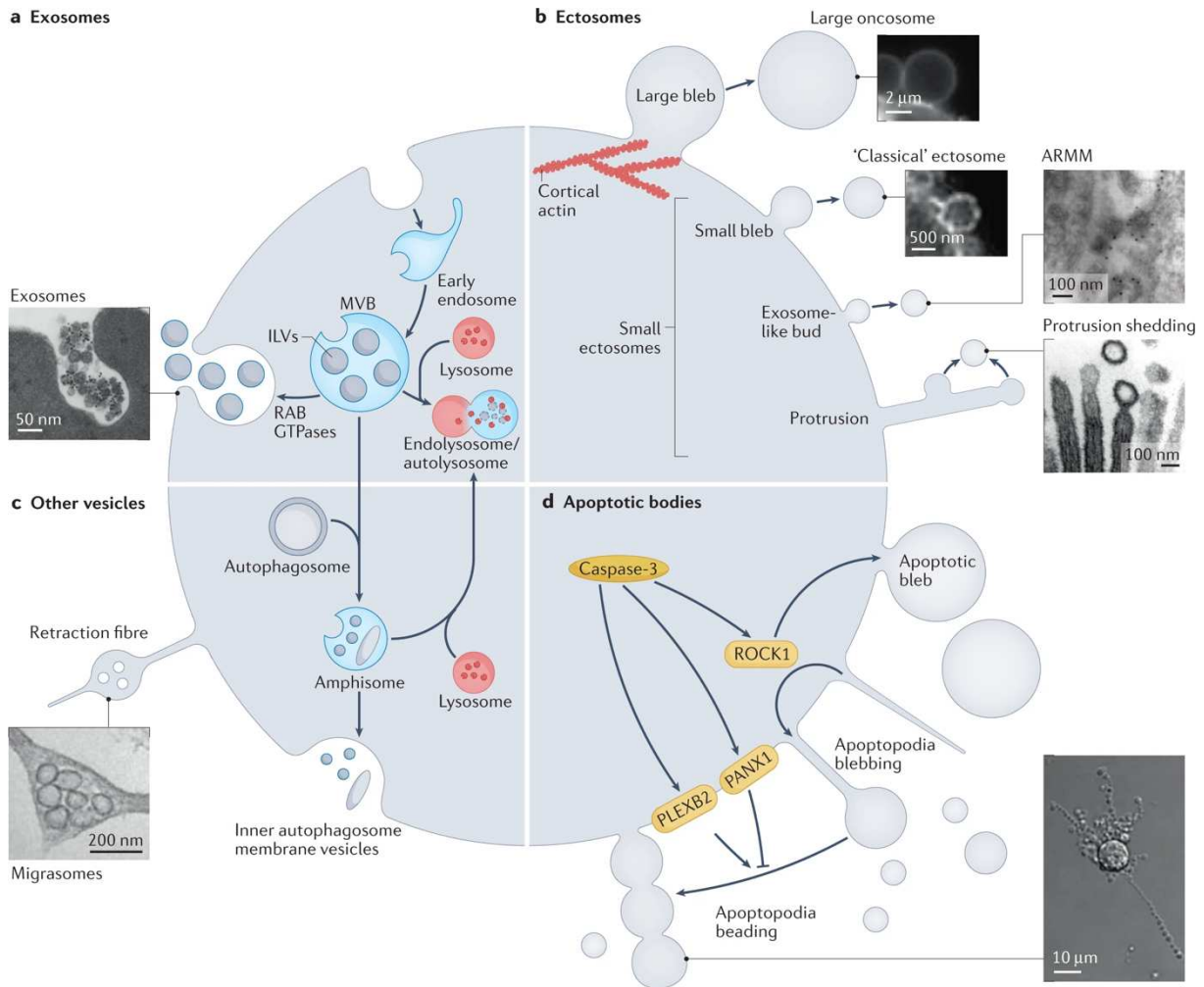


Figure 19 : Voies de biogenèse des EVs

D'après Dixson et al 2023.

résultent de la fusion du MVB avec la MP après avoir échappé à la dégradation de son contenu intraluminal par sa fusion avec le lysosome.

Les ectosomes **(b)**, anciennement appelés microvésicules, proviennent du bourgeonnement de la MP, et sont divisés en deux grandes sous-populations. Le groupe des petits ectosomes, grâce à l'avancée technologique de l'imagerie des EVs par microscopie électronique, s'est beaucoup développé par l'observation de formations membranaires très variables et comptabilise à présent de nombreux sous-types d'EVs émanant de ces protrusions. La formation de ces extensions est dynamique et dépendante du cytosquelette d'actine, des polysaccharides du glycocalyx, et des lipides membranaires qui seront aussi importants dans la sécrétion des vésicules par bourgeonnement, excrétion, perlage ou scission (Figure 20) (Chhabra et Higgs 2007; Rilla 2021; Shurer et al. 2019).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

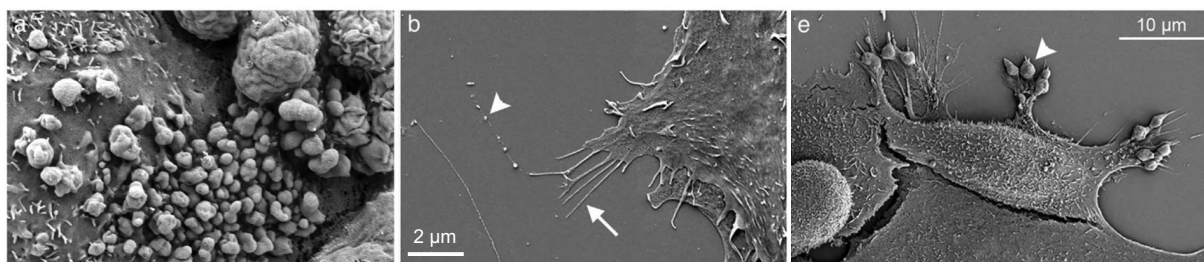


Figure 20 : Formations membranaires et sécrétion d'ectosomes

D'après Rilla, 2021. Images prises par microscopie électronique à balayage représentatives de filipodes ou autres protrusions (flèches) et octosomes ou migrasomes (pointes de flèches) et des différentes formations membranaires par bourgeonnement (a), filipodes (b), ou par fibres de rétraction (e).

Les oncosomes ou larges ectosomes représentent une catégorie d'EVs spécifiques des cellules cancéreuses qui est décrite dans de nombreux types de tumeurs (Ciardiello et al. 2020). Ces oncosomes sont des ectosomes particuliers puisque leur bourgeonnement est régi par les incurvations de la MP et du cytosquelette d'actine mais aussi par le récepteur EGFR (pour epidermal growth factor receptor) que les vésicules transporteront et qui leur sera essentiel pour cibler les cellules réceptrices (Al-Nedawi et al. 2008; Ciardiello et al. 2020). Le rôle d'EGFR souligne l'importance du cargo transporté, auquel nous nous intéresserons plus précisément pendant la biogenèse, la caractérisation, ou bien l'adressage de l'EV. Pour la suite de mon exposé, par souci de compréhension et de fluidité je continuerai d'appeler « ectosomes », l'ensemble des petits ectosomes et « oncosomes » les larges ectosomes.

Il existe d'autres types d'EVs (c), qui sont difficilement dissociables des exosomes puisqu'ils proviennent de l'autophagie qui a recourt à la voie lysosomale au même titre que la voie endosomale. De nombreux croisements de matériel sont donc envisageables entre l'autophagosome et le MVB, dont la structure hybride résulte en l'amphisome et qui est également capable de libérer son contenu après fusion avec la membrane. Également les EVs libérées par les migrasomes, peuvent être considérées comme des ectosomes, car ce sont des organelles spécifiques des cellules capables de migration, formées au sein de fibres de rétraction membranaires et dont la pousse est contrôlée par la tétraspanine 4 (Figure 20) (Ma et al. 2015).

Les corps apoptotiques (d), de par leur genèse à partir de la MP sous forme de bourgeons ou de filipodes appelées « apoptopodia » sont très proches des ectosomes. Mais

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

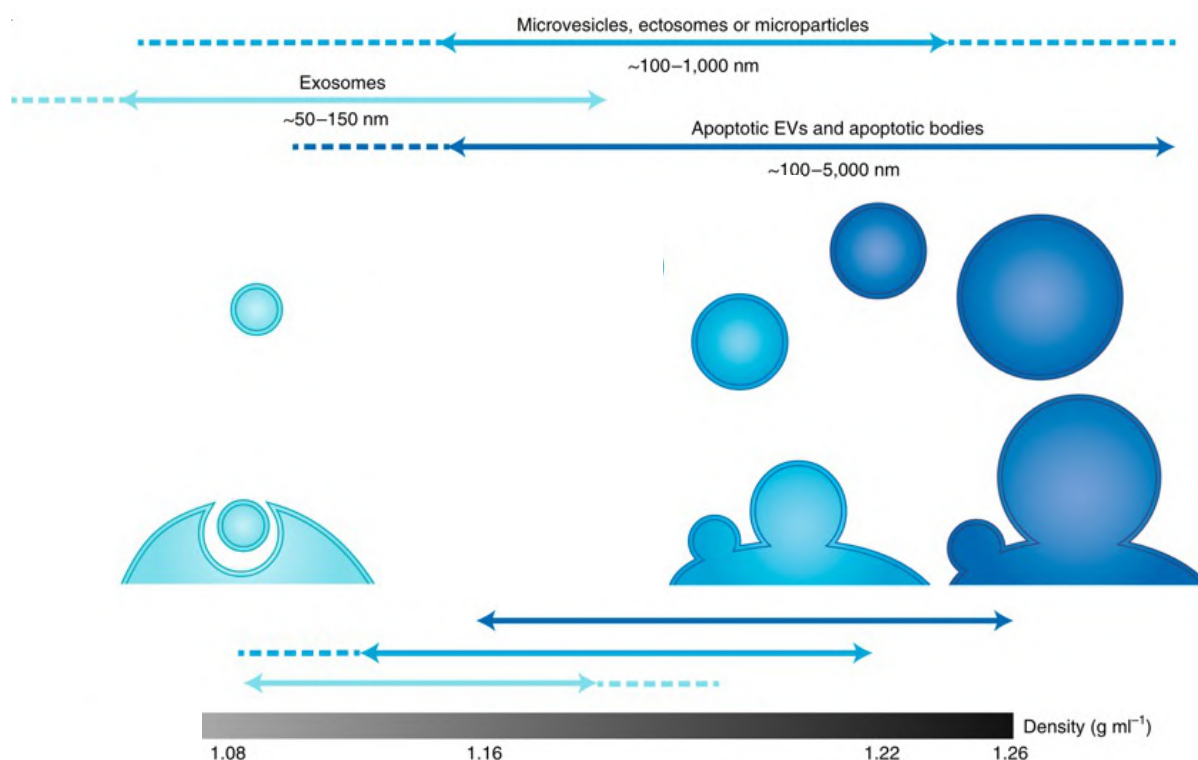


Figure 21 : Caractéristiques physiques des différents types d'EVs

Adaptée d'après Mathieu et al 2019.

comme les oncosomes, ils représentent un groupe à part entière et sont sécrétés uniquement lorsque que la cellule est en état d'apoptose sous l'action de la caspase 3 (Atkin-Smith et al. 2015).

Cela appuie une fois de plus que la distinction entre les différents types d'EVs, nécessite la présence de marqueurs spécifiques, et qu'elle ne peut se faire en prenant uniquement en compte leur origine ou leurs caractères physiques même s'ils apportent des informations importantes (Figure 21) (Dixson et al. 2023; van Niel et al. 2022; Welsh et al. 2024).

Leur description suivant ces différents sites de sécrétion et de maturation a également révélé des différences de taille et de densité, permettant une seconde caractérisation mais qui reste tout de même variable au sein d'une même population d'EVs. Les oncosomes (non représentés sur cette figure) sont de très grandes vésicules mesurant entre 1 et 10 μm . Ils sont suivis par les corps apoptotiques et les ectosomes qui sont des objets avec des densités et des tailles assez variables pouvant mesurer entre 50 et 5000 nm ou entre 50 et 1000 nm respectivement. Au contraire, les exosomes ont une taille assez restreinte comprise entre 30 et 150 nm (Figure 21) (Mathieu et al. 2019; van Niel et al. 2022; Rilla 2021).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

3.2 ASPECTS MOLECULAIRES DES VESICULES EXTRACELLULAIRES

3.2.1 Biogenèse, composition et sécrétion des vésicules extracellulaires

A l'instar des ectosomes constitués à partir de la MP, la formation des ILVs se fait par invagination de la membrane du MVB et va mener à la création d'une EV intraluminale, formée d'une bicouche lipidique et remplie d'un contenu cytosolique, présentant tous deux des cargos spécifiques à la cellule et au type de vésicule.

Ce phénomène de biogenèse peut être dépendant ou non de la machinerie ESCRT qui comprend des complexes protéiques allant de 0 à III. Les différents complexes ont donc des activités différentes mais communes aux mécanismes de biogénèse de l'ensemble des EVs. Or, les différentes voies de biogénèse qu'emprunteront les EVs sont diverses et variées, elles peuvent être dépendantes d'ESCRT, indépendantes ou même hybrides et ainsi combiner une phase d'initiation ESCRT-indépendante avec une sécrétion utilisant le complexe ESCRT-III (Tableau 9).

3.2.1.1 Biogenèse et recrutement de cargos dépendants du système ESCRT

Le complexe ESCRT-I a été décrit pour la première fois, pour son implication dans la reconnaissance de protéines flanquées d'une Ub et de leur intégration dans les ILVs du MVB, leur permettant ainsi d'échapper à une dégradation par les enzymes lysosomales. Puis le

Tableau 9 : Machineries moléculaires utilisées dans les différents mécanismes de biogenèse et de sécrétion des EVs

D'après Hurley 2015, Larios 2020, van Niel, D'Angelo et Raposo, 2018.

	Exosome				Ectosome			
	Cargo recruitment	Biogenesis	ILV formation		Secretion	Cargo recruitment	Biogenesis	Secretion
ESCRT-dependant	ESCRT-0	ESCRT-I/II	ESCRT-III/VSP4		ARF6/RhoA-ROCK	ARRDC1	ESCRT-I/II TSG101	ESCRT-III + Vsp4
	Syntenin/Syndecan	ALIX/TSG101	ESCRT-III/ VSP4	SMase + PLD				
ESCRT-independant	CD9/CD81/CD63	Ceramides/ SMase	SMase + PLD			CD9/CD81 Glycocalyx	SMase + PLD Calpains/Ca ²⁺ + Floppases/Flippases	ARF6/RhoA-ROCK PLD Acto-myosine

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

système ESCRT a également révélé sa participation dans la biogenèse des MVBs et des ILVs à partir de leur propre membrane.

Au-delà de la formation de vésicules, le complexe ESCRT-III, par la formation d'un anneau contractile autour des membranes, est indispensable lors de nombreuses fonctions cellulaires : la cytotiérèse qui est l'étape finale de la division cellulaire ou encore lors du neurodéveloppement dans l'élagage des prolongements neuronaux (appelés neurites et regroupant les axones et les dendrites) surnuméraires qui n'auraient pas formé de synapse (Figure 22) (Hurley 2015; Katzmann, Babst, et Emr 2001).

Dans la biogenèse de l'ILV, les complexes 0, I et II seront impliqués dans le recrutement du contenu à transporter par l'EV grâce à leurs domaines de liaison à l'Ub. Cette phase de recrutement pour les ectosomes, se fait par l'interaction entre une Ub ligase, ARRD1 (pour arrestin domain-containing protein 1) et TSG101 (pour Tumor susceptibility gene 101) qui ensemble permettent de diriger les protéines modifiées vers un motif PSAP exprimé au niveau de la MP (Figure 23 et Tableau 8).

Ces phases de recrutement de cargos dépendante d'ESCRT sont ainsi dirigées par l'Ub laissant penser qu'un défaut d'ubiquitination, de protéasome ou encore de l'autophagie qui

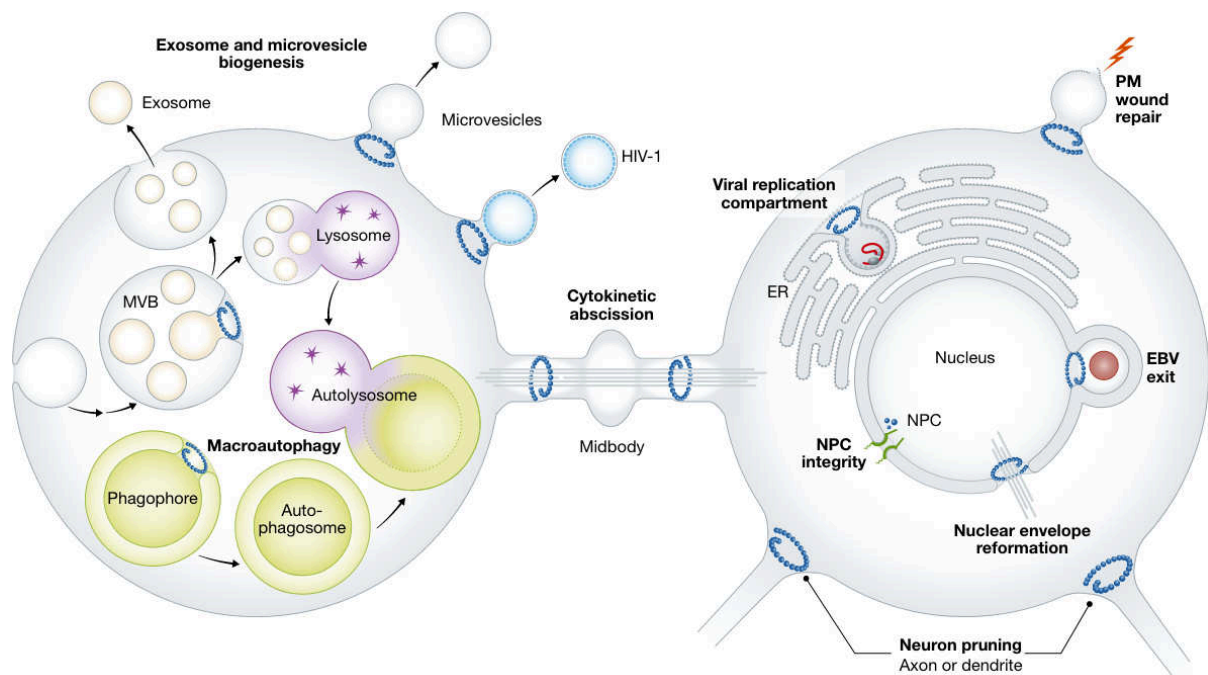


Figure 22 : Fonctions cellulaires du système ESCRT

D'après Hurley 2015.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

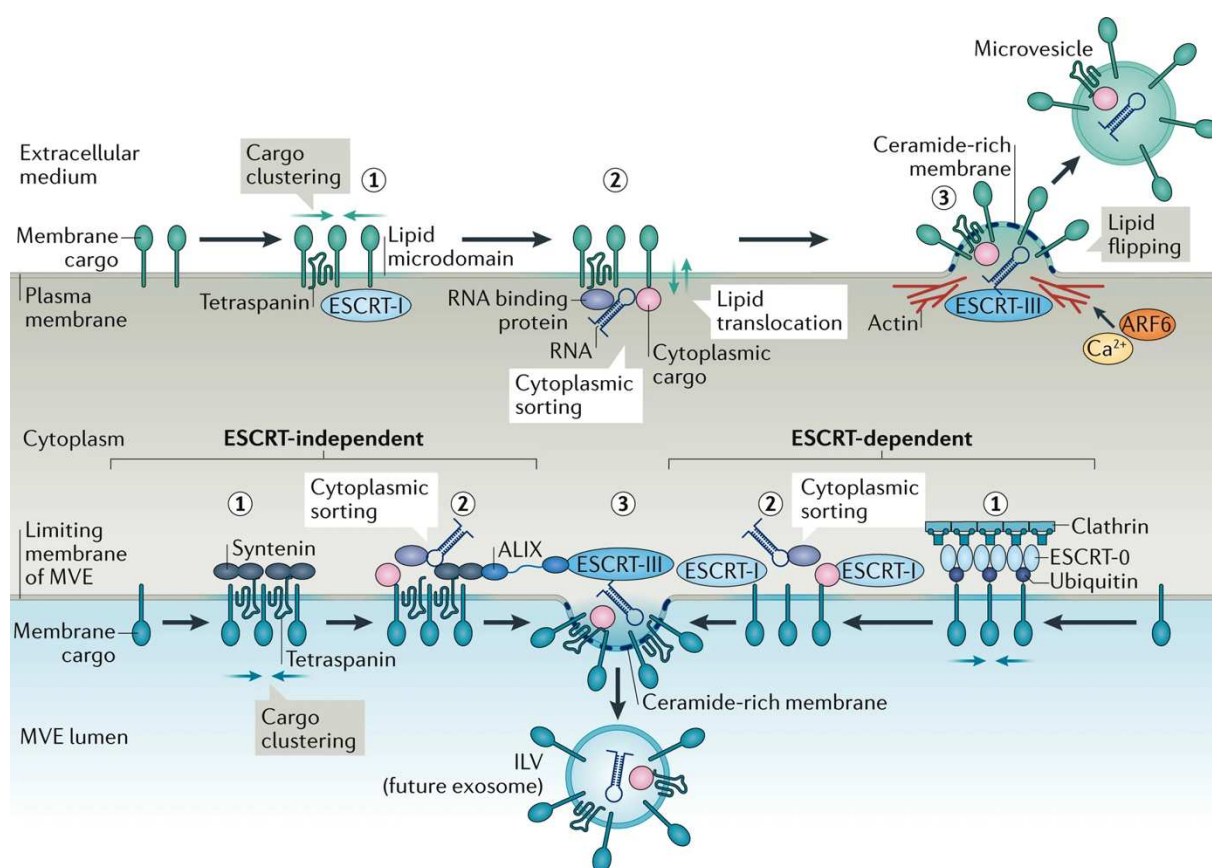


Figure 23 : Mécanismes de biogenèse des EVs

D'après van Niel, D'Angelo et Raposo, 2018.

permettent de dégrader les protéines poly-ubiquitinées comme dans les MPSs et MNDs va impacter la biogenèse des EVs (Cao et al. 2019; Eskelinen et Saftig 2009).

Il est à noter que l'ajout d'une Ub n'est pas la seule modification post-traductionnelle (MPT) utilisée pour l'adressage de protéines destinées à leur empaquetage par les EVs. La cellule en réponse à différents stimuli va adapter son choix de MPT en fonction de la réponse attendue dans la cellule cible, c'est-à-dire une résistance à la dégradation ou encore l'enrichissement de l'EV en une molécule donnée. Peut être ajouté sur la protéine des lipides, par la palmitoylation ou la farnesylation qui vont permettre de lier les protéines au radeaux lipidiques de l'EV, des modifications chimiques comme l'acétylation qui peut diriger la protéine vers une dégradation lysosomale, ou encore des glycosylations, l'ajout de protéines et d'acides nucléiques (Figure 24) (Moreno-Gonzalo, Fernandez-Delgado, et Sanchez-Madrid 2018). L'appareil de Golgi étant le centre des MPT, il paraît envisageable que des dysfonctions de cet organite comme retrouvé dans la MPS III puisse engager des défauts de chargement actif des EVs.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Une voie alternative à la biogenèse des ILVs appelée syndécan–synténine–ALIX est aussi dépendante d’ESCRT et même qualifiée de canonique, est représentée par TSG101, une sous-unité d’ESCRT-I et ALIX (pour Apoptosis-linked gene 2–interacting protein X), une protéine accessoire d’ESCRT. Cette branche de biogenèse est induite par la synténine qui recrutera ALIX via un motif tétrapeptidique spécifique YPXL et qui sera également liée à une tétraspanine CD63, mais surtout au niveau intraluminal à un HSPG, le syndécan-1 enchâssé dans la membrane (Figure 23 et 25 et Tableau 8) (Colombo, Raposo, et Théry 2014; Hurley 2015; Kalra, Drummen, et Mathivanan 2016; Larios et al. 2020; van Niel et al. 2018; Stahl et Raposo 2019).

Cette voie syndécan–synténine–ALIX mais plus largement la sécrétion des exosomes sera régulée par les syndécans, qui pour rappel sont les HSPGs transmembranaires membranaires les plus représentés. Mais surtout des études ont montré que la HSPE qui clive les chaînes d’HS aux niveaux intra- et extracellulaire (Figure 3, page 19), va promouvoir l’internalisation de syndécans par la cellule, la biogénèse d’exosomes chargés en cargo syndécans, mais aussi leur sécrétion dépendante de la voie syndécan–synténine–ALIX (Cerezo-Magaña, Bång-Rudenstam, et Belting 2020; Roucourt et al. 2015; Thompson et al. 2013).

Tous les acteurs de cette voie participeront ensemble au recrutement de cargos et surtout ALIX qui se trouve être importante dans le tri de micro ARNs (miRNAs ou miRs) et de protéines liées à l’ARN (RBP pour RNA binding proteins) comme argonaute 2 (Ago2) impliquée dans la prise en charge des miRNAs.

Effectivement, les EVs peuvent contenir et transporter différents types d’ARNs tels que les ARN messagers (mRNAs), de transfert (tRNAs) mais surtout ils sont enrichis en petits ARNs non codants tels que les miRNAs, les ARNs interagissant avec piwi (piRNAs), les petits ARNs nucléaires (snRNAs) et nucléolaires (snoRNAs), ou encore les Y-RNAs.

Les miRNAs sont ceux qui suscitent le plus grand intérêt et les plus étudiés car leurs fonctions biologiques sont bien décrites puisqu’ils sont impliqués dans la répression de la synthèse protéique car de par leur liaison aux mRNAs, ils vont mener à leur dégradation ou empêchent leur traduction par les ribosomes. En effet, leur expression est inversement liée à celle du mRNA cible et ainsi l’enrichissement d’un miRNA dans une EV aurait pour but d’inhiber l’expression d’une protéine cible (He et Hannon 2004).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Le remplissage des miRNAs dans les EVs peut se faire passivement dans le cas des ectosomes par leur présence en abondance dans le cytosol ou par le biais de phénomènes actifs dans le cas des exosomes. La régulation de leur chargement implique que les miRNAs présentent dans leur séquence un EXO-MOTIF ciblant leur destination vers un exosome en représentant un domaine de liaison par les RBPs qui les prendront en charge telles qu'Ago2, YB-1 ou la ribonucléoprotéine hnRNPA2B1. Cette dernière à l'instar des protéines, devra être modifiée post-traductionnellement par la SUMOylation ou O-GlcNAcylation pour pouvoir prendre en charge le miRNA, représentant une étape de contrôle supplémentaire dans la sélection des miRNAs à charger dans un exosome (Figure 24) (Abels et Breakefield 2016; Baietti et al. 2012; Dixon et al. 2023; Driedonks et Nolte-t Hoen 2019; Hurley 2015; Iavello et al. 2016; Stahl et Raposo 2019; Villarroya-Beltri et al. 2013).

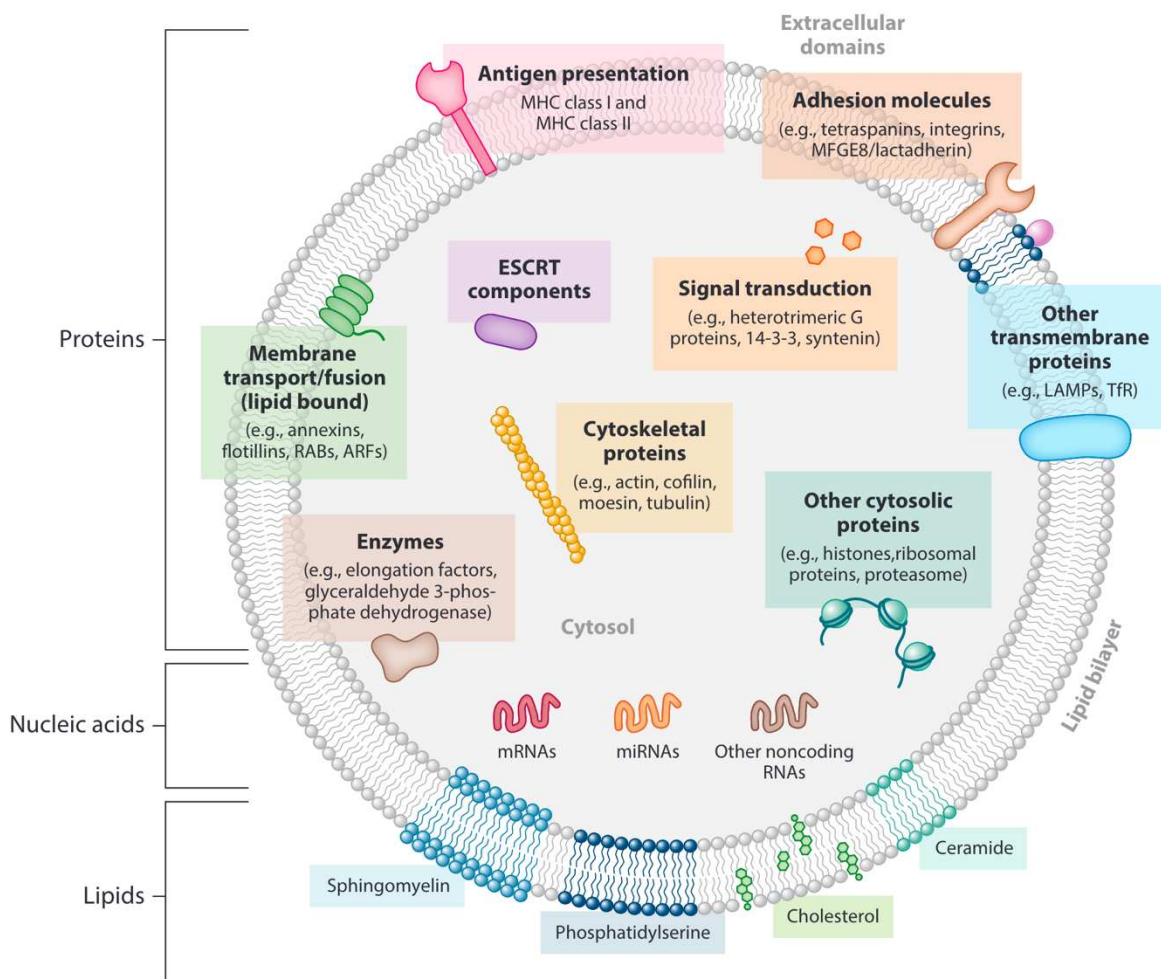


Figure 24 : Structure et composition moléculaire d'une EV

D'après Colombo et al. 2014.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Finalement, ont déjà été retrouvés dans les EVs de l'ADN génomique en très faible quantité mais surtout de l'ADN mitochondrial (mtDNA) qui peut être relargué par la mitochondrie endommagée suite à un stress important dans la cellule. Ce transport de mtDNA peut aussi être lié aux faits que 1) les ectosomes sont capables de transporter des mitochondries entières et que 2) des mitovésicules ont été décrites dernièrement, elles sont sécrétées par la mitochondrie, de très petite taille et avec une simple membrane mais qui pourraient être co-isolées avec des exosomes (D'Acunzo et al. 2022; Puhm et al. 2019) (Figure 24).

3.2.1.2 Biogenèse et recrutement de cargos indépendants du système ESCRT

De manière générale, la biogenèse des EVs ESCRT-indépendante est médiée et finement régulée par la composition lipidique de la MP et du MVB ainsi que par le rassemblement de cargos transmembranaires telles que les tétraspanines comme CD9, CD81 et spécifiquement CD63 pour les ILVs. Ainsi, ces tétraspanines – au même titre que les autres protéines et lipides engagés dans la biogenèse – seront des marqueurs spécifiques des EVs et seront largement utilisées pour leur caractérisation biochimique (Welsh et al. 2024).

Dans le cas des ectosomes, en plus des tétraspanines, le glycocalyx va jouer un rôle dans le recrutement de cargos, mais va aussi agir sur le cytosquelette qui va induire des courbures de la membrane à l'origine d'une sécrétion de vésicule (Rilla 2021).

De manière commune à tous les EVs, la modulation de la composition lipidique de la MP ou de la membrane du MVB et leur réarrangement vont permettre d'induire des bourgeonnements ou des incurvations de ces dernières. La MP est majoritairement composée de glycérophospholipides et de sphingolipides telles que la sphingomyéline (SM) ou le céramide (Cer). En comparaison la bicouche lipidique qui forme les futurs EVs contient plus de phosphatidylsérine (PS), de SM, de Cer, d'acides gras saturés et de cholestérol et de manière intéressante le ganglioside GM3 est aussi très représenté.

La particularité de la membrane des EVs est que l'asymétrie caractéristique de la MP n'est pas conservée, et que la PS est surexposée sur le feuillet externe. La modification de composition des lipides et leur inversion entre le côté interne et externe de la MP qui sera essentiel aux mouvements de la membrane est possible suivant plusieurs mécanismes, le

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

premier est par l'action de la sphingomyélinase (SMase). La translocation de la SMase vers le milieu extracellulaire ou sa présence intraluminaire dans le MVB va lui permettre de convertir la SM en Cer.

De manière ATP-dépendante les floppases, qui sont des translocases conduisent à l'externalisation de la PS, mais nécessitent l'action conjointe de flippases qui vont conditionner le passage de phosphatidylcholine ou de sphingomyéline vers le côté interne pour maintenir une asymétrie membranaire et éviter sa rupture. Les scramblases sont également capables de catalyser ces réactions mais sont dépendantes de la teneur en Ca^{2+} intracellulaire, et peuvent induire le transport des lipides dans les deux sens.

Finalement, la phospholipase D est capable d'induire la voie syndécan–synténine–ALIX pour la biogenèse des exosomes de manière ESCRT-dépendante mais aussi elle peut recruter ARF6 (pour ADP-ribosylation factor 6) qui sera impliquée dans la biogenèse des EVs de manière ESCRT-indépendante (Tableau 9, Figure 23) (Abels et Breakefield 2016; Colombo et al. 2014; Record et al. 2018; Su et al. 2021).

3.2.2 Sécrétion des vésicules extracellulaires

Suite au chargement de la vésicule par le cargo en protéines, lipides et ARNs présents dans le cytosol, la formation finale des ILVs dans le MVB ou la sécrétion d'ectosomes à la MP se fait de manière ESCRT-dépendante grâce au complexe ESCRT-III recruté par ESCRT-II ou ALIX

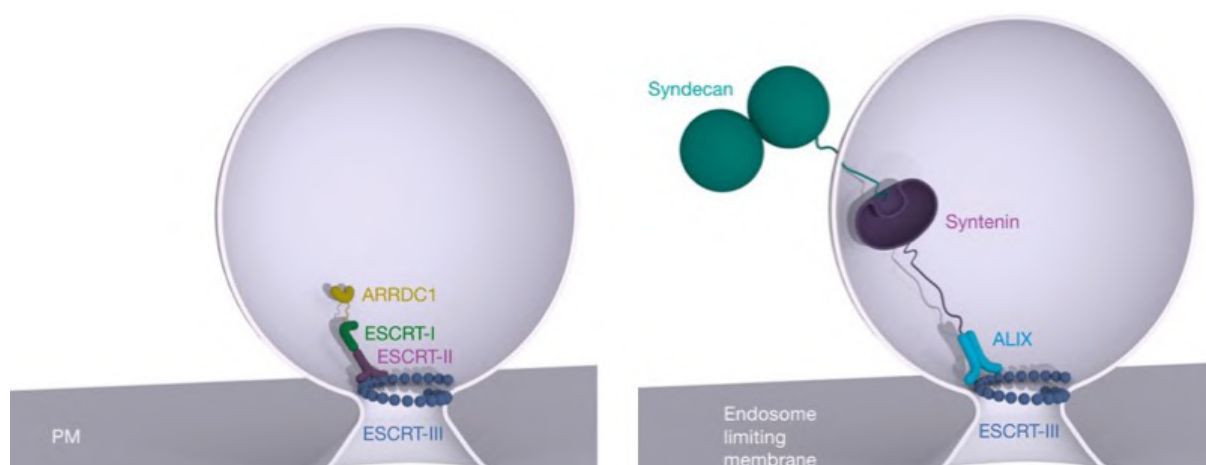


Figure 25 : Bourgeonnement vésiculaire par les protéines ESCRTs

D'après Hurley 2015.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

respectivement. ESCRT-III sera capable de former une spirale autour du bourgeon membranaire, puis sous l'action de l'ATPase VSP4 (pour vacuolar protein sorting 4-A) d'étrangler sa base pour séparer l'EV de la membrane (Tableau 9, Figure 23 et 25).

En plus de sa fonction de constriction, ESCRT-III sera essentiel pour la réparation de la MP après bourgeonnement, dépendamment d'un influx calcique au niveau du pore membranaire. ALG-2 (pour apoptosis linked Gene-2) jouera le rôle de senseur de ce Ca^{2+} et recrutera ALIX accompagné d'ESCRT-III et de VSP4 qui procéderont à la réparation (Ciardiello et al. 2020; Colombo et al. 2014; Hurley 2015; Kalra et al. 2016; van Niel et al. 2018; Stahl et Raposo 2019).

La fermeture et la sécrétion de l'ectosome peut aussi se faire de manière ESCRT-indépendante, sous l'effet de l'augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire

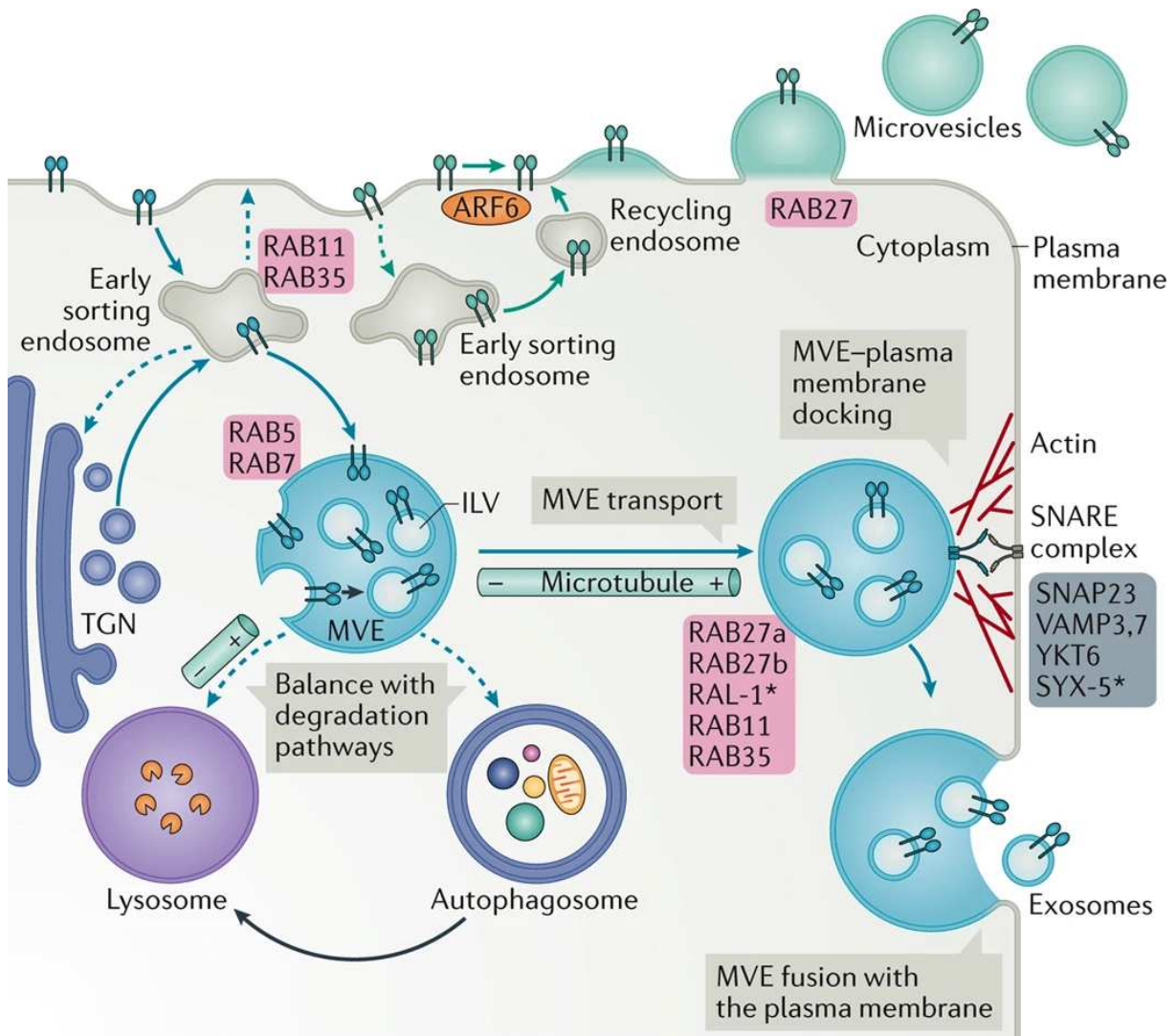


Figure 26 : Sécrétions des vésicules extracellulaires

D'après van Niel, D'Angelo et Raposo 2018.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

permettant l'action de protéases, les calpaïnes qui vont désolidariser les liens établis entre le cytosquelette et la MP et lui permettre de subir des courbures. Puis, les GTPases ARF6 et Rho A (pour ras homolog family member A) vont s'activer et recruter ERK (pour extracellular signal-regulated kinase) et ROCK (pour RHO-associated protein kinase) qui au travers de l'activité de la PLD, sont impliquées dans l'activité contractile du complexe actine-myosine menant à la formation puis à la fermeture de la vésicule par fission de la MP (Ciardiello et al. 2020; Egea-Jimenez et Zimmermann 2018; Kalra et al. 2016; van Niel et al. 2018; Record et al. 2018).

Le MVB chargé en ILVs formées est prêt à échapper à la voie lysosomale et à délivrer son contenu dans le milieu extracellulaire par fusion avec la MP à laquelle il sera adressé et transporté dépendamment du réseau MTOC sous le contrôle d'ORP1L et de Rab 27 (page 16). Son ancrage à la MP implique la voie ARF6/RhoA-ROCK qui régit le cytosquelette d'actine et du complexe des protéines de fusion SNAREs, dont résulte également la fusion entre endosomes et lysosomes (Figure 26 et Figure 1, page 16) (Kalra et al. 2016; Mathieu et al. 2019; van Niel et al. 2018).

3.2.3 Voies d'internalisation et rôle des vésicules extracellulaires dans la cellule cible

Les EVs sont centrales dans la médiation de la communication intercellulaire et ont pour cible des cellules à plus ou moins longue distance. De manière évidente, les EVs peuvent interagir directement avec des cellules voisines (délivrance paracrine) et même avec la cellule sécrétrice (délivrance autocrine) or elles sont connues pour être capables d'atteindre d'autres tissus et systèmes en empruntant la circulation sanguine (délivrance endocrine) (Figure 27) (van Niel et al. 2022).

Grâce à leur aptitude à traverser par transcytose des barrières physiques telles que la BHE ou les cellules endothéliales des vaisseaux, les EVs représentent un grand intérêt dans le domaine biomédical. Le sang ne sera pas leur seul réservoir fluide et les EVs seront aussi capables d'atteindre le LCR et les urines. Également, elles peuvent rejoindre le cerveau depuis la périphérie et inversement. Ainsi l'étude des EVs dans la recherche sur les maladies neuronales

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

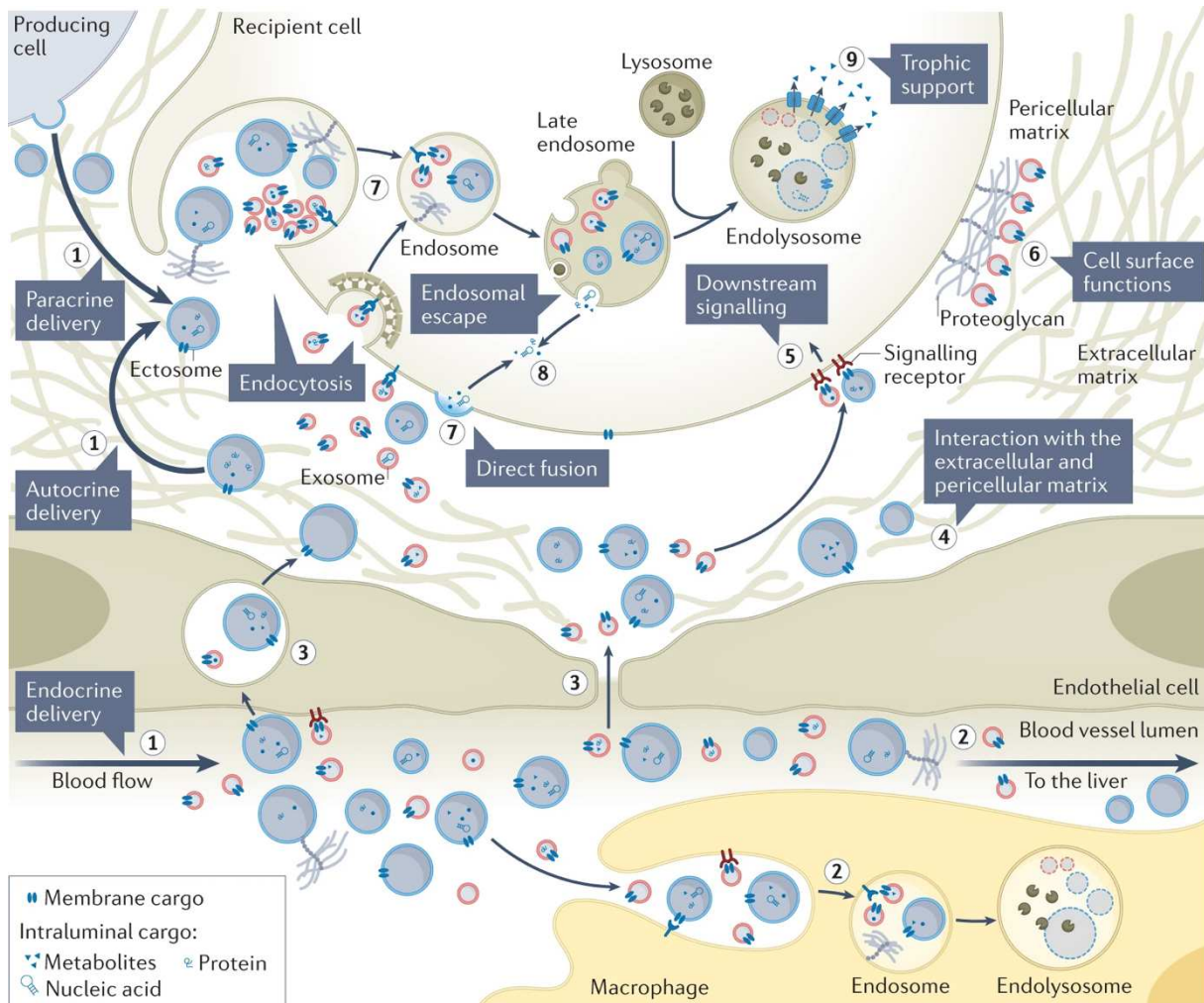


Figure 27 : Voies de dissémination et d'internalisation des EVs

D'après van Niel et al. 2022.

devient une incontournable pour le développement d'outils de diagnostic et de suivi et de vecteurs pour des molécules thérapeutiques (Saint-Pol et al. 2020).

Une fois dans le milieu extracellulaire ou même dans les fluides biologiques, les EVs vont interagir avec les HSPGs libres de la MEC, mais également avec un grand nombre de ligands divers (Figure 27) (Gerlach et Griffin 2016). Des études récentes ont montré que par leur force d'interaction avec leur environnement, les EVs peuvent également charger des protéines coronaires. Ce nouveau compartiment coronaire de l'EV peut être composé d'éléments de matrice, de cytokines et chimiokines, d'immunoglobulines et même d'enzymes attachées par des liaisons avec une affinité plus ou moins importante (Buzás et al. 2018; Heidarzadeh et al. 2023; Tóth et al. 2021).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Les HSPGs présents à la surface de la cellule cible, vont également jouer un rôle dans la reconnaissance des EVs médiant directement une réponse cellulaire via la transduction du signal. Les HSPGs ne seront pas les seuls à jouer le rôle de récepteur aux EVs qui peuvent aussi être de type intégrine ou même des protéines reconnaissant les lipides comme la PS enrichie à la surface de l'EV (Figure 27 et 28) (van Niel et al. 2022, 2018; Record et al. 2018).

Les mécanismes d'internalisation de l'EV sont encore très peu compris et décrits mais il est connu que les HSPGs sont aussi capables d'induire l'internalisation de l'EV par la cellule cible à travers la voie d'endocytose (Buzás et al. 2018; Cerezo-Magaña et al. 2020; Dixon et al. 2023). C'est également le cas pour les protéines transmembranaires reconnaissant la PS telles que les annexines et qui se trouvent être très importantes dans la médiation de la phagocytose par le macrophage.

L'internalisation de l'EV peut également être le résultat de la fusion de l'EV avec la MP qui va directement libérer son contenu dans le cytoplasme de la cellule, ou de l'endocytose qui peut être médiée par des vésicules recouvertes de clathrine, cavéoline ou juste induite par les radeaux lipidiques.

L'endocytose de l'EV va directement la mener vers la voie endolysosomale où comme n'importe quel matériel extracellulaire l'EV sera soit dirigée vers les endosomes de recyclage ou le MVB pour un retour et une sécrétion à la MP. Lorsque au sein du MVB la membrane de

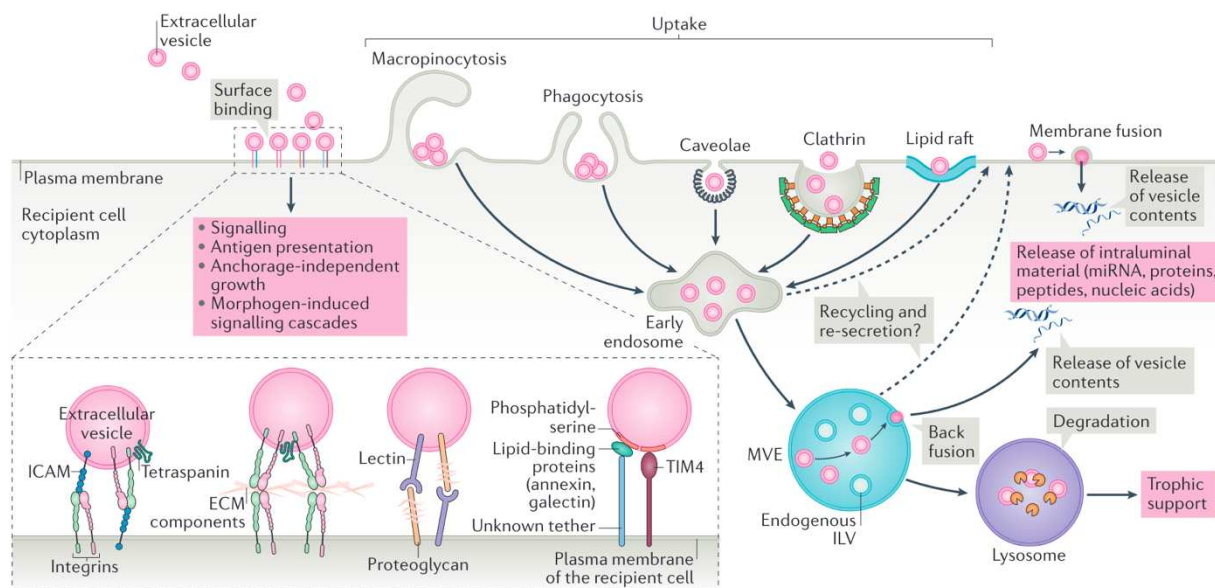


Figure 28 : Signalisation cellulaire et internalisation des EVs par la cellule cible

D'après van Niel, D'Angelo et Raposo 2018.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

l'EV peut fusionner avec celle du MVB et délivrer son contenu dans le cytoplasme, ou bien terminer sa route jusque dans l'endolysosome où elle sera dégradée avec son contenu ou non qui en fonction de sa nature peut être larguer dans le cytoplasme au travers des canaux lysosomaux (Figure 27 et 28) (van Niel et al. 2022, 2018; Raposo et Stoorvogel 2013).

3.3 PHYSIOPATHOLOGIE DES VESICULES EXTRACELLULAIRES

3.3.1 *Altération de la voie des HSPGs et implications dans la communication intercellulaire*

Les HSPGs jouent un rôle central dans la biogenèse des EVs via la voie syndécan-synténine-ALIX, mais aussi dans leur trafic intercellulaire ou encore dans leur internalisation et la transduction d'un signal dans la cellule cible.

De manière évidente dans la MPS III, la cellule rencontre des problèmes dans la dégradation des HSs et plus largement des HSPGs mais aussi et certainement dans leur synthèse puisqu'elle a principalement lieu dans l'appareil de Golgi qui présente une désorganisation et des défauts fonctionnels importants (Vitry et al. 2010). Comme développé précédemment (page 49-55) ces altérations de compartiments intracellulaires et l'abondance de matériel non dégradé provoquent des défauts de transports intracellulaires des MVBs pour un ancrage à la MP et une libération d'EVs. Mais aussi des défauts d'adressage de vésicules golgiennes contenant des HSPGs *de novo* synthétisés ou des syndécans recyclés depuis la MP par la voie endosomale et pouvant directement impacter le recrutement de cargos essentiel à la biogenèse des EVs (van Niel et al. 2018).

De plus, l'HSPE est impliquée dans l'internalisation de syndécans et donc directement dans la biogénèse et la sécrétion d'EVs dépendante de la voie syndécan-synténine-ALIX. Ainsi nous pouvons imaginer une dérégulation de l'activité de l'HSPE qui, en tentant de palier aux défauts de dégradation de l'HS par les autres enzymes lysosomales, engendre une modulation de la biogenèse et la sécrétion d'exosomes. Mais aussi, l'abondance d'HSOs dans le cytoplasme et liés aux PGs membranaires mène à penser que l'EV sera capable de transporter des HSOs de

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

manière passive ou active par l'induction de la formation d'exosomes par les syndécans. (Cerezo-Magaña et al. 2020; Roucourt et al. 2015; Thompson et al. 2013).

Également, les défauts de flux autophagiques et endolysosomaux, empêchant la clairance des HSOs et autres substrats ainsi que l'abondance de Ca^{2+} vont pousser la cellule à sécréter des exosomes, des ectosomes, des autophagosomes mais aussi des vésicules lysosomales, nous conduisant à penser que les HSPGs transmembranaires, intraluminaux et les HSOs seront surreprésentés dans les vésicules (Medina et al. 2011; Tancini et al. 2019). Ces mêmes vésicules qui une fois dans le milieu extracellulaire seront capables de capter au niveau coronaire par leurs HSPGs de nouveaux HSOs accumulés dans la MEC et le cytosol (Figure 27) (Buzás et al. 2018; Gerlach et Griffin 2016; Heidarzadeh et al. 2023; Tóth et al. 2021). Finalement, cette profusion de d'HSPGs de type syndécan à la surface de la vésicule mais aussi à la surface de la cellule cible puisqu'ils permettent directement l'induction de l'endocytose pourraient conduire à une augmentation de l'internalisation de ces EVs surchargées en HSOs et HSPGs (Cerezo-Magaña et al. 2020).

L'état physiopathologique de la cellule régule aussi ce cycle de biogenèse, sécrétion et internalisation d'EV. Effectivement, ces mécanismes nécessitent un apport important en Ca^{2+} et en ATP impliquant des canaux calciques et des récepteurs purinergiques, qui nous le savons ont aussi un rôle central dans la neuroinflammation, la neurodégénérescence et la pathologie associée à la surcharge lysosomale. L'altération de la signalisation cellulaire sera donc décisive dans l'induction de la sécrétion d'EVs mais aussi dans leur dissémination de matériel pathologique (Bécot, Volgers, et van Niel 2020; Colombo et al. 2014; Dixon et al. 2023; Minakaki et al. 2018; van Niel et al. 2022; Tancini et al. 2019).

3.3.2 *La microglie et ses vésicules extracellulaires*

Au-delà de garantir la communication intercellulaire à longue distance, les EVs ont une pléthore de fonctions biologiques dans le SNC, et offrent une signalisation plus dense et complexe que par la délivrance de messagers via les jonctions cellulaires ou au travers des molécules solubles.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

L'ensemble des cellules du SNC sont capables de sécréter et d'internaliser des EVs qui participent à l'entretien d'un grand nombre de processus de développement et de soutien dans le maintien des activités de transmission et de plasticité synaptiques du neurone. A l'inverse, dans des conditions pathologiques, les EVs seront aussi capables de répandre la réponse inflammatoire ou le stress oxydant par la transmission de matériel altéré (Budnik, Ruiz-Cañada, et Wendler 2016; Delpech et al. 2019; Frühbeis et al. 2013; Krämer-Albers et Hill 2016; Pistono et al. 2021).

La microglie de par son lignage myéloïde – contrairement aux autres cellules cérébrales – a longtemps été caractérisée par son rôle principal de macrophage, représentant la seule cellule immunitaire capable de médier l'inflammation centrale par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de protéger le cerveau physiquement isolé par la BHE des autres systèmes périphériques, d'atteintes pathogéniques externes. Communément aux

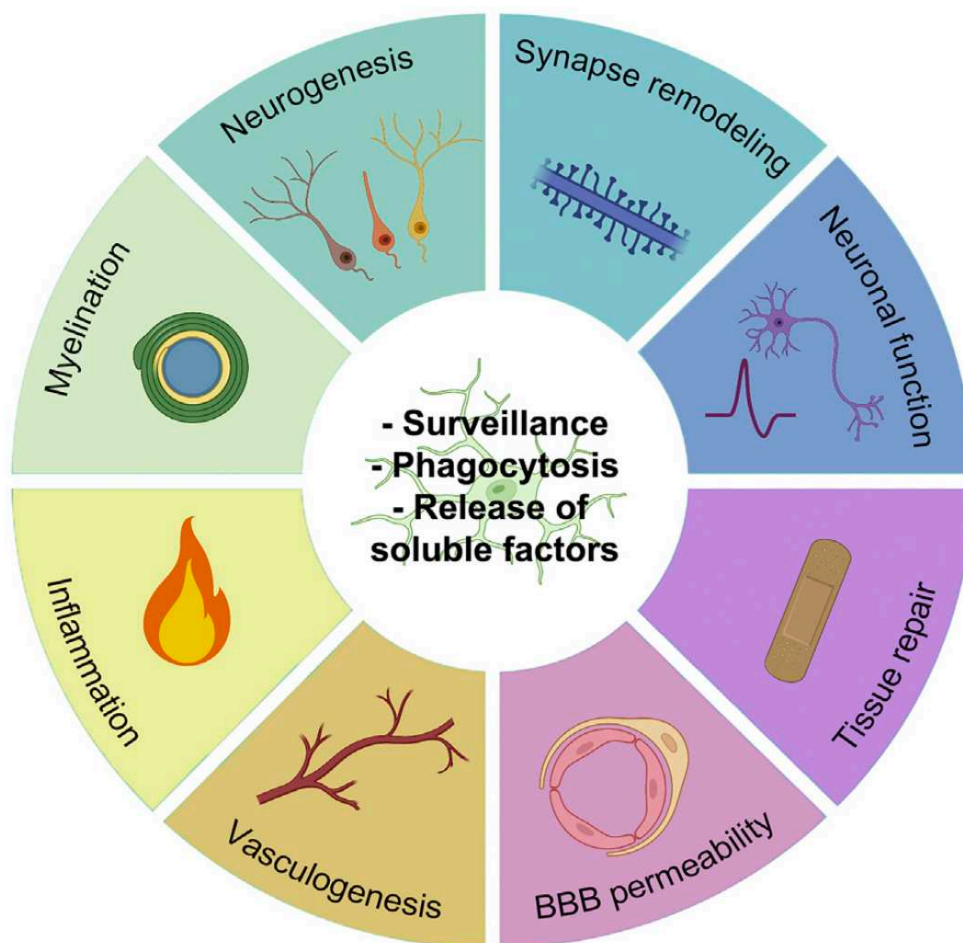


Figure 29 : Capacité et fonctions cérébrales de la microglie

D'après Paolicelli et al. 2022.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

macrophages périphériques, la microglie homéostatique dite M0 peut, suite à la rencontre d'un pathogène, adopter un phénotype pro-inflammatoire dit M1 ou un phénotype anti-inflammatoire dit M2.

Depuis, cette vision a beaucoup évolué grâce au développement de la cytométrie en flux et de l'avènement des techniques de protéomique ou de séquençage ARN sur cellule unique (single-cell RNAseq). Les études démontrent que la microglie adopte de manière dynamique différents phénotypes, pouvant passer par des stades intermédiaires et en adéquation avec la description non plus uniquement qualitative mais aussi quantitative de l'expression de marqueurs membranaires spécifiques. De plus, d'autres phénotypes ont émergé et décrivent une microglie qui évolue spatialement et qui est spécifique de l'environnement neuronal. Les DAM (pour disease associated microglia) par exemple, sont associées aux MNDs comme l'AD et sont localisées au niveau des plaques A β et leur fonction principale est la phagocytose de protéines accumulées comme l'A β (Deczkowska et al. 2018; Gao et al. 2023; Keren-Shaul et al. 2017; Li et al. 2021; Muzio, Viotti, et Martino 2021; Woodburn, Bollinger, et Wohleb 2021).

Ces techniques ont également permis de montrer que la microglie est présente dans le SNC dès le développement embryonnaire et qu'elle est essentielle à la neurogénèse et aide à la prise en charge de la migration des neurones ou du guidage axonal (Cserép, Pósfai, et Dénes 2021; Thion, Ginhoux, et Garel 2018). Après la naissance, elle continue de participer à ces fonctions essentielles au neurone en influençant directement la plasticité synaptique grâce à la formation de synapses fonctionnelles notamment par l'élagage d'épines dendritiques surnuméraires. Indirectement elle régule aussi la myélinisation et la transmission synaptique par la modulation de l'activité des oligodendrocytes et des astrocytes respectivement (Figure 29) (Gabrielli, Raffaele, et al. 2022; Paolicelli et al. 2022; Sierra, Paolicelli, et Kettenmann 2019).

Les EVs sécrétées par la microglie ne sont que le reflet de toutes ces fonctions et phénotypes évoquées.

Ainsi, leur isolation puis la caractérisation de leur contenu spécifique représente un attrait pour la communauté scientifique dans la description ou même la découverte de populations cellulaires. Effectivement, dans un contexte de MND il a largement été décrit qu'elles

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

participent à la neurodégénérescence par le transport de protéines et de miRNAs pro-inflammatoires mais aussi de protéines mal repliées comme A β , tau, α -synucléine ou encore de type prion (Asai et al. 2015; Guo et al. 2020; Li et al. 2023; Prada et al. 2018; Ruan et al. 2020; Sigdel, Swenson, et Wang 2023; Xia, Wang, et Zheng 2022).

Cette transmission de contenu pathogénique par les EVs de microglie est une caractéristique partagée avec les autres cellules du SNC tels que les astrocytes (D'Arrigo et al. 2021; Wang et al. 2017; You et al. 2020; Zhao et al. 2021), les oligodendrocytes (Frühbeis et al. 2013, 2020; Krämer-Albers et Hill 2016; Pistono et al. 2021) ou encore les neurones (Gabrielli, Tozzi, et al. 2022; Lachenal et al. 2011; Sardar Sinha et al. 2018).

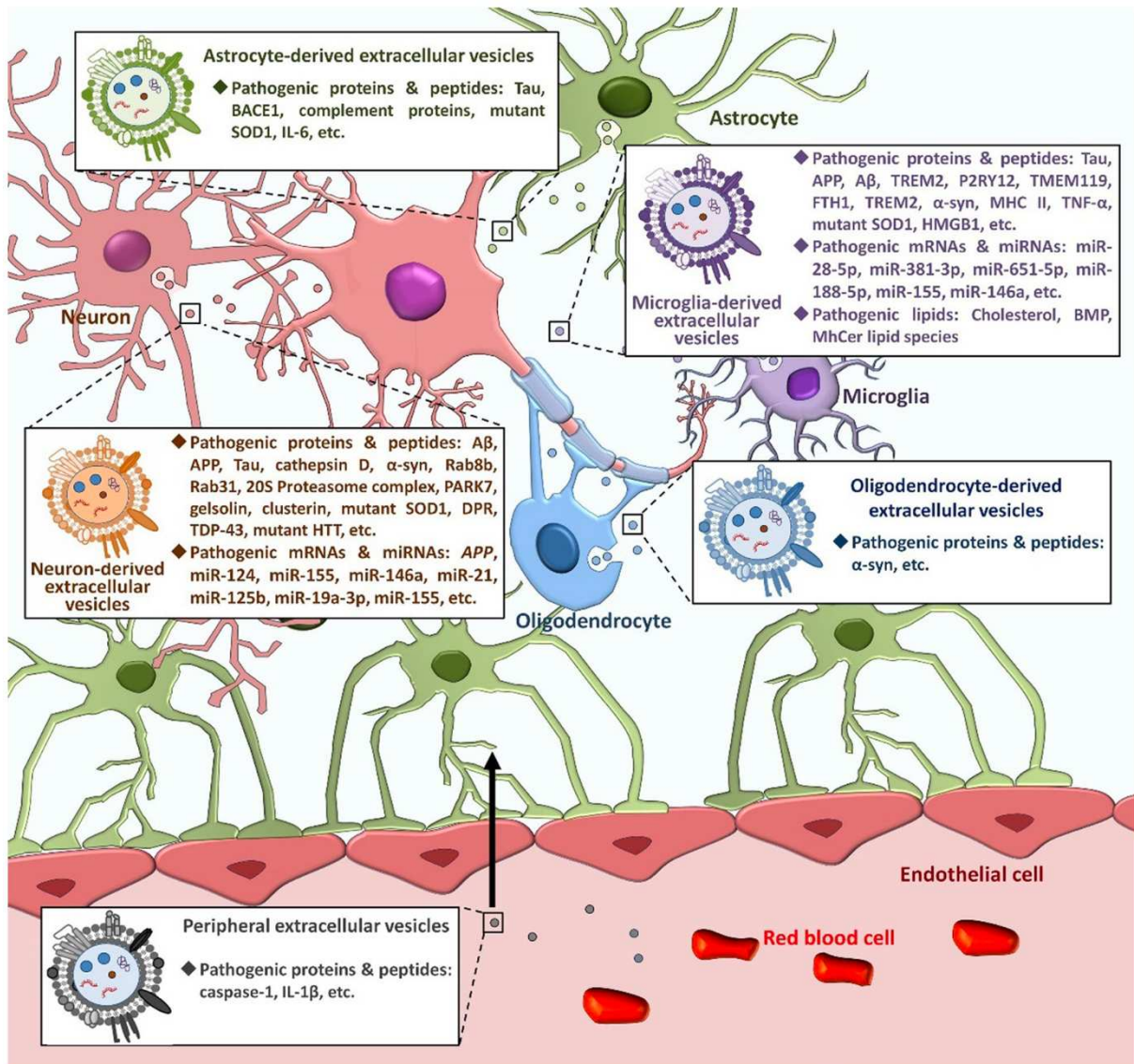


Figure 30 : EVs du SNC et neurodégénérescence

D'après Xia et al 2022.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Ce postulat se traduit par la possibilité de purifier des EVs représentatifs de l'état pathologique d'un individu à partir de tissus cérébraux (Hurwitz et al. 2018; Muraoka et al. 2020, 2021; Ruan et al. 2021; Su et al. 2021) ou de fluides biologiques comme le LCR, le plasma ou encore

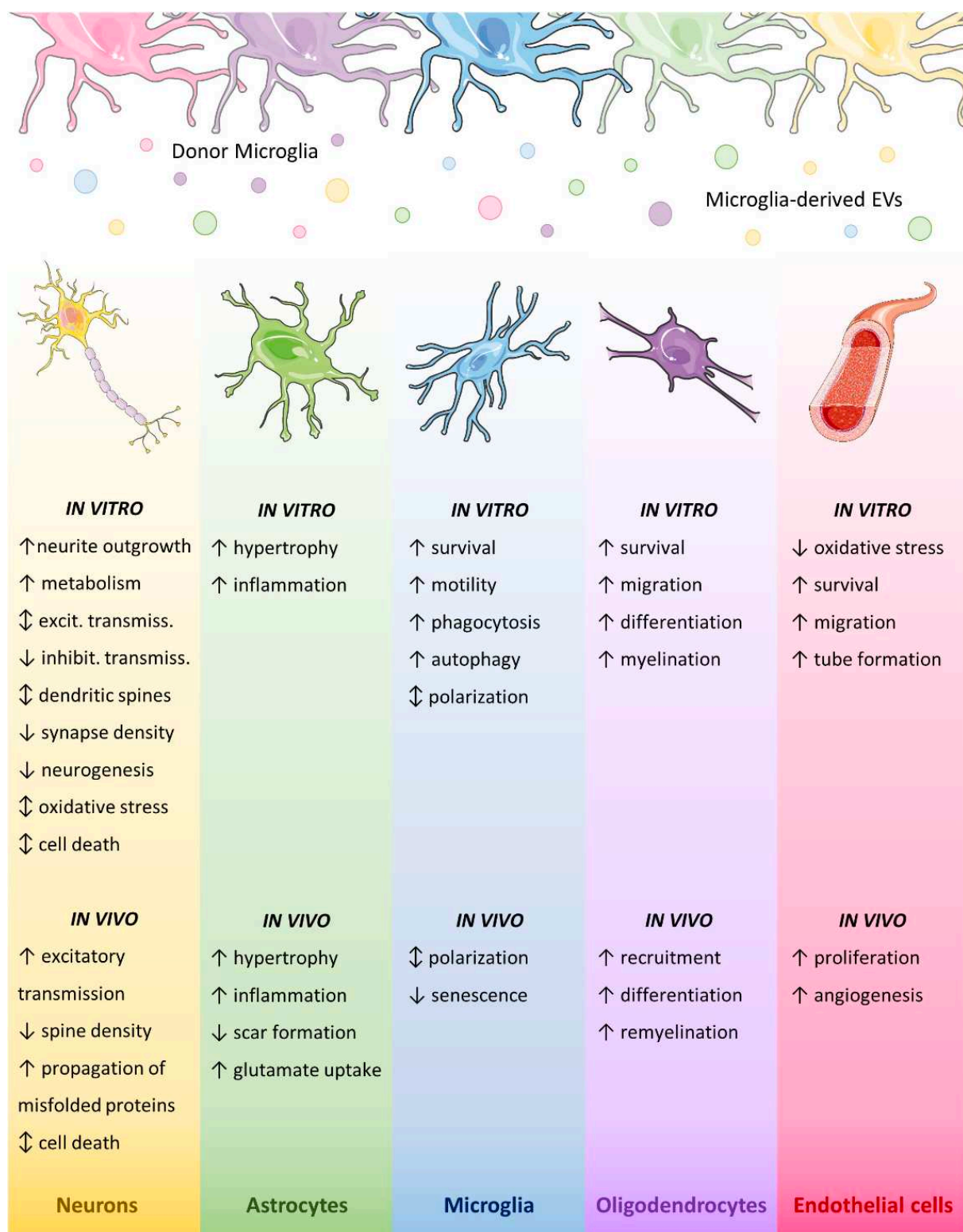


Figure 31 : Effets des EVs sécrétées par la microglie sur l'ensemble des cellules du SNC

D'après Gabrielli et al. 2022.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

les urines (Guo et al. 2020; de Menezes et al. 2022; Minakaki et al. 2018; Saman et al. 2012; Shi et al. 2014).

Néanmoins, même si la globalité du contenu de l'EVs est semblable entre les cellules issues d'un même environnement physiopathologique, il peut varier finement et contenir des molécules spécifiques d'un type cellulaire (Figure 30) (Xia et al. 2022). Mais surtout ces EVs auront des effets propres à la cellule qui les internalise comme cela a récemment été décrit pour les EVs issues de la microglie (Figure 31) (Gabrielli, Raffaele, et al. 2022).

La caractérisation du contenu des EVs issues de la microglie et plus largement du SNC mais aussi l'étude de leurs fonctions au sein de cellules réceptrices n'ont encore jamais été décrites dans la physiopathologie liées aux MNDs pédiatriques comme la MPS III et c'est dans ce contexte que s'intègre mes travaux de thèse.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE EXPÉRIMENTALE

PARTIE EXPÉRIMENTALE

1 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

Dans le syndrome de Sanfilippo, la surcharge lysosomale liée au défaut de dégradation des HSOs est généralisée dans toutes les cellules du corps humain. Au sein du SNC, nous avons mis en évidence que l'accumulation extracellulaire des HSOs isolés de patients MPS III n'induit pas une activation directe des neurones primaires. Or, la production de cytokines pro-inflammatoires par les neurones est possible suite à la transmission de messagers présents dans le milieu conditionné de culture de microglie activée par ces mêmes HSOs. Également, de nombreux travaux portant sur l'étude de maladies neurodégénératives adultes, ont démontré l'implication des EVs sécrétées par la microglie dans la transmission de protéines mal repliées et de contenu pro-inflammatoire.

Mon travail de thèse repose sur l'hypothèse que la propagation de la neuroinflammation dans le syndrome de Sanfilippo, pourrait être médiée par les EVs provenant de cellules cérébrales activées par les HSOs et plus particulièrement par la microglie. Ainsi, les EVs du SNC présenteraient un contenu spécifique au contexte physiopathologique de la MPS III et la transmission de leur cargo participerait à la progression de la neuropathologie.

De par son aspect fondamental, ce travail permettra de mieux comprendre la physiopathologie de la MPS III, étape essentielle au développement de traitements curatifs efficaces. D'autre part, la mise en évidence d'un chargement spécifique dans les EVs, poserait les fondements quant à l'utilisation des EVs comme biomarqueurs, permettant d'évaluer chez les patients la réponse thérapeutique aux thérapies cours de développement.

Afin de répondre à cette hypothèse, j'ai suivi deux objectifs de travail au cours desquels j'ai étudié deux types d'EVs issues de deux modèles de MPS III. Afin d'étudier dans quelle mesure la composante inflammatoire est à l'origine de la neuropathologie, j'ai choisi d'utiliser comme modèle *in vitro*, la lignée microgliale murine BV-2 activée suite au traitement par des GAGs de patients MPS III et dont les EVs ont été isolées à partir de surnageant de culture. Aussi, j'ai étudié des EVs *ex vivo* isolées à partir de tissus cérébraux du modèle murin MPS IIIB,

PARTIE EXPÉRIMENTALE

déficient en l'enzyme Naglu et âgé de 1 mois, 4 mois et 8 mois, représentatif des différents stades de l'évolution de la maladie.

Objectif 1 : évaluation de la composition moléculaire des EVs d'un modèle de microglie MPS

III. Par des analyses de contenu utilisant des approches de protéomique et de transcriptomique ainsi que des techniques ciblées, j'ai étudié la différence en messagers protéiques et en ARNs entre des EVs issues de microglie saine et MPS III. Avec l'aide d'analyses prédictives je me suis intéressée aux cibles potentielles que ces médiateurs pouvaient avoir dans une cellule réceptrice, tel que les neurones, à ces EVs.

Objectif 2 : étude de la réponse neuronale au message transmis par les EVs de modèles de

MPS III. Dans la continuité du premier objectif, j'ai étudié au niveau fonctionnel la réponse physiopathologique de neurones naïfs corticaux primaires murins lorsqu'ils sont exposés chroniquement à des EVs de MPS III. Par immunofluorescence, j'ai évalué les changements morphologiques adoptés par les neurones et particulièrement au niveau somato-dendritique. Par analyse transcriptomique de type RNAsequencing, j'ai étudié les modifications transcriptionnelles des neurones exposés à des EVs caractéristiques des différents stades de la maladie.

2 RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

2.1 ARTICLE “EXTRACELLULAR VESICLES FROM MUCOPOLYSACCHARIDOSIS TYPE III MICROGLIA IMPAIR NEURITE GROWTH”

2.1.1 Résultats soumis à la publication

Les travaux précédents de l'équipe, ont démontré que la microglie joue un rôle central dans l'initiation de la neuroinflammation dans le cortex de la souris MPS IIIB, et ce dès 10 jours. L'accumulation rapide et progressive des HSOs dans le milieu extracellulaire active massivement la microglie qui exprime fortement le récepteur TLR4 et sécrète en réponse un cocktail de cytokines pro-inflammatoires indispensables au recrutement de partenaires immunitaires et à la résolution de l'inflammation. Or, en l'absence de résolution de l'accumulation des HSOs, la neuroinflammation va se généraliser à l'ensemble des structures cérébrales et devenir chronique (Ausseil et al. 2008; Puy et al. 2018), elle persiste tout au long de la vie de la souris MPS IIIB et conduira à la neurodégénérescence. Dans la MPS IIIB et plus largement dans la MPS III, l'induction du phénomène de neuroinflammation est bien décrite, mais il reste des interrogations concernant sa propagation et l'implication de la microglie mais aussi d'autres acteurs dans ce mécanisme.

Comme exposé dans la partie précédente, nous émettons l'hypothèse que la propagation de la neuroinflammation impliquerait les EVs sécrétées par la microglie activée par les HSOs pathogéniques. Dans ce premier article scientifique intitulé « *Extracellular vesicles from mucopolysaccharidosis type III microglia impair neurite growth* » – soumis au journal « *Journal of Neuroinflammation* » le 25 mars 2024 et déposé sur *BioRxiv* – j'ai étudié cette hypothèse.

Afin d'étudier le contenu des EVs de microglie nous avons validé et utilisé un système cellulaire *in vitro* simple, nous permettant d'isoler une grande quantité d'EVs pures et de manière reproductible. J'ai ainsi traité la lignée de microglie murine BV-2 – largement utilisée par la communauté scientifique puisqu'elle répond fortement au LPS – avec des GAGs purifiés

PARTIE EXPÉRIMENTALE

biochimiquement à partir d'urine de patients MPS III. Ces GAGs totaux présentent une majorité d'HSs partiellement dégradés qui permettent l'activation de la microglie BV-2.

Les EVs sont récoltées directement à partir du surnageant de culture après traitement par la technique d'ultracentrifugation différentielle (dUC) que j'ai mise en place dans le laboratoire puis validée avec différentes approches selon les recommandations du MISEV (Théry et al. 2018).

Aussi cette méthode de purification et ce modèle cellulaire nous ont permis de nous intéresser aux deux grandes populations d'EVs par leur isolation à l'issue de deux ultracentrifugations distinctes. Les petites EVs enrichies en exosomes, plus légers sont obtenues après centrifugation à 100.000 g alors que les grandes EVs enrichies en ectosomes, plus denses sont obtenues après centrifugation à 12.000 g. Ces derniers sont faiblement représentés et nécessitent donc des volumes importants de milieu de culture conditionné pour leur étude.

Par des techniques omiques, j'ai démontré dans ce travail, qu'en considérant l'effet de traitement par les GAGs sur les EVs, la différence de contenu en protéines et en miRNAs est similaire entre les deux populations de petites et grandes EVs. Cependant l'étude des EVs par technique de Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) a démontré qu'il semblait y avoir une tendance à la diminution de la sécrétion de petites EVs et inversement, une augmentation de la libération de grandes EVs par la microglie traitée avec des GAGs de patients MPS III.

L'analyse protéomique par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) a révélé que les EVs sécrétés par les BV-2 traitées par des GAGs MPS III (MPS III-EVs) transportent un contenu pro-inflammatoire. Également, de manière intéressante ces MPS III-EVs sont dépourvues en molécules trophiques impliquées dans le neurodéveloppement.

En accord avec les résultats de protéomique, le séquençage des petits ARNs (miRSeq) a montré l'enrichissement des MPS III-EVs en 4 miRNAs ayant pour cible des mRNAs (dont ils vont réprimer la traduction) également impliqués dans la neuroinflammation et le neurodéveloppement.

Finalement, par microscopie à fluorescence j'ai pu montrer que les MPS III-EVs et leur contenu pathologique vont avoir un effet délétère sur les neurones corticaux murins purifiés

PARTIE EXPÉRIMENTALE

à partir de souriceaux sauvages, grâce à une technique de culture primaire que j'ai également mise au point au sein de notre équipe.

Grâce à au logiciel Imaris qui allie le traitement d'images en mosaïque et l'analyse multiparamétrique des neurones par l'intelligence artificielle, j'ai pu montrer que les MPS III-EVs conduisent à une diminution de l'aire représentée par les prolongements neuronaux et plus spécifiquement des dendrites qui sont raccourcies. De plus, j'ai pu quantifier une désorganisation de l'arbre dendritique, une perte de la densité des épines dendritiques et une augmentation de la surface du soma du neurone.

Ce travail décrit pour la première fois dans le syndrome de Sanfilippo – et plus largement dans une maladie neurodégénérative pédiatrique – des EVs de microglie pro-inflammatoire activée par le métabolite accumulé dans la MPS III et présentant un contenu qui est aussi bien inflammatoire que dépourvu en molécules neurotrophiques. Mais aussi le rôle des EVs dans l'induction d'altérations du réseau neuronal partageant les mêmes caractéristiques que celles décrites dans les modèles *in vivo* MPS III (Bigger et al. 2018; Hamano et al. 2008; Harm et al. 2021; Hocquemiller et al. 2010; Pará et al. 2021), et qui pourraient être sous-jacents d'une neurotransmission défectueuse et *in fine* d'une neurodégénérescence également décrites (Pará et al. 2021, 2020).

Cette étude a permis de valider *in vitro* notre hypothèse et ouvre la voie à l'étude de la réponse fonctionnelle du neurone exposé à des EVs pathologiques provenant du modèle murin de MPS IIIB.

Title page

Extracellular vesicles from mucopolysaccharidosis type III microglia impair neurite growth

Running title

MPSIII EVs impair neurite growth

Chloé Dias¹, Nissrine Ballout¹, Guillaume Morla¹, Katia Alileche¹, Christophe Santiago¹, Chiara Ida Guerrero², Adeline Chaubet¹, Jerome Ausseil^{1,3}, Stephanie Trudel^{1,3}

1 Toulouse Institute for Infectious and Inflammatory Diseases (Infinity), University of Toulouse, Inserm U1291, CNRS U5051, Toulouse, France

2 Université Paris Cité, Necker Proteomics Platform, Structure Fédérative de Recherche Necker, INSERM US24/CNRS UAR3633, 75015 Paris, France

3 Laboratoire de Biochimie, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Toulouse, France

chloe.dias@inserm.fr : 0000-0003-0461-0116

nissrine.ballout@inserm.fr : 0000-0001-8301-3170

guillaume.morla@interieur.gouv.fr : 0009-0001-0119-7090

katia.alileche@inserm.fr : 0009-0002-4898-4021

christophe.santiago@inserm.fr : 0009-0007-4994-5127

chiara.guerrera@inserm.fr : 0000-0002-4832-6793

adeline.chaubet@inserm.fr : 0009-0003-9326-0935

jerome.ausseil@inserm.fr : 0000-0002-3059-9777

stephanie.trudel-ausseil@inserm.fr : 0000-0003-1202-415X

Corresponding Authors:

Stephanie Trudel and Chloé Dias

Word count : 14681

Declarations

Data availability statement

The mass spectrometry proteomics data that support the findings of this study are openly available in ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository at <http://www.ebi.ac.uk/pride>, reference no. PXD050768. The RNA sequencing data generated in this study are openly available at Sequence Read Archive website, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject>, accession no. PRJNA1090840.

Funding statement

This work was funded by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and the Vaincre les Maladies Lysosomales (VML) charity.

Ethics approval statement

Mouse experiments were performed by authorized investigators in accordance with French regulations (87/848) and the European Union Council Directive (2010/63/EU) and were approved by the government-accredited animal care and use committee (*Comité d’Ethique de l’US 006/CREFRE* (Toulouse, France); reference number: PI-U1291-JA-37).

Patient consent statement

In line with the French Public Health Code (*Code de la Santé Publique*, article L1211-2), the parents and/or their legal guardians of under-18 MPSIII patients and of under-18 healthy control volunteers stated that they did not object to the use of urine samples for biomedical research.

Conflict of interest statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

Author contributions

CD performed, analyzed, and interpreted the majority of the experiments, conducted the bioinformatic analysis, drafted the manuscript and created the figures. NB carried out the animal experiments, validated the in vitro model, helped with the analysis and interpretation of the data, and created the figures. GM did the isolation of EVs for RNA sequencing and performed and analyzed miRNA experiments. KA performed and analyzed NTA experiments. CS isolated and quantified GAGs from collected urines. CG performed mass spectrometry data

PARTIE EXPÉRIMENTALE

analysis and bioinformatics. AC performed RNA sequencing experiments. JA raised the scientific question, conceived the study, and revised the manuscript. ST designed and supervised the study, analyzed, and interpreted the data and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We particularly thank our collaborators Alexey V. Pshezhetsky and Mahsa Taherzadeh from CHU Sainte-Justine, Montreal, for sharing their RNAseq dataset. We thank Elsa Suberbielle and Benjamin Schmitt for technical assistance in the isolation of murine primary neurons; Evert Hannapple and Emily Clement for their help in setting up the NTA experiments.

We thank Kévin Roger and Cerina Chhuon at the Necker Proteomics Platform, Paris, for performing proteomic experiments, bioinformatic and statistical analysis; Margot Zahm and Yann Aubert at Genomic and Transcriptomic platform of Infinity for RNAseq bioinformatic and statistical analysis. We also thank for their technical assistance Sophie Allart, Simon Lachambre, and Lhorane Lobjois at the Cellular imaging core facility ; Stéphanie Balor and Vanessa Soldan at the Multiscale Electron Microscopy core facility connected to 'Toulouse Réseau Imagerie' network ; and all the staff from Service Zootechnie Expérimentation Purpan animal core facility.

Abstract

In the neurodegenerative mucopolysaccharidosis type III (MPSIII), accumulation of abnormal glycosaminoglycans (GAGs) induces severe neuroinflammation by triggering the microglial pro-inflammatory cytokines production via a TLR4-dependent pathway. But the extent of the microglia contribution to the MPSIII neuropathology remains unclear. Extracellular vesicles (EVs) mediate intercellular communication and are known to participate in the pathogenesis of adult neurodegenerative diseases. However, characterization of the molecular profiles of EVs released by MPSIII microglia and their effects on neuronal functions have not been described. Here, we isolated EVs secreted by the BV-2 microglial cells after treatment with GAGs purified from urines of MPSIII patients. Proteomics and RNA sequencing analysis of MPSIII-EVs revealed a specific content involved in neuroinflammation and neurodevelopment pathways. Treatment of cortical neurons with MPSIII-EVs induced a disease-associated signature with somato-dendritic compartment alterations. This study is the first to show that MPSIII-EVs can propagate neuroinflammation, deprive neurons of neurodevelopmental factors and deliver a specific molecular message to surrounding naive cells. This work provides a framework for further studies of biomarkers to evaluate efficiency of emerging therapies.

Keywords

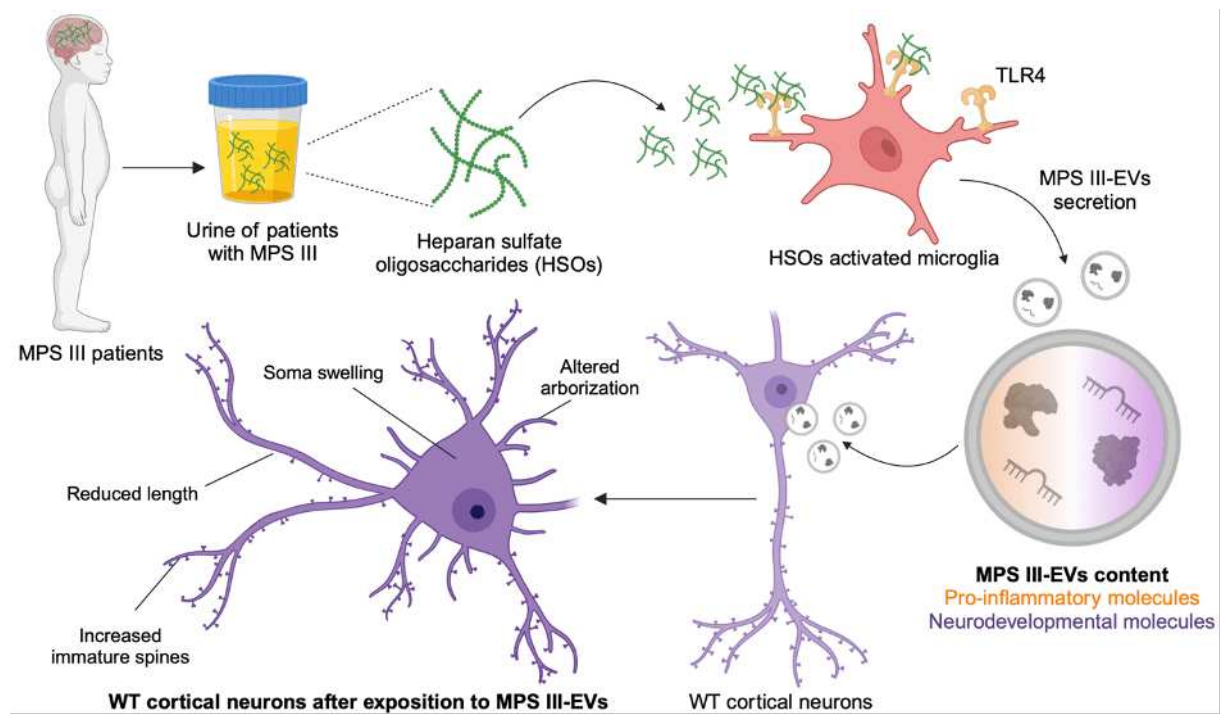
Mucopolysaccharidosis, Microglia, Neuroinflammation, Neurodegeneration, Extracellular vesicle, Heparan sulfate

Table of Contents Entry

Main points

- MPS III microglia-derived EVs carry a cargo of molecules involved in the inflammatory response and neuronal development.
- Cortical neurons exposed to MPS III-EVs show impaired dendritic arborization and a higher number of immature dendritic spines.

Graphical abstract



1 Introduction

Mucopolysaccharidosis type III (MPS III, also known as Sanfilippo syndrome) is a lysosomal storage disease (LSD) caused by the specific inability to degrade the glycosaminoglycan (GAG) heparan sulfate (HS) – an essential component of the cell surface and the extracellular matrix. There are four subtypes of MPS III (A, B, C and D), depending on the mutated gene and the resulting enzyme deficiency (1). There are no disease-modifying treatments for this rare but ultimately fatal disorder (incidence: ~1 per 70.000 live births) (2). A number of innovative therapies for MPS III are being studied, and some reaching the mid-to-late stages of clinical development (3), like gene therapy in MPSIIIB patients (4,5).

The partially degraded heparan sulfate oligosaccharides (HSOs) accumulate not only in the lysosomal environment but also in other subcellular locations, the extracellular space, tissues, and fluids (6) (including urine (7–9)). In MPS III, the accumulation of highly sulfated and acetylated HSOs in brain tissues causes neuronal dysfunction and neuronal death; these ultimately lead to neuropsychiatric problems, developmental delays, childhood dementia, blindness, and death in the second decade of life (10). Interestingly, HSO accumulation is associated with the progressive aggregation of A β , tau, α -synuclein, and prion proteins in brain tissue in young children with MPS III (11–13). This reflects the pathophysiology of adult neurodegenerative diseases because heparan-sulfate proteoglycans (HSPGs) and HS are also found in the amyloid plaques in Alzheimer's disease, Down's syndrome, and prion diseases (14). Moreover, a link between MPS III and Parkinson's disease was suggested when mutations causing the former were linked to a higher risk of developing the latter (15). Even though adult neurodegenerative diseases and MPS III have different molecular and cellular pathogenic mechanisms, chronic neuroinflammation is a hallmark of both conditions.

We have demonstrated previously that the progressive accumulation of abnormal HSOs leads to the Toll-like receptor (TLR) 4-dependent activation of microglia through the MyD88 adaptor and the NF- κ B pathway (9,16), which in turn results in neurodegeneration. Strong activation of resident microglia and the secretion of high levels of inflammatory cytokines were subsequently described early in the course of disease in canine and murine models of different subtypes of MPS III (9,17–21). Higher expression levels of proteins related to immunity, macrophage function and oxidative stress have been reported in the animal model's brain tissues and in human cerebrospinal fluid and plasma samples (22–24). Although microglia-mediated inflammation is a key player in the pathogenesis of progressive neurological diseases,

PARTIE EXPÉRIMENTALE

the mechanisms by which microglia influence the onset and propagation of neuroinflammation and neurodegeneration remain unclear.

Several converging lines of evidence indicate that extracellular vesicles (EVs) secreted by microglia have an essential role in not only the propagation of misfolded proteins such as tau and α -synuclein (25–27) but also the transmission of inflammation, the impairment of neuronal functions, and the promotion of neurodegeneration (28–31). EVs are lipid-bilayer-delimited particles released by a variety of cells, including neurons, microglia and astrocytes and which carry their specific cargos of proteins, RNAs and lipids over long distances. EV biogenesis involves direct, outward budding from the plasma membrane (forming large, ectosome-like EVs with a diameter >150 nm) or by inward invagination of the endosomal membrane and fusion of the multivesicular body with the plasma membrane (forming small, exosome-like EVs with a diameter of 30-150 nm) (32,33). The contribution of EVs to the pathophysiology of MPS III or any neuropathic lysosomal storage diseases has not previously been characterized.

In the present study, we looked at whether or not large and small MPS III microglia-derived EVs are involved in the spreading of neuroinflammation and the functional impairment of cortical neurons. To address this question, we isolated and characterized EVs released by microglia murine cell line treated with GAGs (enriched in HSOs) extracted from the urine of children with MPS III. Omics analyses at the protein and RNA levels revealed that these EVs carried a characteristic cargo to recipient cells in central nervous system (CNS) and were involved in the inflammatory response and neuronal development. After exposing primary cortical neurons isolated from wild-type (WT) pups to MPS III microglia-derived EVs, we used neurite imaging assays to show that the morphology of the somatodendritic compartment was impaired.

2 Methods

2.1 Patients, urine collection, and GAG purification.

Patients with MPS III

All six patients (aged from 6 to 28 years) had a diagnosis of MPS III (A, B or C). They all presented with mental retardation and high concentrations of GAGs in the urine and have no curative treatments. In line with the French Public Health Code (*Code de la Santé Publique*, article L1211-2) approval by an investigational review board was neither required nor sought. However, the parents of under-18 MPSIII patients and/or their legal guardians stated that they did not object to the use of urine samples for biomedical research.

Collection of urine samples

Control urine samples from healthy children were obtained from our institution's biological resource center (Toulouse BioRessources, Toulouse, France). Samples of urine from patients with MPS III patients and from age-matched unaffected donors were collected under sterile conditions and immediately stored at -20°C. The characteristics of patients and controls are described in Table 1.

Isolation of GAGs from urine samples

GAGs were extracted from urine samples provided by patients with MPS III and by age-matched healthy children using biochemical procedures described previously (9,55). Briefly, urine samples were acidified to pH 5.5 with acetic acid and then centrifuged. All the centrifugation steps were performed at 4°C, 2,400 x g for 10 min

The supernatants were incubated with cetylpyridinium chloride (200 µL 5% w/v) for 16h at 4°C and then centrifuged. After successive washes with ethanol solutions saturated with sodium chloride, ethanol, and ether, the pellets were dried and resuspended in 0.6 M NaCl at 4°C for 3h. After centrifugation, supernatants containing solubilized GAGs were precipitated with ethanol for 16h at 4°C. The pellets were washed as described above, resuspended in 0.6 M NaCl, and used as GAG fractions.

2.2 Microglial cell line culture and treatment with GAGs

Cell culture

The BV-2 murine microglial cell line was maintained at a density of 0.05×10^6 cells/ml in BV-

PARTIE EXPÉRIMENTALE

2 complete medium (RPMI-1640-Glutamax (RPMI) medium supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 2 mM glutamine, 1 U/mL penicillin and 1 µg/mL streptomycin) at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. The BV-2 cells were used from passages 5 to 15 and were negative for mycoplasma.

Treatment with GAGs

GAG fractions from patients with MPS III and from controls were pooled, as the same effects were seen when cells were exposed to fractions from individual patients (as shown previously) (16). GAGs were used at the optimal concentration of 5 µg/ml, as demonstrated previously (9,16).

To check the proinflammatory BV-2 cell response to GAG treatment, cells were seeded for flow cytometry and RT-qPCR assays at a density of 0.1×10^6 cells/well or 0.15×10^6 cells/well, respectively, in a 6-well plate for 24h before treatment with 5 µg/ml GAGs, as described previously (9,16). RNA was extracted 24h after treatment, and flow cytometry experiments were performed 48h after treatment.

For EV isolation, EV-depleted FBS medium was obtained by the ultracentrifugation of BV-2 complete medium supplemented with 20% FBS for 18h at $100.000 \times g$ and 4°C in 38.5 mL polyallomer Ultra Clear ultracentrifuge tubes (Beckman Coulter), using an Optima XPN-80 ultracentrifuge and an SW 32 Ti Rotor (Beckman Coulter) at maximum acceleration and brake. Cells were seeded 24h before GAG treatment at a density of 0.25×10^6 cells/ml in 6 x T175 flasks per condition containing 15 mL of EV-depleted medium (5% EV-depleted FBS). Cells were treated for 24h before conditioned medium collection in fresh EV-depleted medium containing GAGs extracted from urine samples of patients with MPS III (MPS III, 5 µg/ml) or age-matched healthy donors (WT, the same volume as in the MPS condition) or with 0.6 M NaCl (CTL, the same volume as in the MPS condition) and filtered on a 0.4 µm filter.

2.3 Isolation and characterization of EVs from conditioned media

All the relevant data from our experiments were sent to the EV-TRACK knowledgebase (EV-TRACK ID: EV231009) (56).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Isolation of EVs

Suspensions were centrifuged at 4°C in 50 mL centrifuge tubes (Falcon) with a 5810R centrifuge and an A-4-81 rotor (Eppendorf) and in 38.5 mL polyallomer Ultra Clear ultracentrifuge tubes (Beckman Coulter) with an Optima XPN-80 ultracentrifuge and an SW 32 Ti Rotor (Beckman Coulter) at maximum acceleration and brake.

Procedures were adapted from references (57–59), according to International Society for Extracellular Vesicles guidelines (34) (see Fig. 1A for a detailed diagram of the experiment scheme for ultracentrifugation). To pellet the cells, conditioned medium was centrifuged at $300 \times g$ for 10 min at 4°C (yielding the 0.3K pellet). Supernatant was centrifuged at $2,000 \times g$ for 20 min at 4°C (yielding the 2K pellet), transferred to ultracentrifugation tubes, and ultracentrifuged first for 30 min at $12,000 \times g$ (yielding the 12k pellet) and then for 70 min at $100,000 \times g$ (yielding the 100k pellet). The 12k and 100k pellets were washed in 35 mL of PBS and recentrifuged at the same speed before being resuspended in the appropriate buffer for the downstream experiment (see below). For neuron treatments, the 12,000 x g ultracentrifugation and washing steps were omitted.

Cells recovered from the 0.3K pellet were pooled with cells detached from the flask by incubation at room temperature in PBS-EDTA (Gibco) and counted in a Malassez cell. Cell viability was assessed in a 0.4% Trypan Blue exclusion assay (Life Technologies). All EV preparations used were cryopreserved at -80°C in sterile (0.22 μm filtered) PBS containing 25 mM trehalose (60,61). The EV concentration per mL was quantified by NTA.

NTA

The size distribution and particle concentrations of EV preparations were analyzed using a NanoSight NS300 NTA system (Malvern Panalytical) equipped with a blue laser (488 nm, 70 mW), a CMOS camera (Hamamatsu Photonics), and a syringe pump. EV preparations were resuspended in 100 μL of sterile, filtered PBS containing 25 mM trehalose and stored at -80°C before the NTA experiment. Next, the EV preparations were diluted 1:1000 in filtered PBS for the measurement of 20–100 particles/frame under all conditions, injected at a speed of 30 arbitrary units into the measurement chamber. The EV flow was recorded during triplicate measurements of 60 s each, at 20°C. The data acquisition settings were the same in all experiments, with the camera level set to 9-11, the screen gain set to 7, and the threshold set to 3-4. Data from at least three different experiments were analyzed with NTA 3.2 software (Malvern Panalytical).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

TEM

EV preparations were resuspended in 100 mM Tris-HCl and stored at 4°C for 24h at most before the TEM experiment. The EV samples were prepared for TEM in a conventional negative staining procedure. Briefly, 10 μ L of EV samples were absorbed for 2 min on formvar-carbon-coated copper grids previously ionized using the PELCO easyGlow™ Glow Discharge Cleaning System (Ted Pella Inc., Redding, CA, USA). Preparations were then blotted and negatively stained with 1% uranyl acetate for 1 min. Grids were examined using an 80 kV JEM-1400 electron microscope (JEOL Inc., Peabody, MA, USA), and images were acquired with a digital camera (Gatan Orius, Gatan Inc., Pleasanton, CA, USA).

To analyze the morphology of EVs using cryo-TEM, 3 μ L of the EV sample was first deposited onto a glow-discharged 200-mesh lacey carbon grid. Prior to freezing, the grid was loaded into the thermostatic chamber of a Leica EM-GP automatic plunge freezer at 20°C and 95% humidity. Excess solution was blotted from the grid for 1–2 s with Whatman n°1 filter paper, and the grid was immediately flash-frozen in liquid ethane at –185°C. Specimens were then transferred into a Gatan 626 cryo-holder. Cryo-EM was carried out using a Jeol 2100 microscope equipped with a LaB6 cathode operating at 200 kV under low-dose conditions. Images were acquired using SerialEM software (Mastronarde, 2005), with the defocus ranging from 600 to 1000 nm, using a Gatan US4000 CCD camera. This device was placed at the end of a GIF quantum energy filter (Gatan Inc. Berwyn, PA, USA) operating in zero-energy-loss mode, with a slit width of 25 eV. Images were recorded at a magnification corresponding to a calibrated pixel size of 0.87 Å.

2.4 Flow cytometry analysis

After GAG treatment, cells were detached and resuspended in culture supernatant. The total resuspension volume was aliquoted into two tubes (for stained cells and unstained control cells). After the cells had been recovered by centrifugation at $400 \times g$ for 5 min at 4°C, they were washed in PBS with 5% FBS and recentrifuged. Cell surface markers were labelled with fluorophore-labeled primary antibodies at appropriate dilutions (see table 2) in PBS with 5% FBS during 20 min at 4°C. Cells were washed in PBS with 5% FBS, centrifuged at $400 \times g$ for 5 min at 4 °C, and resuspended in 300 μ L of PBS before flow cytometry acquisitions. All the conditions were measured on a four-laser custom LSR II-Fortessa flow cytometer (Beckton Dickson). Controls were performed for each experimental sample, including unstained cells and manual compensations during measurements. The acquisition was gated

PARTIE EXPÉRIMENTALE

using FlowJo software (BD). The fluorescence was quantified as the mean fluorescence intensity (MFI) ratio between stained and unstained cells. The threshold for statistically significant differences in the MFI ratio was $p < 0.05$ in an unpaired, ordinary, one-way ANOVA of data from at least four different experiments.

2.5 Western blotting and mass spectrometry proteomic analysis

Protein extraction

EV preparations and 4×10^6 BV2 cells were lysed in RIPA lysis buffer 1X (Sigma) supplemented with protease inhibitor cocktail (Roche) for 20 min on ice, centrifuged at $18,500 \times g$ for 15 min, and stored at -20°C before western blotting experiments or at -80°C before mass spectrometry proteomic experiments.

Western blotting

The protein concentration in cell lysates was assayed using a BCA gold kit (Life Technologies). Proteins were denatured (or not) in Laemmli buffer under reducing conditions (5% β -mercaptoethanol) and then heated for 5 min at 95°C . 5 μg of proteins from cell lysate or a quarter of the EV protein extract were loaded onto 4–15% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels (Biorad) in Tris-glycine buffer for electrophoresis at constant amperage (20 mA per gel) for 1h. Proteins were electrotransferred onto nitrocellulose membranes using the trans-blot turbo transfer system (constant voltage: 25V, maximum amperage: 1 A; 30 min, Biorad) and membranes were blocked with Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 (TBST), 5% milk, or bovine serum albumin (BSA) for 2h at room temperature. Membranes were then incubated with primary antibodies in TBST containing 5% milk or BSA overnight at 4°C , followed by incubation with secondary antibodies for 1h at room temperature (see Table 3 for antibody dilutions and blocking conditions). Membranes were washed five times in TBST for 5 min after each incubation step and visualized using the Chemidoc XRS+ Imaging System (LI-COR Biosciences). None of the membrane was stripped.

Protein digestion for mass spectrometry

S-Trap™ microspin column (Protifi, Hutington, USA) digestion was performed on 5-10 μg of small or large EV samples, according to the manufacturer's instructions. Briefly, samples were supplemented with 20% SDS to a final concentration of 5%, reduced with 20 mM Tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride and alkylated with 50 mM chloroacetamide for 5 min at 95°C . Aqueous phosphoric acid was then added to a final concentration of 2.5%, followed by

PARTIE EXPÉRIMENTALE

S-Trap binding buffer (90% aqueous methanol, 100 mM TEAB, pH 7.1). Mixtures were then loaded on S-Trap columns, which were washed five times for thorough SDS elimination. Samples were digested with 1.5 µg of trypsin (Promega) at 47°C for 2h. After elution, peptides were vacuum dried and resuspended in 2% acetonitrile/0.1% formic acid in HPLC-grade water, prior to MS analysis.

Nano LC-MS/MS

Tryptic peptides were resuspended in 20 µL, and a volume of 1 µL (for small EVs) or 4 µL (for large EVs) was injected on a nanoelute HPLC system coupled to a timsTOF Pro mass spectrometer (both from Bruker Daltonics, Germany). HPLC separation (solvent A: 0.1% formic acid in water, 2% acetonitrile; solvent B: 0.1% formic acid in acetonitrile) was carried out at 250 nL/min, using a packed emitter column (C18, 25 cm×75 µm 1.6 µm) (Ion Optics, Australia) using a 40 min gradient elution (2 to 11% solvent B for 19 min; 11 to 16% for 7 min; 16% to 25% for 4 min; 25% to 80% for 3 min, and finally 80% for 7 min to wash the column). MS data were acquired using the parallel accumulation serial fragmentation (PASEF) acquisition method in DDA mode. The measurements were carried out over the m/z range from 100 to 1700 Th. The ion mobility value ranged from 0.85 to 1.3 V s/cm² (1/k0). The total cycle time was set to 1.17 s, and the number of PASEF MS/MS scans was set to 10.

Data analysis

Data were analyzed using MaxQuant version 2.0.1.0 and searched with Andromeda search engine against the UniProtKB/Swiss-Prot *Mus musculus* dataset (release 02-2021, 17063 entries). To search for parent mass and fragment ions, the mass deviation was set respectively to 10 ppm and 40 ppm for the main search. The minimum peptide length was set to seven amino acids and strict specificity for trypsin cleavage was required, allowing up to two missed cleavage sites. Carbamidomethylation (Cys) was set as a fixed modification, whereas oxidation (Met) and N-term acetylation (Prot N-term) were set as variable modifications. The FDRs at the peptide and protein level were set to 1%. Scores were calculated in MaxQuant, as described previously (62). The reverse and common contaminant hits were removed from MaxQuant output as well as the protein only identified by site. Proteins were quantified according to the MaxQuant label-free algorithm using LFQ intensities, and protein were quantified using at least one peptide per protein. Lastly, matching between runs was allowed.

Statistical and bioinformatic analysis, including hierarchical clustering, heatmap and principal component analysis, were performed with Perseus software (version 1.6.14.0)(63).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

For this purpose, three independent replicates in each of the six groups (100K_Ctrl, 100K_MPS, 100K_WT, 12K_Ctrl, 12K_MPS, 12K_WT) were used for statistical comparisons. The protein intensities were transformed in log₂, and proteins identified in at least three replicates in at least one group were tested to statistically (volcano plot, FDR=0.05 and S₀=0.5) after imputation of the missing values by a Gaussian distribution of random numbers with a standard deviation of 30% relative to the standard deviation of the measured values and 2.5 standard deviation downshift of the mean. Two-tailed pairwise Student's t-test was performed in Perseus to compare the 100K and the 12K conditions (S₀ = 0.1 ; permutation-based FDR = 5%, 9 independent replicates in each condition). To study the global differences that were present in one of the 6 groups, 1-way ANOVA was performed in Perseus (S₀ = 0.1 ; FDR = 5%, 3 independent replicates in each condition). Then, significant proteins were filtered and log₂ LFQ intensities were z-scored before heatmap hierarchical clustering analysis.

2.6 RT-qPCR and small RNA sequencing

RNA extraction

For RT-qPCR experiments of mRNAs, total RNAs from BV-2 cells were extracted using TRIzol reagent (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. The purified RNAs were eluted into 30 µL nuclease-free water, quantified using a Nanoview spectrophotometer with a µCuvette (Eppendorf), and stored at -80°C until analysis.

For RNA sequencing and RTqPCR of miRNAs, total RNAs from EV preparations and 0.5×10^6 cells were extracted using the miRNeasy Tissue/Cells Advanced Micro Kit (QIAGEN), according to the manufacturer's instructions. The purified RNAs were eluted into 20 µL nuclease-free water, quantified using Nanodrop 2000 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific), and stored at -80°C until analysis.

RT-qPCRs of mRNA and miRNA

mRNAs were reverse-transcribed using an iScript cDNA synthesis Kit (Biorad), according to the manufacturer's instructions. RT-qPCRs were performed in a thermocycler for 5 min at 25°C, 20 min at 46°C and then 1 min at 95°C to inactivate the reaction. The qPCR primers for genes of interest (Table 4) were used at a concentration of 1 µM and a 1:1 forward:reverse ratio. Amplification of first-strand cDNAs was performed on the LightCycler 480 Real-Time PCR system (Roche), using Light cycler 480 SYBR Green I Master mix 2X (Roche) in 96-well plates at 95°C for 10 min, 45 cycles of 95°C for 10 s, and 72°C for 30 s, followed by a

PARTIE EXPÉRIMENTALE

melting curve analysis at 65–95°C. Gene expression level differences were considered to be statistically significant if they had a p-value <0.05 in an unpaired t-test. Two to five independent replicates were analyzed in technical duplicates.

For miRNAs, RT and amplification was performed using miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit (QIAGEN), according to the manufacturer's instructions. For RT, a synthetic RT spike-in internal control (UniSp6) was added, and reactions were incubated in a thermocycler for 60 min at 42 °C and then 5 min at 95 °C to inactivate the reaction. Amplification of first-strand cDNAs was performed on a LightCycler 480 Real-Time PCR system (Roche) in 96-well plates at 95 °C for 2 min and 45 cycles of 95 °C for 10 s and 56 °C for 60 s, followed by melting curve analysis at 60–95 °C. The expression levels of the endogenous miRNAs and spike-ins were examined using the miRCURY LNA miRNA PCR Assay (QIAGEN), using primers designed for the *Homo sapiens* genome and validated for the *Mus musculus* genome (Table 4). Gene expression–level differences were considered to be as statistically significant if they had a p-value <0.05 in an ordinary one-way ANOVA. Four independent replicates were analyzed in technical duplicates.

For both qPCR analyses, additional controls were performed for each cDNA amplification: the assessment of amplification efficiency, and the detection of possible primer dimerization via an analysis of dissociation curves. The cycle threshold (Ct) value was determined as the number of PCR cycles at which specific amplification of the target sequence occurred. A Ct >38 were considered to be the background signal. The amount of cDNA was expressed as ΔCt , the difference between the Ct measured for the amplification of the examined cDNA and the reference Ct measured for the amplification of ARP0 or miR-103a-3p cDNAs. The fold change was expressed as $\Delta\Delta Ct$, which is the difference between the ΔCt in the treated condition and the ΔCt of the control condition.

Library preparation and RNA sequencing

RNA was quantified using the Qubit RNA HS Assay Kit on the Qubit Fluorometer (Invitrogen). The quality was evaluated on an Agilent 4150 TapeStation with the High Sensibility RNA ScreenTape kit (Agilent). Each sample's libraries were built with the QIAseq miRNA UDI Library Kit (QIAGEN), according to the manufacturer's instructions and quantified using the Qubit 1X dsDNA HS kit on the Qubit Fluorometer (Invitrogen). All libraries were sequenced using a single-read strategy (10 million reads per sample) on an

PARTIE EXPÉRIMENTALE

NextSeq550 platform, with 150 cycles of the MidOutput flowcell (Illumina), a read length of 72 bp, and dual indices of 10 bp. Raw data were converted to FASTQ files using bcl2fastq (v2.20).

Data analysis

Three independent replicates were analyzed using QIAGEN RNA-seq Analysis Portal 4.1 (QIAGEN, Aarhus, Denmark) and the analysis workflow (v1.2) and using the Legacy Analysis Pipeline on the QIAGEN GeneGlobe portal. The sequences were aligned against the reference miRBase_v22 and the *Mus musculus* genome (GRCm38.101). Gene expression-level differences were accepted as statistically significant when the p-value in an ANOVA was <0.05 and when the fold change was between 1 and -1 after an intergroup comparison.

2.7 Bioinformatics analyses

PPIs and GO annotation

Cytoscape software (v3.10.1) and the STRING public database (v12.0) were used to generate local proteins networks and map protein data onto a PPI network. No more than 10 predicted functional interactors were added in the first shell, using a medium level of confidence (0.4) for edge prediction. For proteins without interactions, pertinent GO biological processes were attributed manually when FDR <0.05 and strength >1 .

miRNA target filters and canonical pathway analysis

IPA (Ingenuity Pathway Analysis, Winter Release December 2023, QIAGEN, Aarhus, Denmark) was used to perform and miRNA Target Filter analysis, according to the software's manual. The analysis considered all relationship sources in the mouse and the human, and the following filters were applied: miRNA confidence (Experimentally observed, High (predicted)), Tissue/Cell Line (Astrocytes, Macrophages, Neurons, Nervous system, CNS cell lines, Neuroblastoma cell lines), Pathway (Neurotransmitters and other nervous system signaling), Disease (Neurological disease, Inflammatory response, inflammatory disease, developmental disorder). The miRNA Target Filter analysis with a published dataset (20) was performed as follow: miRNA confidence (Experimentally observed, High (predicted)), Expression pairing (miRNA upregulated, mRNA downregulated). A standard IPA core analysis (including canonical pathways) was performed with Fisher's exact test ($p < 0.05$) and application (or not) of the "Neurotransmitters and other nervous system signaling" filter.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Networks involving miRNAs and mRNAs were designed with the Path Designer tool from IPA (Winter Release December 2023, QIAGEN, Aarhus, Denmark).

2.8 Culture and treatment of primary cortical neurons

C57BL/6J mice were purchased from Charles River Laboratories (Saffron Walden, UK). Housing, care, coupling and gestation were performed in the US 006/CREFRE INSERM/UPS - Service Zootechnie Expérimentation Purpan animal facility (Toulouse, France), in accordance with French regulations and the European Union Council Directive (2010/63/EU). Mouse experiments were performed by authorized investigators and were approved by the government-accredited animal care and use committee (*Comité d'Ethique de l'US 006/CREFRE* (Toulouse, France); reference number: PI-U1291-JA-37).

Primary cortical neurons were prepared from newborn C57BL/6J mice, using a protocol adapted from (64) The neocortices were isolated from pups on day 0-1 in cold Earle's Balanced Salt Solution (EBSS) and incubated for 15 min at 37°C in EBSS containing 10 U/ml papain (Worthington), followed by gentle dissociation in PBS containing 1.5 mg/ml BSA, 1.5 mg/ml trypsin inhibitor (Sigma-Aldrich), and 66 µg/ml DNase I (Life Technologies). The cells were filtered twice through a 4% BSA cushion by centrifugation, and seeded at a density of 350000 cells/well in 12-well plates with 12 mm diameter glass coverslips. The plates and coverslips had been coated with 1 mg/mL poly-D-lysine (Merck) and 4 µg/mL laminin (Life Technologies).

Treatment of neurons with microglial EVs

Primary cortical neurons were maintained for 7 days (DIV 7) before EV treatment at 37°C in 5% CO₂ and cultured in serum-free Neurobasal medium (Life Technologies) supplemented with 1.2% GlutaMAX-I (Life Technologies), 1.2 U/mL of penicillin, 1.2 µg/mL streptomycin, and 2% B-27 supplement (Life Technologies). Neurons were treated from DIV 7 to DIV 9 with 8.75×10^8 EVs per well or with vehicle every 24h for 72h.

Coverslips (in duplicate for each condition) were fixed after 24h (DIV 8), 48h (DIV 9) or 72h (DIV 10) of treatment in 4% paraformaldehyde and 4% sucrose solution in PBS for 20 min at room temperature and stored at 4°C in PBS prior to immunostaining.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

2.9 Immunocytochemistry

Immunostaining

After fixation, cells were permeabilized with 0.1% Triton 100X in PBS 1X for 10 min at room temperature and washed once with PBS 1X. Neurons were blocked with 3% donkey serum and 3% Bovine Serum Albumine (BSA) in PBS 1X for 1h at room temperature and incubated overnight at 4°C with primary antibodies. On the next day, coverslips were washed three times in PBS 1X before staining with secondary antibodies for 1 h at room temperature (see Table 5 for details of antibodies and their dilutions). The terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay was performed according to the manufacturer's recommendations. Lastly, nuclei were washed three times in PBS 1X for 5 min at room temperature, stained with Hoechst 33342 (Life Technologies) diluted 1:2000 in PBS 1X, and washed again three times in PBS 1X for 5 min. Coverslips were mounted on slides with a few microliters of ProLong™ Gold Antifade Mountant (Life Technologies) and dried either overnight at room temperature or longer at 4°C.

Image analysis

All the slides were imaged using a Zeiss ApoTome 2 (Carl Zeiss Group, Oberkochen, Germany) fluorescence microscope. Images of neurites and TUNEL assay results were analyzed as 25-square stitched mosaics with a 10X wide field objective and AI Filament Tracer plug-in (for neurite quantification) or a colocalization module (for TUNEL quantification) in Imaris software (version 10.0, Oxford Instruments, Abingdon-on-Thames, Royaume-Uni). Neurite variables were expressed as differences between WT or MPS III conditions and CTL condition. Images for dendrite morphology analysis were obtained with 40X and 63X oil immersion objectives, processed using Zeiss ZEN software, and quantified using ImageJ2 2.3.0. The results of at least four different experiments (with different neurons and EV batches) were quantification on blind basis, using the same parameters for each experiment.

The dendritic arborization was quantified in a Sholl analysis with an “inside-out” scheme (65).

2.10 Statistical analyses

All statistical tests were performed with GraphPad Prism software (version 10.1.0, GraphPad Software LLC, San Diego, CA, USA). Intergroup differences were analyzed using an independent-sample T-test. Three or more groups were compared in a one-way ANOVA with

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Šidák correction or in a two-way ANOVA. The threshold for statistical significance was set to $p < 0.05$, unless otherwise stated. Data were expressed as the mean \pm SEM.

Table 1: Characteristics of urine samples from patients and controls

Patients/ controls	Clinical type	Sex	Age at diagnosis (months)	Age at the time of urine collection (years)	Mean GAG concentration (mg/L of urine)
CTL 1	/	M	/	15	4.9
CTL 2	/	F	/	8	2.5
CTL 3	/	F	/	10	5.6
CTL 4	/	F	/	6	3.9
MPS 1	MPS IIIA	M	42	12	75.3
MPS 2	MPS IIIB	F	23	6	21.1
MPS 3	MPS IIIC	M	40	7	35.2
MPS 4	MPS IIIC	M	60	17	28.1
MPS 5	MPS IIIC	F	77	28	51.0
MPS 6	MPS IIIC	M	33	9	60.4

Table 2: Flow cytometry antibodies

Antigen	Host/target Species	Fluorochrome	Dilution	Supplier
CD11b	Rat, anti-mouse	PE-Cy7	1:150	BD Biosciences (552850)
CD14	Rat, anti-mouse	APC	1:50	BD Biosciences (123311)
CD16/32	Rat, anti-mouse	BV421	1:150	BioLegend (101331)
CD40	Rat, anti-mouse	PE	1:100	BioLegend (124610)

Table 3: Western blot antibodies

Antigen	Host/target species	Dilution	Supplier
ADAM10	Rat anti-mouse	1:500	R&D System (MAB-946-100)
CD9	Rabbit anti-human, mouse	1:2000	GeneTex (GTX55564)
CD63	Mouse anti-mouse, rat, human	1:500	Santa Cruz (Sc-5275)
CD81	Mouse anti-mouse, rat, human	1:500	Santa Cruz (Sc-166029)
GM130	Mouse anti-rat, mouse, human, dog	1:500	BD Biosciences (610823)
LAMP-1 (CD107a)	Rat anti-mouse	1:500	BD Biosciences (553792)
Transferrin receptor	Mouse anti-chicken, hamster, human, mouse, rat	1:500	Invitrogen (13-6800)
TSG-101	Rabbit anti-human, mouse, rat	1:2000	Proteintech (14497-1-AP)
Albumine	Mouse anti-mouse, rat, human	1:500	Santa Cruz (Sc-271605)
Mouse-HRP	Horse	1:2000	Cell Signaling (7076S)
Rabbit-HRP	Goat	1:2000	Cell Signaling (7074S)
Rat-HRP	Goat	1:2000	Cell Signaling (7077S)

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Table 4: RT-qPCR primers

Target	Forward	Reverse
ARPO	5'- TCCAGAGGCACCATTGAAATT-3'	5'-GTCGCTGGCTCCCACCTT-3'
IL-1 β	5'-CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG-3'	5'-GATCCACACTCTCCAGCTGCA-3'
IL-6	5'-TTCTCTGGGAAATCGTGAAAA-3'	5'-GCATCATCGTTGTTTCATACAA-3'
IL-10	5'-CCCTTTGCTATGGTGTCTT-3'	5'-TGGTTTCTCTTCCCAAGACC-3'
iNOS	5'- TGCGAAAGGTCATGGCTTCA-3'	5'- TCTCCAAGGTGCTTGCCTT-3'
MIP1 α	5'-CTGCAACCAAGTCTTCTCA-3'	5'-GCATTCAGTTCAGGTCAGT-3'
TNF α	5'-CAAATTCGAGTGACAAGCCTGTA-3'	5'-CCACTTGGTGGTTTGCTACGA-3'
hsa-miR-103a-3p	5'-AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA-3' (YP00204063)	
hsa-miR-100-5p	5'-AACCCGUAUAUCCGAACUUGUG-3' (YP00205689)	
hsa-miR-221-3p	5'-AGCUACAUUGUCUGCGGGUUUC-3' (YP00204532)	
mmu-miR-155-5p	5'-UUAUUGCUAAUUGUGAUAGGGGU-3' (YP02119303)	
hsa-miR-146a-5p	5'-UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU -3'(YP00204688)	
UniSp6	(YP00203954)	

Table 5: Immunocytochemistry antibodies

Antigen	Host/target species	Dilution	Supplier
MAP2	Chicken anti-mouse, rat	1:500	Abcam (ab5392)
β -III Tubulin	Mouse anti-human, mouse, rat, chicken	1:100	R&D System (MAB1195)
Chicken-Alexa Fluor™ 568	Goat	1:1000	Invitrogen (A11041)
Mouse-Alexa Fluor™ 647	Donkey	1:1000	Invitrogen (A32787)

3 Results

3.1 Pro-inflammatory activation of BV-2 cells after treatment with GAGs extracted from the urine of patients with MPS III

In order to obtain a sufficient amount of a homogenous population of microglia derived-EVs for the comprehensive characterization of protein and small RNA contents and for a primary cortical neuron uptake assay, we used an *in vitro* model of MPS III: the BV2 mouse microglial cell line treated with GAGs extracted from the urine of patients with MPS III (henceforth referred to as MPS-GAGs). We first checked that BV-2 cells could be activated by 5 µg/mL MPS-GAGs, as used previously with primary microglia and neurons (9,16). Using quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR, Fig. S1A) and flow cytometry (Fig. S1B), we showed that BV-2 cells expressed more pro-inflammatory cytokines (MIP1 α , IL-6, IL-1 β , and TNF α) and surface markers (CD14, CD40, CD16/32 or CD11b) after exposure to MPS-GAGs.

We next purified and characterized the large and small EVs secreted by BV2 cells after treatment with either MPS-GAGs, urinary GAGs from healthy children (WT-GAGs), or GAG resuspension buffer (the control (CTL) condition).

3.2 Characterization of EVs

As specified in the guidelines from the International Society for Extracellular Vesicles (34,35), the vesicles in pellets obtained after centrifugation at 12,000 x g (henceforth the 12k pellet) and 100.000 x g (the 100k pellet) were analyzed with regard to particle size and concentration, using nanoparticle tracking analysis (NTA) and transmission electron microscopy (TEM) (Fig. 1B, C and D). The presence of EV protein markers was checked using Western blotting and mass spectrometry (Fig. 1E and F).

Nanoparticle tracking analysis

In a comparison of CTL, WT-GAG and MPS-GAG EVs, the NTA showed that all the 12k and 100k pellets had a similar average particle size (mean) and peak particle size (mode) (Table 1 and Fig. 1B). In all three conditions, the total particle concentration was lower in the 12k pellet than in the 100k pellet. Interestingly, microglial cells exposed to MPS-GAGs appeared to secrete more small EVs than cells exposed to WT-GAGs or to CTL buffer; however, the intergroup differences were not statistically significant.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

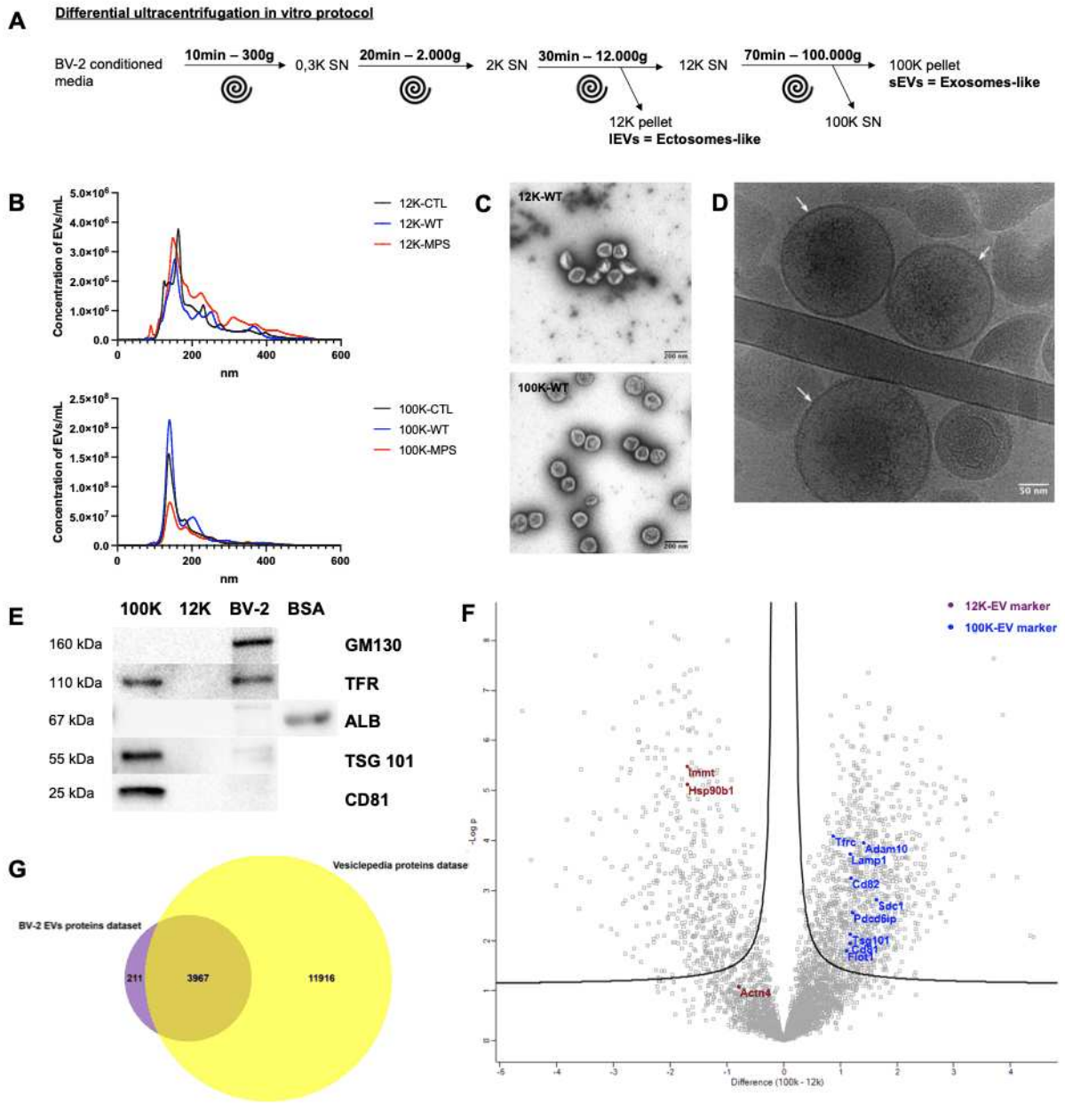


Fig. 1. Purification and characterization of EVs from BV2-cell-conditioned medium

(A) Differential centrifugation purification of 12k-EVs and 100k-EVs from BV-2 cell-conditioned medium. (B) NTA size distribution graphs of the purified 12k-EVs (upper panel) and 100k-EVs (lower panel) from cell-conditioned media of BV-2 cells treated with WT-GAGs (WT-, n=5), MPS III-GAGs (MPS-, n=5) or vehicle only (CTL-, n=3). The diameter of EVs from the 12k pellet ranges from 100 to 400 nm and that of the EVs from 100k pellet ranges from 120 to 280 nm. The results are expressed as the mean EV concentration per mL for each nm in size. (C) Representative images of negative-stained TEM showing pure EV preparations of WT-12k EVs (upper panel) and WT-100k EVs (lower panel). Scale bar = 200 nm. (D) Representative cryo-TEM image showing the presence of a lipid bilayer (white arrows) in CTL-100k EVs. Scale bar = 50 nm. (E) Western blots performed with CTL-100k EVs (100k), CTL-12k EVs (12k) and BV-2 cell lysates (BV-2) revealed the enrichment of the specific EV protein markers CD81, TSG101, mADAM10, TFR in the 100k pellet and the absence of BSA or GM130 proteins in both pellets. Synthetic BSA (5 µg) as a positive control for the anti-albumin antibody. (F) A volcano plot of proteins detected in 100k-EVs vs. 12k-EVs (using a quantitative LC-MS/MS analysis).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Mass spectrometry revealed the presence of specific protein markers of large EVs (12k, brown) and small EVs (100k, blue). X axis = the fold-change (100k-12k), y axis = $-\log_{10}(\text{P value})$. The p-value was determined in a two-tailed Student's t-test. Threshold line indicates permutation-based FDR set at 5% combined with fold change set with $S_0 = 0.1$. (G) Venn diagram generated using Funrich software, showing that 95% of the identified EVs proteins (in purple) are referenced in the Vesiclepedia public protein database (in yellow). (C, E – F) $n = 3$ biological replicates.

Table 1. Results of the NTA.

Conditions		Mode (nm)	Mean (nm)	Total concentration (EVs/mL)
CTL	12K	164 ± 13	210 ± 14	3E+08 ± 1E+08
	100K	139 ± 3	180 ± 6	7E+09 ± 6E+08
WT	12K	151 ± 6	216 ± 23	2E+08 ± 2E+08
	100K	140 ± 3	182 ± 8	1E+10 ± 8E+09
MPS	12K	147 ± 7	234 ± 28	4E+08 ± 2E+08
	100K	141 ± 5	197 ± 5	5E+09 ± 2E+09

Transmission electron microscopy

The purified EVs were examined by TEM. Negative staining revealed homogeneous populations of EVs in both the 100k and 12k pellet (Fig. 1C). The particle size was consistent with that determined in the NTA. Cryo-TEM confirmed the presence of a membrane bilayer - a hallmark of EVs (Fig. 1D).

EV protein marker analysis, using Western blotting and mass spectrometry

We used Western blotting of the BV2 control condition, whole cell lysate, and 12k and 100k pellets to establish the presence of typical transmembrane or lipid-bound protein markers of EVs (CD9, CD63, CD81, LAMP1, TfR) and cytoplasmic protein markers (ADAM10 and Tsg101) (Fig. 1E and Fig. S2A) (34,35). Tetraspanin, CD81, TfR and TSG 101 were highly enriched in the 100k pellet (Fig. 1E). To assess the degree of purity of our EV preparations, we tested for albumin because the latter is supposedly the best negative marker for EVs isolated from cells cultured in the presence of bovine serum (34). Albumin was only detected in BV2 cell lysate; this observation suggested that our 100k EV preparation was highly pure and was consistent with the TEM images (Fig. 1C). Moreover, the Golgi apparatus marker GM130 was found in the cell lysate fraction only (Fig. 1E).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Due to the small number of particles in the 12k pellet, we were able to evaluate protein markers of large EVs in an LC-MS/MS analysis only. A volcano plot of the overall distribution of 12k and 100k proteins showed that many proteins were significantly enriched (according to the criteria ($\log_2 |\text{fold-change}| \geq 1.2$ and $p < 0.05$)) in each subpopulation of EVs (Fig. 1F). The differentially expressed proteins included specific markers of small EVs and specific markers of large EVs. The EV protein markers identified in an LC-MS/MS analysis are listed in Table S1. A principal component analysis discriminated well between different EV sources (12k vs. 100k) (Fig. S2B) and confirmed that the EV isolation and label-free quantitative proteomics protocols were highly reproducible. A Venn diagram showed that 3967 (95%) of the 4178 identified proteins were present in the Vesiclepedia public database (Fig. 1G).

Given that the characterization of the EVs from 12k and 100k pellets gave satisfactory results, we pursued the experiments by evaluating the effect of WT-GAGs and MPS-GAGs on EVs' proteome and small RNA content.

3.3 Differentially abundant proteins in microglia derived-EVs treated with MPS-GAGs

The 12k and 100k pellets obtained after BV2 cell treatment with WT-GAGs, MPS-GAGs or CTL buffer (i.e. six conditions in total) were analyzed using label-free, quantitative proteomics. We identified a total of 4332 unique proteins. The numbers of proteins were similar in all six conditions. We next sought to identify the significantly altered EVs proteins among the six conditions by applying a one-way ANOVA ($S_0 = 0.1$ permutation-based FDR < 0.05). In total, 43 significantly altered proteins were identified. The biological replicates from both 12k and 100k MPS-EVs were grouped together in one cluster, while the CTL-EV and WT-EV replicates were grouped together in another cluster; this suggested that WT-GAGs do not modify the EVs' protein content (Fig. 2A). In an unsupervised hierarchical clustering analysis of the differentially expressed proteins, we observed that only 13 were more abundant in the 12k pellet than in the 100k pellet. This finding suggested that GAG treatment had similar effects on the protein content in both pellets. However, relative to WT-EVs or CTL-EVs, 11 proteins were significantly upregulated and 19 proteins were significantly downregulated in both 12k and 100k MPS-EVs (Table 2).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

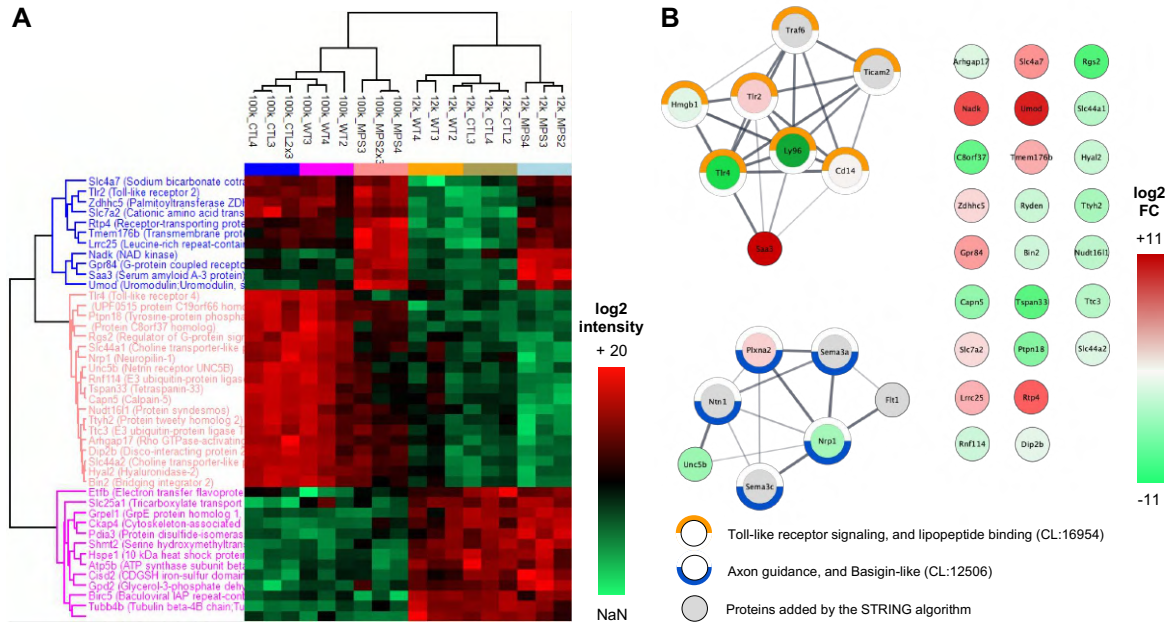


Fig. 2. Quantitative proteomics: a comparison of EVs released by microglia treated with WT vs. MPS III-GAGs.

(A) A heatmap of a quantitative differential analysis (LC-MS/MS) of proteins present in EVs as a function of the GAG treatment and type of pellet. EVs were collected from conditioned media of BV-2 cells treated with WT-GAGs (_WT), MPS III-GAGs (_MPS) or vehicle only (_CTL) and proteins extracted from the 12k pellet (12k_) or the 100k pellet (100k_). Log₂ fold-change, using label-free quantified intensity. The q-value was determined in a one-way ANOVA performed with Perseus software. Heat colors were scaled per marker (high expression in red; low expression in green). n=3 biological replicates. (B) Protein-protein interaction (PPI) networks of the 30 proteins differentially expressed when comparing MPS III-EVs with WT-EVs; the proteins were part of the *Toll-like receptor signaling, and lipopeptide binding* and the *Axon guidance, and basigin-like* networks. The networks were obtained using the STRING database and Cytoscape software. PPI enrichment p-value = 7.41×10^{-6} . The color of the bubble represents the mean log₂(fold-change) of proteins expressed in MPS EVs compared with pooled CTL EVs and WT EVs (high expression in red; low expression in green). Half circles around bubbles correspond to STRING local network clusters, *Toll-like receptor signaling, and lipopeptide binding* (in orange, FDR: 3.52×10^{-10}) and *Axon guidance, and basigin-like* (in blue, FDR: 2.5×10^{-4}).

Table 2. Gene ontology annotation of proteins differentially expressed when comparing MPS-EVs with WT-EVs. The 30 proteins are ranked by fold change.

Gene names	log ₂ FC	-log ₁₀ FDR	Uniprot IDs	Protein names	Gene ontology biological process
Saa3	10,979	5,000	P04918	Serum amyloid A-3 protein	Inflammatory response; GO:0006954, Chemotaxis; GO:0006935, Positive regulation of reactive oxygen species metabolic process; GO:2000379; Positive regulation of neuron death; GO:1901216
Umod	8,719	1,263	Q91X17	Uromodulin;Uromodulin, secreted form	Apoptotic process; GO:0006915, Response to oxygen-containing compound; GO:1901700, Cellular response to tumor necrosis factor; GO:0071356
Nadk	5,190	0,963	P58058	NAD kinase	Negative regulation of apoptotic process; GO:0043066, NADP metabolic process; GO:0006739
Rtp4	4,013	1,248	Q9ER80	Receptor-transferring protein 4	Innate immune response; GO:0045087, Positive regulation of cytokine production; GO:0001819

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Slc4a7	2,426	1,307	Q8BTY2	Sodium bicarbonate cotransporter 3	Regulation of intracellular pH; GO:0051453
Gpr84	2,162	1,164	Q8CIM5	G-protein coupled receptor 84	Regulation of cytokine production; GO:0001817, Response to oxygen-containing compound; GO:1901700, Inflammatory response; GO:0006954
Tmem176b	1,780	1,270	Q9R1Q6	Transmembrane protein 176B	Negative regulation of dendritic cell differentiation; GO:2001199
Lrrc25	1,695	1,233	Q8K1T1	Leucine-rich repeat-containing protein 25	Cell-cell adhesion via plasma-membrane adhesion molecules; GO:0098742, Regulation of cytokine production; GO:0001817
Tlr2	1,022	1,212	Q9QUN7	Toll-like receptor 2	Positive regulation of cytokine production; GO:0001819, Inflammatory response; GO:0006954, Cellular response to oxygen-containing compound; GO:1901701
Zdhhc5	0,749	1,317	Q8VDZ4	Palmitoyltransferase ZDHHC5	Protein acylation; GO:0043543, Protein palmitoylation; GO:0018345, Regulation of postsynaptic membrane neurotransmitter receptor levels; GO:0099072
Slc7a2	0,681	1,175	P18581	Cationic amino acid transporter 2	Carboxylic acid transmembrane transport; GO:1905039, Innate immune response; GO:0045087, Regulation of leukocyte cell-cell adhesion; GO:1903037
Dip2b	-0,287	1,285	Q3UH60	Disco-interacting protein 2 homolog B	Mitochondrial respiratory chain complex I assembly; GO:0032981, mRNA transport; GO:0051028
Slc44a2	-0,408	1,266	Q8BY89	Choline transporter-like protein 2	Choline transmembrane transporter activity; GO:0015220, Cell adhesion; GO:0007155
Arhgap17	-0,452	1,281	Q3UIA2	Rho GTPase-activating protein 17	Actin cytoskeleton organization; GO:0030036, Establishment or maintenance of cell polarity; GO:0007163, Cell migration; GO:0016477, Vesicle-mediated transport; GO:0016192, Dendritic spine morphogenesis; GO:0060997
Bin2	-0,636	1,298	D3Z6Q9	Bridging integrator 2	Vesicle-mediated transport; GO:0016192, Synaptic vesicle endocytosis; GO:0048488, Dendritic spine morphogenesis; GO:0060997
Rnf114	-0,675	1,273	Q9ET26	E3 ubiquitin-protein ligase RNF114	Protein ubiquitination; GO:0016567, Apoptotic process; GO:0006915, Regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling; GO:0043122
Ryden	-0,710	1,278	Q8CAK3	UPF0515 protein C19orf66 homolog	
Hyal2	-0,744	1,291	O35632	Hyaluronidase-2	Glycosaminoglycan catabolic process; GO:0006027, Regulation of cell migration; GO:0030334, Negative regulation of apoptotic signaling pathway; GO:2001234
Nudt161l	-0,918	1,246	Q8VHN8	Protein syndesmos	Double-strand break repair; GO:0006302, Mitochondrial transport; GO:0006839
Slc44a1	-1,019	1,264	Q6X893	Choline transporter-like protein 1	Nitrogen compound transport; GO:0071705, Early endosome to late endosome transport; GO:0045022, Endosome to lysosome transport; GO:0008333
Ttc3	-1,035	1,328	O88196	E3 ubiquitin-protein ligase TTC3	Wnt signaling pathway; GO:0016055
Ttyh2	-1,233	1,175	Q3TH73	Protein tweety homolog 2	Intra-Golgi vesicle-mediated transport; GO:0006891, Cellular response to osmotic stress; GO:0071470, Protein localization to axon; GO:0099612
Nrp1	-1,339	1,299	P97333	Neuropilin-1	Semaphorin-plexin signaling pathway; GO:0071526, Axonogenesis; GO:0007409, Axon guidance; GO:0007411, Basal dendrite arborization; GO:0150020
Unc5b	-1,487	1,243	Q8K1S3	Netrin receptor UNC5B	Axonogenesis; GO:0007409, Axon guidance; GO:0007411, Anterior/posterior axon guidance; GO:0033564
Capn5	-1,623	1,129	O08688	Calpain-5	Proteolysis; GO:0006508, Actin cytoskeleton organization; GO:0030036, Response to reactive oxygen species; GO:0000302
Ptpn18	-1,806	0,862	Q61152	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 18	Positive regulation of MAP kinase activity; GO:0043406, ERBB2-EGFR signaling pathway; GO:0038134, Gliogenesis; GO:0042063
C8orf37	-2,337	1,066	Q3UJP5	Protein C8orf37 homolog	
Tspan33	-2,523	1,305	Q8R3S2	Tetraspanin-33	Regulation of leukocyte chemotaxis; GO:0002688, Adherens junction organization; GO:0034332, Negative regulation of neuron death; GO:1901215, Complement activation, classical pathway; GO:0006958, Positive regulation of blood-brain barrier permeability; GO:1905605
Rgs2	-2,670	1,135	O08849	Regulator of G-protein signaling 2	Dopamine receptor signaling pathway; GO:0007212
Tlr4	-4,860	1,007	Q9QUK6	Toll-like receptor 4	Positive regulation of cytokine production; GO:0001819, Inflammatory response; GO:0006954, Cellular response to oxygen-containing compound; GO:1901701

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Protein networks and functional enrichment analysis

Proteins regulate biological processes through functional or physical interactions with other proteins. In a protein-protein interaction (PPI) network analysis, we probed for potential interactions between the 30 differentially expressed proteins and found two PPI networks (Fig. 2B). Functional enrichment analysis of these networks (using the Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING)) revealed two clusters: *Toll-like receptor signaling, and lipopeptide binding* (CL:16954, false discovery rate (FDR): 3.5×10^{-10}) and *Axon guidance, and basigin-like* (CL :12506, FDR : 2.5×10^{-4}). Since the label-free quantitative proteomic analysis revealed a small number of differentially expressed proteins, the biological processes (Gene Ontology (GO) annotations) involving proteins that were not part of the two networks are reported in Table 2. Most of the proteins that were more abundant in MPS-EVs are involved in the inflammatory response, apoptotic and oxidative processes, macrophage metabolism, or immune cell recruitment. Conversely, most of the proteins that were less abundant in MPS-EVs are involved in neurodevelopment (particularly axonogenesis, synaptogenesis, neuron metabolism, and blood-brain barrier permeability) and, to a lesser extent, the inflammatory response and apoptosis.

3.4 Differences in the abundance of miRNAs in microglia-derived-EVs treated with MPS-GAGs

Total RNA was extracted from the 12k and 100k pellets obtained after treatment of the BV2 cells with WT-GAGs or MPS-GAGs. The total RNA concentration ranged from 1.01 to 21.2 ng/ μ l (Fig. S3A). The mean \pm standard error of the mean (SEM) amount of RNA was lower in the 12k pellet than in the 100k pellet (4.05 ± 2.57 vs. 10.2 ± 6.21 , respectively). Electrophoresis of the extracted RNA showed that the samples had a high proportion of small RNAs (<200 nt in length) and a low proportion of 18S and 28S rRNAs (Fig. S3B). The total reads obtained from RNA sequencing and the mappable reads used for alignment were similar in biological replicates from the WT-100k, MPS-100k, WT-12k and MPS-12k pellets (Table S2). The EVs contained high amounts of various types of small RNAs (mainly tRNAs and miRNAs, and other small non-coding RNAs) and very low amounts of rRNAs and mRNAs. The small RNA distribution pattern was similar in the WT-100k, MPS-100k, WT-12k and MPS-12k pellets (Fig. S4).

RNA sequencing identified a total of 1960 miRNAs. An ANOVA revealed that levels of 38 miRNAs were significantly altered (i.e. a \log_2 |fold-change| ≥ 1 and $p < 0.05$) when

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Table 3. List of miRNAs expressed differentially when comparing MPS-EVs and WT-EVs.

The 38 miRNAs are ranked by p-value.

miRNA names	log2 FC	-log10 p-value
mmu-miR-155-5p	3,54159	4,495257364
mmu-miR-146a-5p	3,15531	3,417255034
mmu-miR-221-3p	1,758177	3,585695312
mmu-miR-100-5p	3,142551	3,200246034
mmu-miR-10b-5p	4,403757	2,366632555
mmu-miR-2137	2,264235	2,374378919
mmu-miR-652-5p	-3,130779	2,431211788
mmu-miR-30b-3p	-1,751663	2,225556031
mmu-miR-6240	2,267543	2,201004266
mmu-miR-709	-1,71973	2,238899461
mmu-miR-7688-5p	-1,833452	2,044986097
mmu-miR-23b-3p	1,638435	1,999153682
mmu-miR-708-5p	3,428667	1,945652747
mmu-miR-193a-5p	-1,780358	1,78195532
mmu-miR-1983	-1,541618	1,774716187
mmu-miR-221-5p	1,929952	1,804894565
mmu-miR-30c-1-3p	-1,605333	1,695938101
mmu-miR-505-3p	5,45504	1,701438448
mmu-miR-669c-5p	-1,586156	1,839462837
mmu-miR-6998-3p	4,461104	1,691174154
mmu-miR-7054-5p	-2,892144	1,750329155
mmu-miR-9769-3p	11,22336	1,745859394
mmu-miR-99a-5p	1,635672	1,779719382
mmu-miR-466a-5p	-6,25811	1,588970959
mmu-miR-6239	4,380789	1,6045598
mmu-miR-335-5p	-2,749834	1,558512104
mmu-miR-1a-3p	-3,10324	1,526204828
mmu-miR-21a-3p	2,957127	1,461707432
mmu-miR-345-5p	1,993467	1,516059167
mmu-miR-365-3p	1,807271	1,503201898
mmu-miR-501-5p	8,532644	1,463063319
mmu-miR-7024-5p	-5,097571	1,476120889
mmu-miR-204-5p	-8,006198	1,412569502
mmu-miR-139-3p	-1,638413	1,37398831
mmu-miR-1947-5p	-3,44084	1,374378562
mmu-miR-25-5p	-1,545388	1,358440872
mmu-miR-23b-5p	-2,424577	1,332006406
mmu-miR-669e-5p	4,028704	1,341378598

PARTIE EXPÉRIMENTALE

comparing the four conditions (Table 3 and Fig. 3A). The replicates from the 12k and 100k MPS-EVs were grouped together in one cluster, and the replicates from the 12k and 100k WT-EVs replicates were grouped together in a second cluster. Using unsupervised hierarchical clustering of these 38 differentially abundant miRNAs, we observed that a group of 20 miRNAs was upregulated and a group of 18 miRNAs was downregulated in MPS-EVs, relative to WT-EVs. When we applied more stringent criteria ($\log_2 |\text{fold-change}| \geq 1$ and adjusted $p < 0.1$), a volcano plot of the overall miRNA distribution revealed that MPS-EVs were significantly enriched in four miRNAs (miR-155-5p, miR-146a-5p, miR-221-3p, and miR-100-5p) (Fig. 3B). With regard to the normalized counts per million (CPM) of the four miRNA outliers, miR-100-5p was less abundant (<100 CPM) than the three others (Fig. S5). The level of expression of these four miRNAs in total cellular RNA and in EV RNA was confirmed by qPCR experiments (Fig. 3C). We found that the most abundant miRNAs in MPS-EVs were also more abundant in extracts from BV2 cells treated with MPS-GAGs.

mRNA targets and canonical pathway analysis

Since miRNAs carried by EVs can be transferred to recipient cells and mediate the latter's response, we sought to identify brain cell mRNAs targeted by the four upregulated miRNAs in MPS-EVs. In an expression pairing analysis using the mRNA target filter from Ingenuity Pathway Analysis (IPA), we found 130 predicted mRNA targets for the four miRNA outliers. To further investigate the pathways in which these 130 mRNA targets were potentially involved, we performed a canonical pathway analysis. The 10 most significant canonical pathways identified without any filter are shown in Figure 4A. The *Neuroinflammation*, *Hepatic fibrosis* and *Role of macrophage* pathways had the highest number of genes, and *Myelination* was ranked fifth. Since mRNA expression vary considerably from one cell type to another, we used *Neurotransmitter and other nervous system signaling* as a filter and found that the top five canonical pathways were associated with *Neuroinflammation*, *Myelination*, *Axonal guidance*, *untington's disease* and *Synaptogenesis* signaling pathways (Fig. 4B). miR-146a-5p and miR-100-5p mainly targeted genes involved in neuroinflammation and myelination, respectively (Fig. 4C), miR-221-3p mostly targeted genes involved in neuroinflammation and axonal guidance signaling pathways, while miR-155-5p targeted genes regulating neuroinflammation and myelination.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

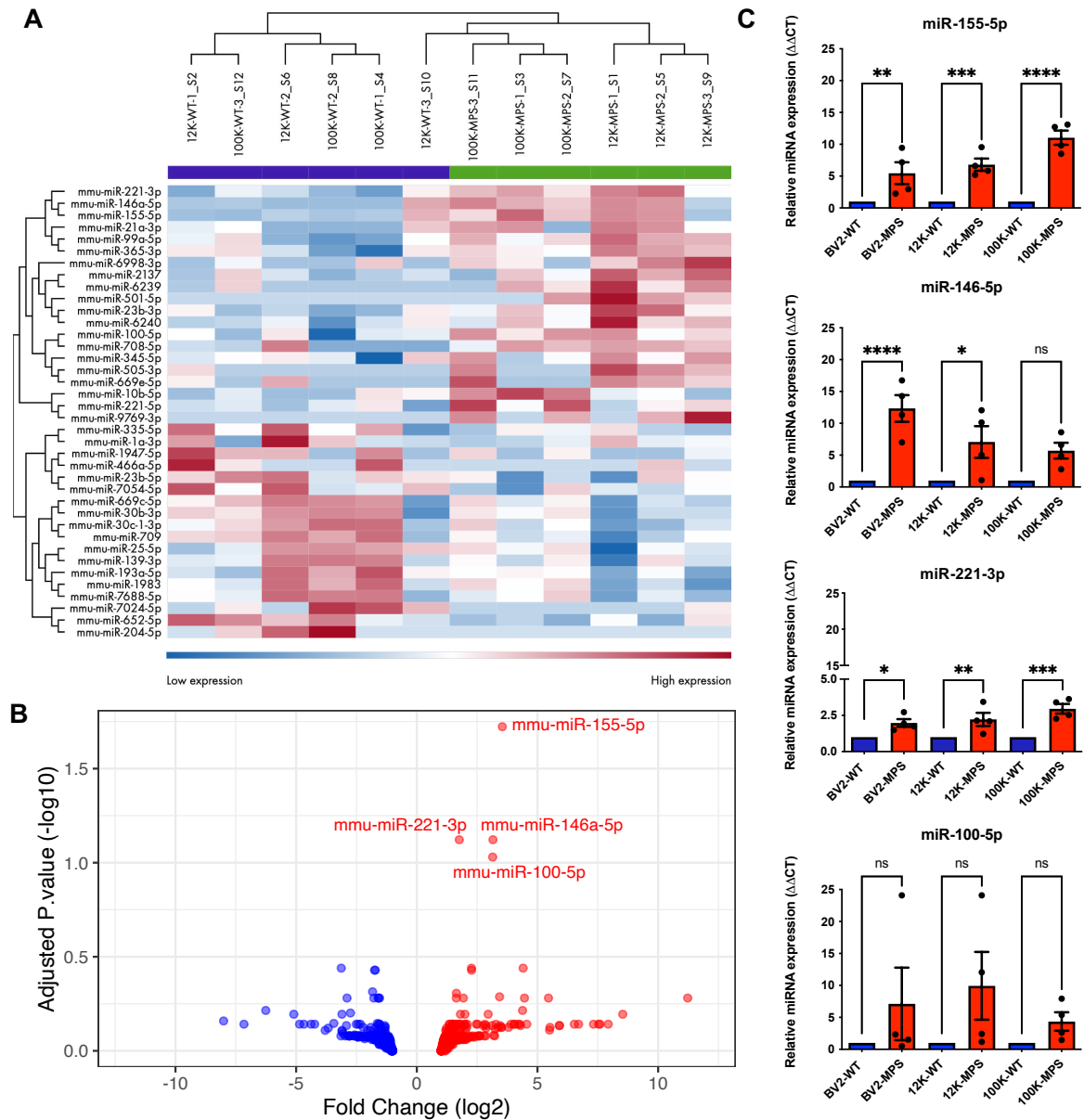


Fig. 3. Transcriptomic comparison of miRNAs from EVs released by microglia treated with WT-GAGs vs. MPS III-GAGs.

(A) A heat map generated in a quantitative differential sequence analysis (Illumina QIaseq) of miRNAs present in EVs, as a function of the GAG treatment and type of pellet. EVs were collected from media conditioned by BV2 cells treated with WT-GAGs (-WT) or MPS-GAGs (-MPS), and the RNA was extracted from the 12k pellet (12k-) or the 100k pellet (100k-). Log₂ fold-change, using RNA sequencing quantified and normalized CPM. The p-value was determined in an ANOVA performed on the QIAGEN RNA-seq Analysis Portal system. The heat colors were scaled for each marker (high expression in red; low expression in blue). n=3 biological replicates. (B) A volcano plot of miRNAs detected in MPS III-EV vs. WT-EVs revealed the enrichment of miR-155-5p, miR-146-5p, miR-221-3p and miR-100-5p in MPS-EVs. X axis = log₂ |fold-change| ≥ 1 (MPS-WT) with upregulated miRNAs (right, in red) and downregulated miRNAs (left, in blue) in MPS III-EV. y axis = -log₁₀(P value). The p-value was determined in an ANOVA. (C) RT-qPCRs of miR-155-5p, miR-146-5p, miR-221-3p and miR-100-5p, represented by bar plots. RNA was extracted from cells (BV2-) or from EVs (the 12k pellet (12k-) or the 100k pellet (100k-)) collected from conditioned media of BV2 cells treated with WT-GAGs

PARTIE EXPÉRIMENTALE

(-WT, blue) or MPS-GAGs (-MPS, red). One-way ANOVA, n=4 biological replicates (each point represents 1 n), ns = $p > 0.05$; * = $p \leq 0.05$; ** = $p \leq 0.01$; *** = $p \leq 0.001$; **** = $p \leq 0.0001$.

Using the public mRNA differential expression dataset from the hippocampus of the mouse model of MPS IIIC (20), we identified a total of 648 genes targeted by the four upregulated miRNAs. A canonical pathway analysis showed that the 341 downregulated genes were involved in pathways also identified by prediction analysis: *Myelination*, *Neuroinflammation*, *Synaptogenesis*, *Huntington's disease*, *Endocannabinoid developing neuron* and *SNARE* signaling pathways (Fig. 4D). Sixty-four of the downregulated mRNAs were also found in the list of 130 genes generated by the prediction analysis.

3.5 Effects of MPS III-EV uptake by primary cortical neurons

EV treatment does not reduce neuronal survival

To further explore the neuronal reaction to the EV cargo revealed by our omics experiments, we exposed primary cortical neurons isolated from WT pups to WT-EVs, MPS-EVs or CTL-EVs (8.75×10^8 EVs/mL) every 24 hours for 72 hours (Fig. 5A). As EVs from the 12k and 100k pellets had similar protein and RNA contents, the two were pooled for the following experiments. We first checked that the number of neuronal nuclei did not change from one condition to another or over time during the treatments (Fig. S6A). An analysis of TUNEL+ and Hoechst+ colocalization showed that exposure to the EVs did not induce apoptosis of the neurons (Fig. S6B).

EVs secreted by microglia treated with MPS-GAGs reduce the neurite surface area

Analysis of large mosaic images (25 squares, 10x objective) using Imaris machine-learning software enabled us to quantify the dimensions of the neuronal extensions (Fig. 5B). After normalization against control condition, neuron-specific microtubule immunostaining with an anti- β III-tubulin antibody highlighted a significant decrease over time in the neurite surface area of neurons exposed to MPS-EVs. The decrease became statistically significant after 72h (two-way ANOVA, $p=0.0056$, $n=4$, Fig. 5C). The neurite surface area had decreased significantly in neurons after 48h of exposure to WT-EVs (two-way ANOVA, $p=0.0097$, $n=4$) but returned to the baseline value at 72h (Fig. 5C).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

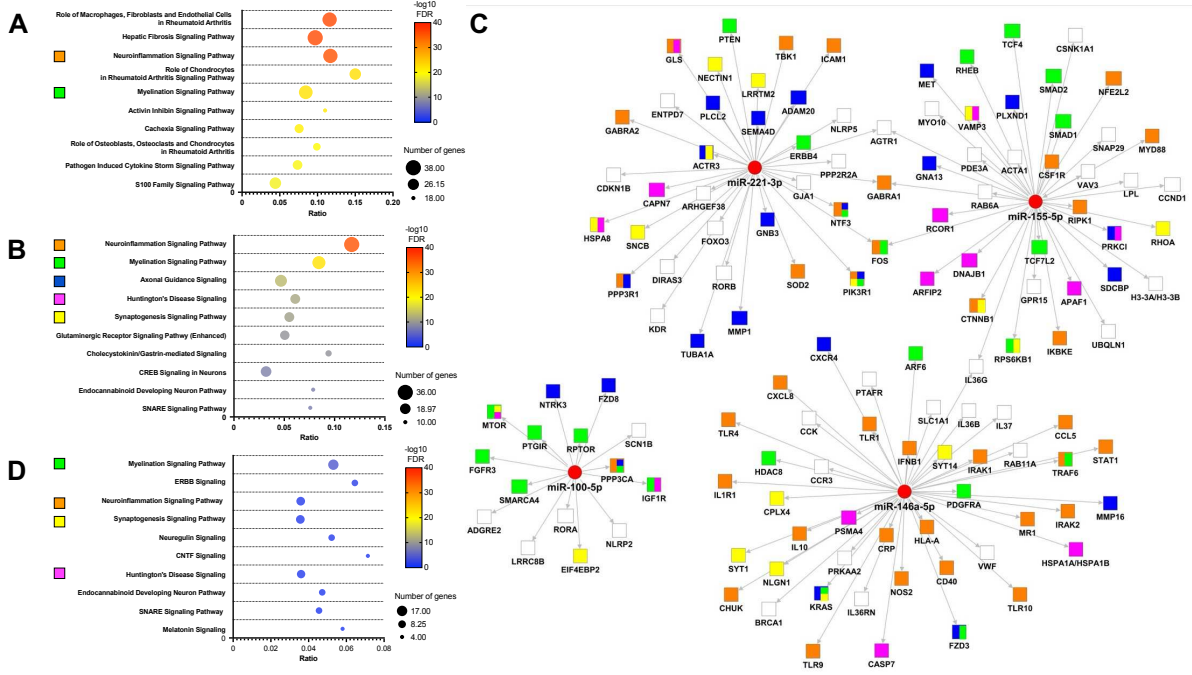


Fig. 4. Functional enrichment of mRNAs targeted by the four miRNAs enriched in MPS III-EVs. (A) The top 10 significant canonical pathways identified without a filter; the majority were related to inflammatory processes and two pathways specific for neuronal signaling. (B) The top 10 significant canonical pathways identified with the *Nervous system* filter, revealing pathways involved in neuroinflammation, neurodevelopment, and neurotransmission. (C) A network hub representation of mRNAs targeted by the four EV-miRNAs. Each mRNA (shown as squares) is linked to a miRNA (shown as red circles) with an arrow. The top five IPA canonical pathways with the *Nervous system* filter are represented by colors in each mRNA squares. (D) The top 10 significant canonical pathways identified with the *Nervous system* filter for downregulated mRNAs from the transcriptomic analysis of hippocampi of the MPS IIIC *Hgsnat*^{P304L} mouse model and that are targeted by the four miRNAs, (A, B and D) IPA canonical pathways were ranked by their $-\log_{10}$ FDR. Each pathway is shown as a circle, with the color representing $-\log_{10}$ FDR. The size corresponds to the number of targeted genes, and the X axis represents the gene ratios. The color code for signaling pathways is as follows: Neuroinflammation in orange, Myelination in green, Axonal Guidance in blue, Huntington's Disease in pink, and Synaptogenesis in yellow.

EVs secreted by microglia treated with MPS-GAGs impair dendritic organization

We investigated the site of neurite damage by immunostaining the dendrites of postmitotic neurons with an antibody against microtubule-associated protein 2 (MAP2) (Fig. 6A). The MAP2⁺ area in neurons exposed to MPS-EVs decreased over time, and the decrease became statistically significant after 72h (two-way ANOVA, $p=0.0281$, $n=4$, Fig. 6B). For neurons treated with WT-EVs, the dendrite surface area decreased between 24h and 48h (two-way ANOVA, $p=0.0039$, $n=4$) but returned to the baseline value at 72h (two-way ANOVA, $p=0.0369$, $n=4$, Fig. 6B). The MPS-EVs had a clear effect on dendrite length (i.e. the distance

PARTIE EXPÉRIMENTALE

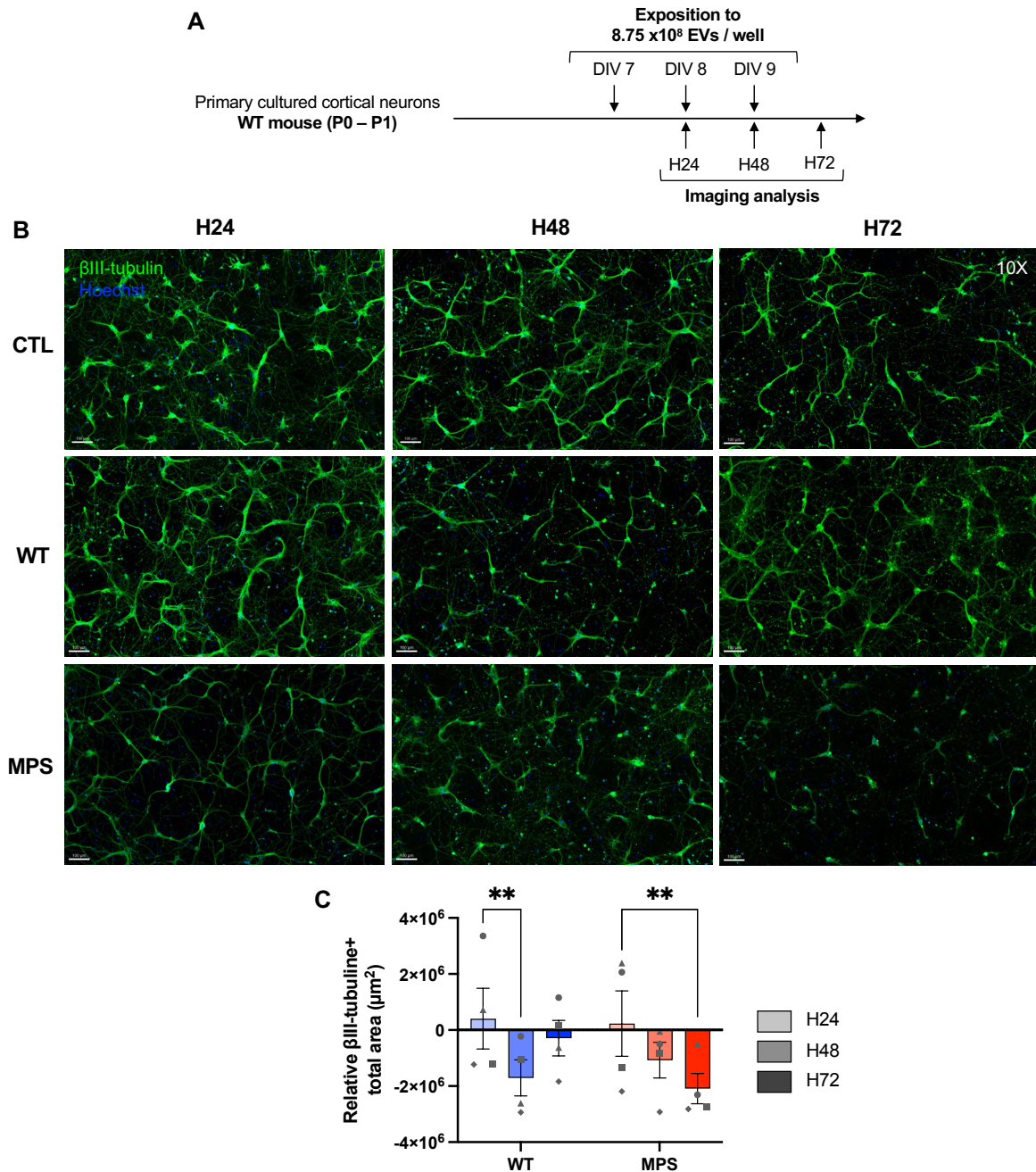


Fig. 5. β III-tubulin immunostaining of primary cortical neurons treated with WT- or MPS-EVs.

(A) A diagram showing the experiment scheme for chronic exposure of neurons to EVs and the time points in the immunofluorescence imaging analysis. (B) Representative wide-field zoomed images of 25-square stitched mosaics (10X objective) showed that β III-tubulin immunostaining was less intense after neurons had been treated for 72h with MPS-EVs, relative to treatment with WT-EVs or CTL. (C) The total β III-tubulin+ surface area decreased over time in neurons exposed to MPS-EVs. Values for neurons treated with WT-EVs (blue) or MPS-EVs (red) were normalized against those for control neurons (CTL). Two-way ANOVA, $n=4$ biological replicates (each point represents 1 n), $** = p \leq 0.01$. (A-B) Neurons were treated with WT-EVs (WT), MPS-EVs (MPS) or with trehalose (CTL) for 24h (H24, in light grey), 48h (H48, in medium grey) or 72h (H72, dark grey). Neurons were stained with an anti- β III-tubulin antibody coupled to Alexa Fluor™ 647 (green) and nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue). Scale bar = 100 μm .

PARTIE EXPÉRIMENTALE

from the soma), with a significant decrease in MAP2+ length between 48 h and 72 h (two-way ANOVA, $p=0.0369$, $n=4$) and particularly between 24 h and 72 h (two-way ANOVA, $p=0.0058$, $n=4$, Fig. 6C). Since the MAP2+ surface area data were consistent with the profile obtained for the β III-tubulin+ area, we next focused on characterization of the dendrites (Fig. 7A).

Under the microscope (40X objective, Fig. 7A), neurons exposed to MPS-EVs showed an increase in the number of short MAP2+ protrusions from the soma; the increase was statistically significant at 48 h and at 72 h (two-way ANOVA, $n=4$, $p=0.0263$ and $p=0.0034$, respectively) (Fig. 7B). The increase in the number of MAP2+ branches after exposure to MPS-EVs was also significant when compared with neurons treated with WT-EVs at 48 h and at 72 h (two-way ANOVA, $n=4$, $p=0.0039$ and $p=0.0026$, respectively) (Fig. 7B). At the 72 h timepoint, we observed an increase in the number of short primary MAP2+ branches (two-way ANOVA, $p=0.0016$, $n=4$, Fig. 7C) but not in second-generation branches. However, we observed a decrease in the number of tertiary (terminal) branches (two-way ANOVA, $p=0.0022$, $n=4$, Fig. 7C).

We also observed soma swelling after MPS-EV treatment, as evidenced by an increase in the soma area surface at 48 h and at 72 h (two-way ANOVA, $n=4$, $p=0.0054$, and $p=0.0005$, respectively). This difference in surface area was also statistically significant in neurons treated with MPS-EVs vs. WT-EVs at 48 h and at 72 h (two-way ANOVA, $n=4$, $p=0.0002$ and $p<0.0001$, respectively; Fig. 7D).

Lastly, we counted the number of immature long dendritic spines (i.e. filipodia) per 20 μ m of dendrite (63X objective). Some filipodia were more than 2 μ m long (yellow arrow heads in Fig. 7E). The number of MAP2+ filipodia on neurons exposed to MPS-EVs increased at 24 h, 48 h and 72 h (two-way ANOVA, $n=4$, $p=0.0273$, $p=0.0015$ and $p=0.0348$, respectively; Fig. 7F).

4 Discussion

Severe neuroinflammation is a hallmark of MPS III in both patients and mouse models. Chronic microglial activation has been shown to have a prominent role in the neuroinflammatory process

PARTIE EXPÉRIMENTALE

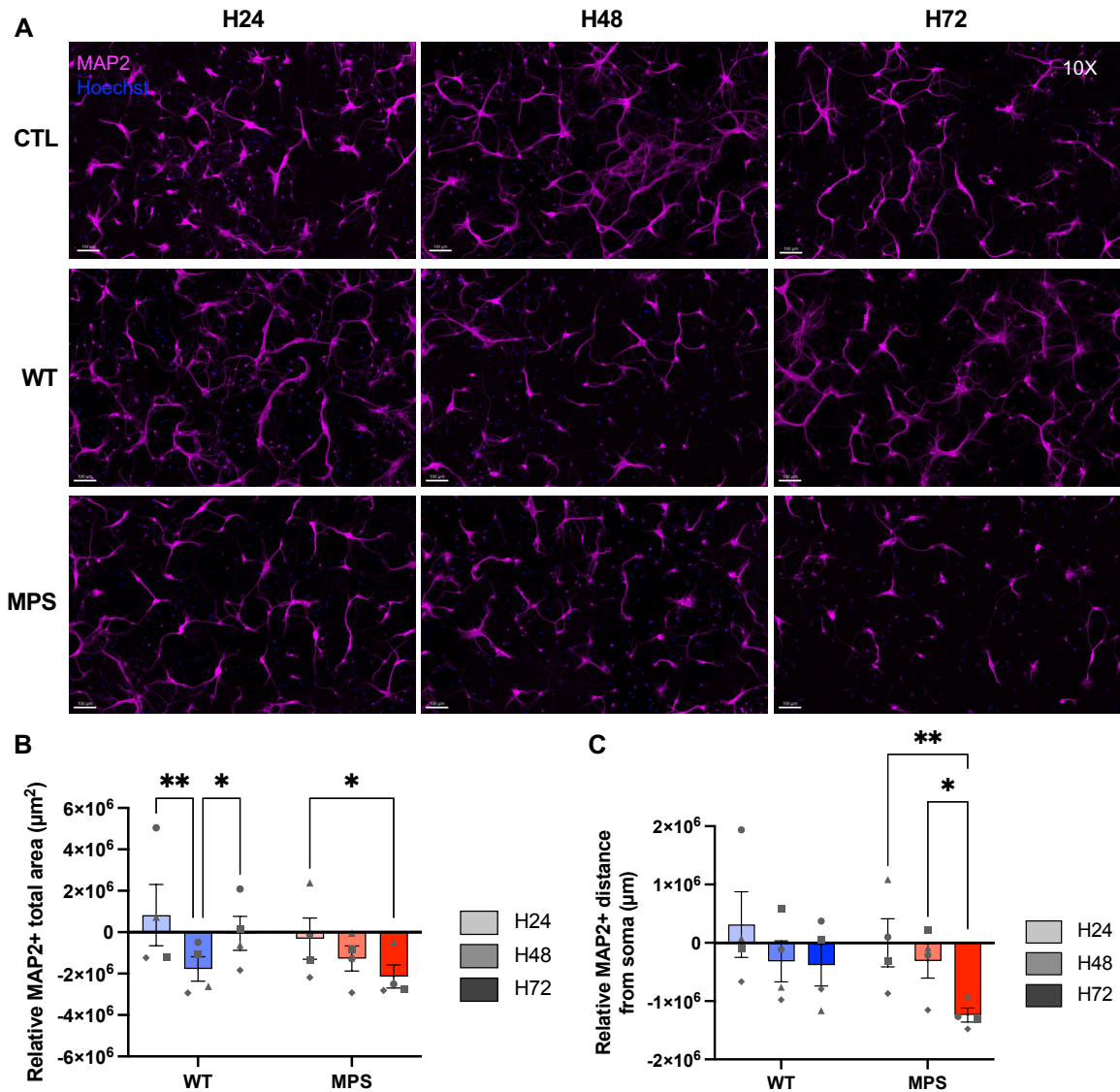


Fig. 6. MAP2 immunostaining of primary cortical neurons treated with WT- or MPS-EVs.

(A) Representative insets of wide-field zoomed images of neurons on 25 squares mosaics (10X objective) showed a relative decrease in the intensity of MAP2 immunostaining in neurons after 72h of treatment with MPS-EVs. (B) Quantification of the total MAP2+ surface area revealed a time-dependent decrease in neurons treated with MPS-EVs. (C) Quantification of the MAP2+ distance from the soma (dendrite length) revealed a progressive decrease in neurons treated with MPS-EVs. (A-C) Neurons were treated with WT-EVs (WT, blue), MPS-EVs (MPS, red) or trehalose (CTL) for 24h (H24, in light grey), 48h (H48, in medium grey) or 72h (H72, in dark grey). Neurons were stained with an anti-MAP2 antibody coupled to Alexa Fluor™ 568 (in pink) and nuclei were stained with Hoechst 33342 (in blue). Scale bar = 100 µm (B and C) Quantifications of wide-field neurons variables, normalized against nontreated control neurons (CTL). Two-way ANOVA, n=4 biological replicates (each point represents 1 n), * = $p \leq 0.05$; ** = $p \leq 0.01$; *** = $p \leq 0.001$; **** = $p \leq 0.0001$.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

that contributes to progressive neurodegeneration. The impact of EVs released by microglia on the physiopathology of MPS III has not been investigated.

It is well known that the BV-2 microglia murine cell line can be stimulated by lipopolysaccharide (LPS) and secretes pro-inflammatory cytokines that modulate oxidative stress or apoptosis (36,37). Hence, the BV-2 cell line is the gold standard in neuroinflammation studies (38) and studies of neurodegenerative disorders (39). Here, we used GAGs purified from the urine of patients with MPS III. We used this GAG fraction (highly enriched in undigested HS) to activate microglia and study their EVs. We have shown previously that HSOs have damaging effects on neurons, astrocytes, and microglia (9,16,40–42).

4.1 MPS III microglia-derived EVs carry a cargo of proteins and miRNAs involved in the inflammatory response and neuronal development.

We first characterized the RNAs and proteins in EVs released by microglial cells treated with GAGs isolated from the urine of children with MPS III. Few researchers have used proteomics or multi-omics analyses to comprehensively characterize the molecular signature of microglial EVs produced in neurodegenerative states. In exosomes produced in TREM2 Alzheimer's disease (AD) risk variant iPS-microglia, Mallach et al. found nine enriched proteins involved in the downregulation of transcription and metabolic processes (43). In CD11b⁺ small EVs from the brains of people with AD, 27 proteins were differently expressed. These proteins included disease-associated microglia markers (TMEM119, P2RY12, FTH1, ApoE) and neuronal and synaptic proteins (44). Mallach et al. also identified four miRNAs (miR-28-5p, -381-3p, -651-5p, and -188-5p) that were more abundant in microglial EVs from people with AD. These miRNAs regulated the Toll-like receptor (TLR), and senescence pathways.

The results of our RNA sequencing experiments showed that three miRNAs (-146a-5p, -155-5p and -221-3p, all known to be involved in the immune response) were abundant in MPS III microglial-EVs. Interestingly, both miR-146a-5p and miR-155-5p were found to be upregulated in EVs secreted by LPS-polarized N9 microglia (45), miR-146-5p in A β -treated microglial EVs (29), and miR-221-3p in EVs from IL-4 polarized microglia (46); these observations indicated that in an inflammatory context, microglia release EVs with a high abundance of these specific miRNAs.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

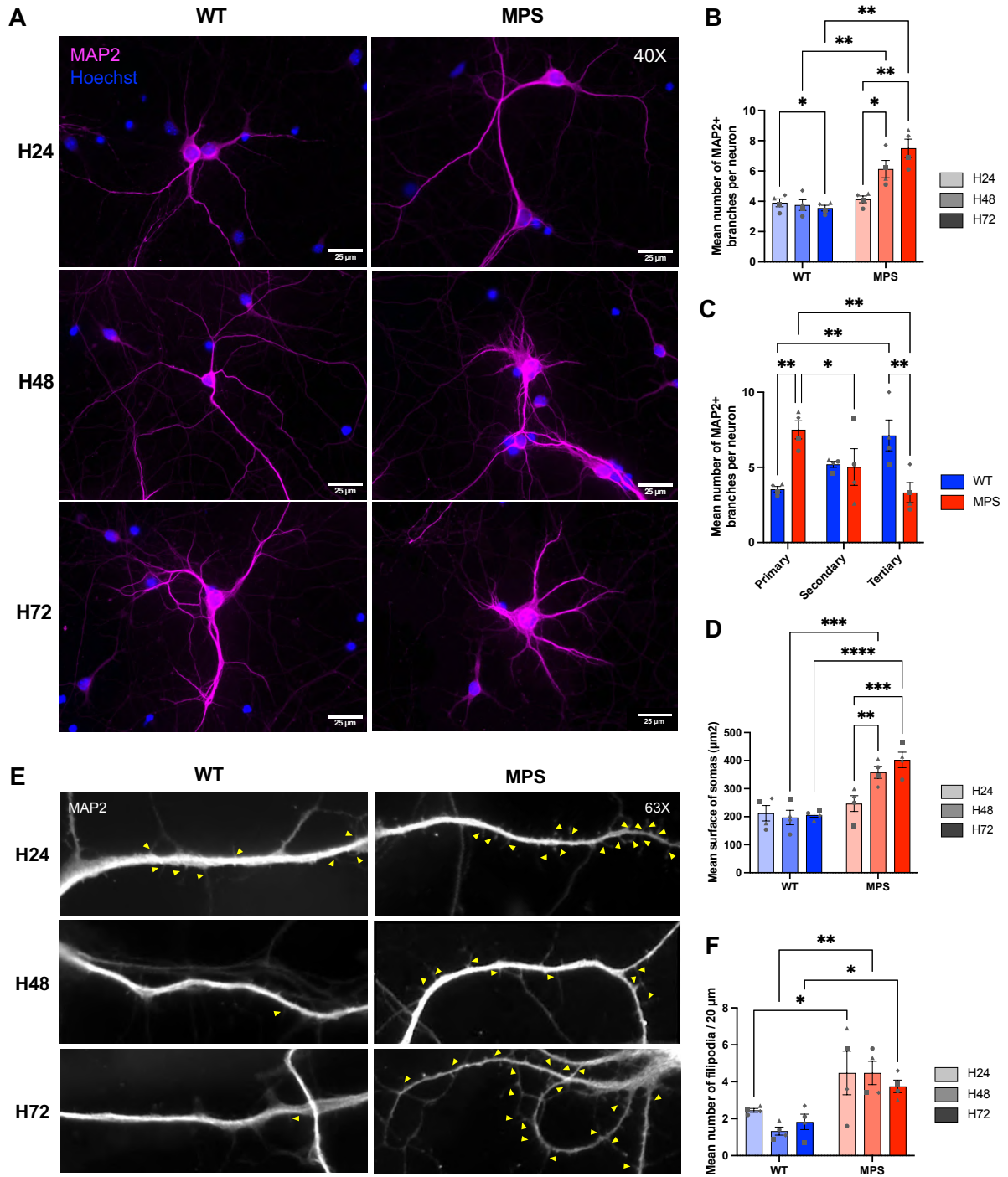


Fig. 7. Characterization of MAP2+ dendrites on primary cortical neurons treated with WT- or MPS-EVs.

(A) Representative images of 1 or 2 neurons (40X objective). (B) The number of short MAP2+ dendritic branches increased progressively in the MPS condition. (C) Quantification of the number of primary and tertiary branches per neurons revealed an overall decrease in the complexity of the dendritic arborization in neurons treated with MPS-EVs after 72h. (D) Quantification of the soma's surface area revealed the progressive swelling of neurons treated with MPS-EVs. (B-D) Quantification of somatodendritic variables from 10 neurons per n. (E) Representative images of dendrites (63X objective) with filipodia spines (>2 μm, yellow arrowheads), showing an increase the number of filipodia per dendrite in neurons treated with MPS-EVs. (F) The number of immature dendritic spines increased in neurons treated with

PARTIE EXPÉRIMENTALE

MPS-EVs. The filipodia were analyzed 30 μm away from the soma on 20- μm -long MAP2+ segments. Data from 10 dendrites from 5-10 neurons were expressed as the mean value per n. (A-F) Neurons were treated with WT-EVs (WT, in blue) or MPS-EVs (MPS, in red) for 24h (H24, in light grey), 48h (H48, in medium grey) or 72h (H72, in dark grey). Neurons were stained with an anti-MAP2 antibody coupled to Alexa FluorTM 568 (in pink in A and in white in E) and nuclei were stained with Hoechst 33342 (in blue). Scale bar = 25 μm (A), 20 μm (E). Two-way ANOVA, n=4 biological replicates (each point represents 1 n), * = $p \leq 0.05$; ** = $p \leq 0.01$; *** = $p \leq 0.001$; **** = $p \leq 0.0001$.

Similarly, comparative proteomic analyses revealed that all the proteins enriched in MPS III-EVs were involved in the inflammatory response or immune cell recruitment. In particular, some of these proteins were part of the *Toll-like receptor signaling, and lipopeptide binding* PPI network. This inflammatory protein and miRNA cargo is consistent with the reported ability of HS and HSOs to promote an innate immune response. The induction of the pro-inflammatory cytokine release by HS fragments (via interactions with TLR4) has been observed under physiological conditions *in vitro* (47,48). Furthermore, we have shown previously that HSOs can activate microglia through the TLR4/MyD88 pathway (9,16). In both Naglu/Tlr4 and Naglu/Myd88 double-knockout mice, the onset of brain inflammation was delayed for several months when compared with MPS IIIB mice. In MPS VII, inactivation of TLR4 pathway in GusB/Tlr4 double-knock-out mice corrects many biochemical and clinical features of the disease (49).

Interestingly, most of the proteins that were less abundant in MPS III microglial EVs turned out to be involved in neuronal development mechanisms, axonogenesis, gliogenesis, or dendritic spine morphogenesis. Furthermore, a PPI network analysis identified the *Axon guidance and basigin-like* and *Toll-like signaling, and lipopeptide binding* protein networks. It is widely acknowledged that miRNA expression is inversely related to target gene expression. In the light of the results from our expression pairing analysis, we looked at whether the predicted mRNA targets were truly downregulated *in vivo* by using the published differential mRNA expression dataset for the hippocampus of the mouse model of MPS III C (20). The resulting canonical pathway analysis of genes targeted by the four miRNAs revealed that *Myelination, Huntington's disease* and *Synaptogenesis* were the top pathways in terms of both predicted mRNA targets and the transcriptomic analysis of MPS IIIC hippocampi. It is notable that miR-100-5p (which regulates genes closely involved in neuronal development) has not previously been found to be upregulated in EVs secreted by microglia. Interestingly, Li et al. reported that following spinal cord injury, miR-100 attenuates the inflammatory activation of

PARTIE EXPÉRIMENTALE

microglia (by inhibiting the TLR4/NF- κ B pathway and neuronal tissue apoptosis) and improves motor function (50).

Our comprehensive characterization of the cargo of microglia-derived EVs (by combining proteomics and transcriptomics) reflected the microglia's multiple functions as a CNS immune cell and as a support for neurons. Moreover, our results suggest that these two roles are altered in MPS III-microglia: the latter's small and large EVs are enriched in proteins with a role in inflammatory processes and lack proteins involved in neuronal development. Concordantly, the abundant miRNAs in these EVs can regulate genes involved in the same biological pathways.

We have shown previously that inactivation of the TLR4-MyD88 pathway in MPS IIIB mice suppressed early-onset neuroinflammation but did not prevent neurologic disease (9). We therefore hypothesize that microglial EVs that lack neurotrophic molecules have a role in the progression of neurodegeneration.

According to the literature data, this molecular profile appears to be very specific for EVs secreted by MPS III microglia. Hence, the cargo might be harmful for the recipient cells. This was further demonstrated by treating primary cortical neurons with EVs secreted by microglia exposed to HSOs isolated from the urine of patients with MPS III.

4.2 MPS III microglia-derived EVs impair dendrite arborization in primary cortical neurons

When immunostaining the neuronal cytoskeleton and the somatodendritic compartment with anti- β III-tubulin and anti-MAP2 antibodies respectively, we observed significant, similar decreases over time in the numbers of neurites and dendrites in neurons treated with MPS III-microglia-EVs (MPS III-Mg-EVs). We next characterized the dendrites' arborization. Interestingly, we found that neurons treated with MPS III-Mg-EVs presented fewer tertiary branches and more primary dendrites. Furthermore, the primary dendrites were shorter (i.e. closer to soma). These experiments demonstrated that exposure to MPS III-Mg-EVs was associated with a less complex arborization – mainly due to fewer tertiary branches. Interestingly, similar observations have been made in models of MPS III. Hocquemiller et al. reported defects in dendritic arborization in live primary cortical neurons of MPS IIIB mice (41). More recently, a decrease in neurites length was also reported in primary hippocampal neurons of MPS IIIC mice. Pará et al. also showed that in pyramidal neurons, the number of dendritic spines was low while the number of immature dendritic spines was high. We also

PARTIE EXPÉRIMENTALE

observed that primary cortical neurons treated with MPS III-Mg-EVs had a greater number of immature dendritic spines, suggesting that a low number of synapses could impair neuronal transmission. Indeed, MPS IIIC neurons presented early abnormalities in synaptic structure and neurotransmission as a result of impaired synaptic vesicular transport (51).

A time-dependent increase in the soma surface area (described in the literature as “swelling” or “ballooning”) was observed in neurons treated with MPS III-Mg-EVs. This is a histological feature of neurodegeneration and has been reported in tauopathies. For example, the accumulation of abnormal cytoskeletal components (e.g. the formation of neurofibrillary tangles in AD and the formation of Lewy bodies) can cause swelling of the cell body. In metabolic diseases, accumulation of storage material reportedly induce neuron swelling, and swollen neurons have been reported in the brains of patients with MPS IIIB (52) and in the canine model of MPS IIIB (53).

Under pathological conditions, the uptake of microglia-derived EVs reportedly impairs neuronal functions. Recently, Prada et al. showed *in vitro* that EVs from pro-inflammatory microglia can affect neuronal transmission, with a lower density of mature dendritic spines (29). Small EVs from TREM2 AD risk variant iPSC-microglia were less able to promote the outgrowth of neuronal processes (30). The striatal injection of exosomes isolated from α -synuclein-treated microglia induced neurodegeneration in the nigrostriatal pathway of injected mice (26). Furthermore, EVs derived from the brains of patients with AD are known to transport tau proteins and mediate the dysfunction of GABAergic interneurons (27,54). In these studies, the effect of EVs was mainly attributed to the transmission of the abnormal protein to the neuron. We cannot attribute the effects observed in our study to the transport of HSO by EVs; in the *in vitro* model used here, the HSOs purified from the urine of patients with MPS III were added extracellularly and were unlikely to accumulate in the way seen in the mouse models of MPS III. It would be therefore very interesting to determine *in vivo* whether MPS III-Mg-EVs transport HS fragments. This could be measured using a very sensitive LC-MS/MS system.

Our results showed that the characteristic cargo of MPS III-Mg-EVs can induce a MPS III-like phenotype in the recipient naive neurons - probably through the impairment of neurotransmission. Indeed, our results strongly suggest that in patients with MPS III, microglia-derived EVs accentuate inflammation and neuronal dysfunction. The present study is the first

PARTIE EXPÉRIMENTALE

to have characterized the content of MPS III-Mg-EVs. We observed a disease-associated signature and provided a framework for further studies of patient-derived, cell-type-specific EVs and their potential value as biomarkers of the response to treatment of MPS III.

Abbreviations

AD : Alzheimer's disease

ADAM10 : A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10

CNS : Central nervous system

CPM : count per million

EV : Extracellular Vesicles

FDR : False discovery rate

GAGs : Glycosaminoglycans

HSOs : Heparan Sulfate Oligosaccharides

HSPGs : Heparan Sulfate Proteoglycans

IPA : Ingenuity Pathway analysis

Lamp1 : Lysosomal Associated Membrane Protein 1

LC-MS/MS : Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry

LSD : Lysosomal Storage Disease

MAP2 : microtubule-associated protein 2

miRNA : microRNA

MPS III : Mucopolysaccharidosis type III

MyD88 : Myeloid differentiation primary response 88

NTA : Nanoparticle tracking analysis

PPI : protein-protein interaction

SEM : standard error of the mean

STRING : Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins

TEM : Transmission Electron microscopy

TfR : Transferrin receptor

TLR : Toll-like receptor

TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

WT : Wild type

References

1. Benetó N, Vilageliu L, Grinberg D, Canals I. Sanfilippo Syndrome: Molecular Basis, Disease Models and Therapeutic Approaches. *IJMS*. 22 oct 2020;21(21):7819.
2. Héron B, Mikaeloff Y, Froissart R, Caridade G, Maire I, Caillaud C, et al. Incidence and natural history of mucopolysaccharidosis type III in France and comparison with United Kingdom and Greece. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2011;155(1):58-68.
3. Kong W, Yao Y, Zhang J, Lu C, Ding Y, Meng Y. Update of treatment for mucopolysaccharidosis type III (sanfilippo syndrome). *Eur J Pharmacol*. 5 déc 2020;888:173562.
4. Tardieu M, Zérah M, Gougeon ML, Ausseil J, de Bournonville S, Husson B, et al. Intracerebral gene therapy in children with mucopolysaccharidosis type IIIB syndrome: an uncontrolled phase 1/2 clinical trial. *The Lancet Neurology*. sept 2017;16(9):712-20.
5. Deiva K, Ausseil J, de Bournonville S, Zérah M, Husson B, Gougeon ML, et al. Intracerebral Gene Therapy in Four Children with Sanfilippo B Syndrome: 5.5-Year Follow-Up Results. *Human Gene Therapy*. oct 2021;32(19-20):1251-9.
6. Mandolfo O, Parker H, Bigger B. Innate Immunity in Mucopolysaccharide Diseases. *IJMS*. 11 févr 2022;23(4):1999.
7. Ryazantsev S, Yu WH, Zhao HZ, Neufeld EF, Ohmi K. Lysosomal Accumulation of SCMAS (Subunit c of Mitochondrial ATP Synthase) in Neurons of the Mouse Model of Mucopolysaccharidosis III B. *Mol Genet Metab*. avr 2007;90(4):393-401.
8. Roy E, Bruyère J, Flamant P, Bigou S, Ausseil J, Vitry S, et al. GM130 gain-of-function induces cell pathology in a model of lysosomal storage disease. *Human Molecular Genetics*. 1 avr 2012;21(7):1481-95.
9. Ausseil J, Desmaris N, Bigou S, Attali R, Corbineau S, Vitry S, et al. Early Neurodegeneration Progresses Independently of Microglial Activation by Heparan Sulfate in the Brain of Mucopolysaccharidosis IIIB Mice. *El Khoury J, éditeur. PLoS ONE*. 28 mai 2008;3(5):e2296.
10. Heon-Roberts R, Nguyen ALA, Pshezhetsky AV. Molecular Bases of Neurodegeneration and Cognitive Decline, the Major Burden of Sanfilippo Disease. *Journal of Clinical Medicine*. févr 2020;9(2):344.
11. Ginsberg SD, Galvin JE, Lee VMY, Rorke LB, Dickson DW, Wolfe JH, et al. Accumulation of Intracellular Amyloid- β Peptide (A β 1–40) in Mucopolysaccharidosis Brains. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 1 août 1999;58(8):815-24.
12. Beard H, Hassiotis S, Gai WP, Parkinson-Lawrence E, Hopwood JJ, Hemsley KM. Axonal dystrophy in the brain of mice with Sanfilippo syndrome. *Exp Neurol*. sept 2017;295:243-55.
13. Bigger BW, Begley DJ, Virgintino D, Pshezhetsky AV. Anatomical changes and pathophysiology of the brain in mucopolysaccharidosis disorders. *Molecular Genetics and Metabolism*. 1 déc 2018;125(4):322-31.
14. Snow AD, Cummings JA, Lake T. The Unifying Hypothesis of Alzheimer's Disease: Heparan Sulfate Proteoglycans/Glycosaminoglycans Are Key as First Hypothesized Over 30 Years Ago. *Front Aging Neurosci*. 2021;13:710683.
15. Winder-Rhodes SE, Garcia-Reitböck P, Ban M, Evans JR, Jacques TS, Kempainen A, et al. Genetic and pathological links between Parkinson's disease and the lysosomal disorder Sanfilippo syndrome. *Movement Disorders*. 2012;27(2):312-5.
16. Puy V, Darwiche W, Trudel S, Gomila C, Lony C, Puy L, et al. Predominant role of microglia in brain iron retention in Sanfilippo syndrome, a pediatric neurodegenerative disease. *Glia*. août 2018;66(8):1709-23.
17. Egeland MT, Tarczyluk-Wells MM, Asmar MM, Adintori EG, Lawrence R, Snella EM, et al. Central nervous system pathology in preclinical MPS IIIB dogs reveals progressive changes in clinically relevant brain regions. *Sci Rep*. 23 nov 2020;10:20365.
18. Wilkinson FL, Holley RJ, Langford-Smith KJ, Badrinath S, Liao A, Langford-Smith A, et al. Neuropathology in Mouse Models of Mucopolysaccharidosis Type I, IIIA and IIIB. *Kremer EJ, éditeur. PLoS ONE*. 27 avr 2012;7(4):e35787.
19. Ohmi K, Greenberg DS, Rajavel KS, Ryazantsev S, Li HH, Neufeld EF. Activated microglia in cortex of mouse models of mucopolysaccharidoses I and IIIB. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 18 févr

PARTIE EXPÉRIMENTALE

2003;100(4):1902-7.

20. Pan X, Taherzadeh M, Bose P, Heon-Roberts R, Nguyen ALA, Xu T, et al. Glucosamine amends CNS pathology in mucopolysaccharidosis IIIC mouse expressing misfolded HGSNAT. *Journal of Experimental Medicine*. 15 juin 2022;219(8):e20211860.
21. Winner LK, Rogers ML, Snel MF, Hemsley KM. Biomarkers for predicting disease course in Sanfilippo syndrome: An urgent unmet need in childhood-onset dementia. *Journal of Neurochemistry*. 2023;166(3):481-96.
22. Trudel S, Trécherel E, Gomila C, Peltier M, Aubignat M, Gubler B, et al. Oxidative stress is independent of inflammation in the neurodegenerative Sanfilippo syndrome type B. *J Neurosci Res*. mars 2015;93(3):424-32.
23. Parker H, Ellison SM, Holley RJ, O'Leary C, Liao A, Asadi J, et al. Haematopoietic stem cell gene therapy with IL-1Ra rescues cognitive loss in mucopolysaccharidosis IIIA. *EMBO Mol Med*. 6 mars 2020;12(3):e11185.
24. Arfi A, Richard M, Gandolphe C, Bonnefont-Rousselot D, Théron P, Scherman D. Neuroinflammatory and oxidative stress phenomena in MPS IIIA mouse model: the positive effect of long-term aspirin treatment. *Mol Genet Metab*. mai 2011;103(1):18-25.
25. Asai H, Ikezu S, Tsunoda S, Medalla M, Luebke J, Haydar T, et al. Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nat Neurosci*. nov 2015;18(11):1584-93.
26. Guo M, Wang J, Zhao Y, Feng Y, Han S, Dong Q, et al. Microglial exosomes facilitate α -synuclein transmission in Parkinson's disease. *Brain*. 1 mai 2020;143(5):1476-97.
27. Ruan Z, Pathak D, Venkatesan Kalavai S, Yoshii-Kitahara A, Muraoka S, Bhatt N, et al. Alzheimer's disease brain-derived extracellular vesicles spread tau pathology in interneurons. *Brain*. 12 févr 2021;144(1):288-309.
28. Chang C, Lang H, Geng N, Wang J, Li N, Wang X. Exosomes of BV-2 cells induced by alpha-synuclein: Important mediator of neurodegeneration in PD. *Neuroscience Letters*. août 2013;548:190-5.
29. Prada I, Gabrielli M, Turola E, Iorio A, D'Arrigo G, Parolisi R, et al. Glia-to-neuron transfer of miRNAs via extracellular vesicles: a new mechanism underlying inflammation-induced synaptic alterations. *Acta Neuropathol*. 1 avr 2018;135(4):529-50.
30. Mallach A, Gobom J, Arber C, Piers TM, Hardy J, Wray S, et al. Differential Stimulation of Pluripotent Stem Cell-Derived Human Microglia Leads to Exosomal Proteomic Changes Affecting Neurons. *Cells*. nov 2021;10(11):2866.
31. Upadhyia R, Madhu LN, Attaluri S, Gitai DLG, Pinson MR, Kodali M, et al. Extracellular vesicles from human iPSC-derived neural stem cells: miRNA and protein signatures, and anti-inflammatory and neurogenic properties. *J Extracell Vesicles*. 26 août 2020;9(1):1809064.
32. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 11 oct 2014;30(1):255-89.
33. van Niel G, Carter DRF, Clayton A, Lambert DW, Raposo G, Vader P. Challenges and directions in studying cell-cell communication by extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. mai 2022;23(5):369-82.
34. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, 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. *Journal of Extracellular Vesicles*. 1 déc 2018;7(1):1535750.
35. Welsh JA, Goberdhan DCI, O'Driscoll L, Buzas EI, Blenkiron C, Bussolati B, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *J Extracell Vesicles*. févr 2024;13(2):e12404.
36. Dai X jing, Li N, Yu L, Chen Z yang, Hua R, Qin X, et al. Activation of BV2 microglia by lipopolysaccharide triggers an inflammatory reaction in PC12 cell apoptosis through a toll-like receptor 4-dependent pathway. *Cell Stress Chaperones*. mars 2015;20(2):321-31.
37. Nam HY, Nam JH, Yoon G, Lee JY, Nam Y, Kang HJ, et al. Ibrutinib suppresses LPS-induced neuroinflammatory responses in BV2 microglial cells and wild-type mice. *Journal of Neuroinflammation*. 19 sept 2018;15(1):271.
38. Kong J, Du Z, Dong L. Pinitol Prevents Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Inflammatory Responses in BV2 Microglia Mediated by TREM2. *Neurotox Res*. 1 juin 2020;38(1):96-104.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

39. Shao QH, Yan WF, Zhang Z, Ma KL, Peng SY, Cao YL, et al. Nurr1: A vital participant in the TLR4-NF- κ B signal pathway stimulated by α -synuclein in BV-2 cells. *Neuropharmacology*. 1 janv 2019;144:388-99.
40. Vitry S, Ausseil J, Hocquemiller M, Bigou S, Dos Santos Coura R, Heard JM. Enhanced degradation of synaptophysin by the proteasome in mucopolysaccharidosis type IIIB. *Mol Cell Neurosci*. mai 2009;41(1):8-18.
41. Hocquemiller M, Vitry S, Bigou S, Bruyère J, Ausseil J, Heard JM. GAP43 overexpression and enhanced neurite outgrowth in mucopolysaccharidosis type IIIB cortical neuron cultures: GAP43 and Enhanced Neurite Overgrowth in MPSIIIB. *J Neurosci Res*. janv 2010;88(1):202-13.
42. Bruyère J, Roy E, Ausseil J, Lemonnier T, Teyre G, Bohl D, et al. Heparan Sulfate Saccharides Modify Focal Adhesions: Implication in Mucopolysaccharidosis Neuropathophysiology. *Journal of Molecular Biology*. févr 2015;427(4):775-91.
43. Mallach A, Gobom J, Zetterberg H, Hardy J, Piers TM, Wray S, et al. The influence of the R47H triggering receptor expressed on myeloid cells 2 variant on microglial exosome profiles. *Brain Commun*. 2021;3(2):fcab009.
44. Cohn W, Melnik M, Huang C, Teter B, Chandra S, Zhu C, et al. Multi-Omics Analysis of Microglial Extracellular Vesicles From Human Alzheimer's Disease Brain Tissue Reveals Disease-Associated Signatures. *Front Pharmacol* [Internet]. 2 déc 2021 [cité 8 mars 2024];12. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2021.766082/full>
45. Cunha C, Gomes C, Vaz AR, Brites D. Exploring New Inflammatory Biomarkers and Pathways during LPS-Induced M1 Polarization. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:6986175.
46. Li Y, Liu Z, Song Y, Pan J, Ji, Jiang Y, Shi X, et al. M2 microglia-derived extracellular vesicles promote white matter repair and functional recovery via miR-23a-5p after cerebral ischemia in mice. *Theranostics*. 2022;12(7):3553-73.
47. Goodall KJ, Poon IKH, Phipps S, Hulett MD. Soluble Heparan Sulfate Fragments Generated by Heparanase Trigger the Release of Pro-Inflammatory Cytokines through TLR-4. *PLOS ONE*. 8 oct 2014;9(10):e109596.
48. Johnson GB, Brunn GJ, Kodaira Y, Platt JL. Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *J Immunol*. 15 mai 2002;168(10):5233-9.
49. Simonaro CM, Ge Y, Eliyahu E, He X, Jepsen KJ, Schuchman EH. Involvement of the Toll-like receptor 4 pathway and use of TNF- α antagonists for treatment of the mucopolysaccharidoses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 5 janv 2010;107(1):222-7.
50. Li XH, Fu NS, Xing ZM. MiR-100 suppresses inflammatory activation of microglia and neuronal apoptosis following spinal cord injury via TLR4/NF- κ B pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. oct 2019;23(20):8713-20.
51. Pará C, Bose P, Bruno L, Freemantle E, Taherzadeh M, Pan X, et al. Early defects in mucopolysaccharidosis type IIIC disrupt excitatory synaptic transmission. *JCI Insight* [Internet]. 22 juin 2021 [cité 3 oct 2022]; Disponible sur: <http://insight.jci.org/articles/view/142073>
52. Hamano K, Hayashi M, Shioda K, Fukatsu R, Mizutani S. Mechanisms of neurodegeneration in mucopolysaccharidoses II and IIIB: analysis of human brain tissue. *Acta Neuropathol*. 1 mai 2008;115(5):547-59.
53. Harm TA, Hostetter SJ, Nennering AS, Valentine BN, Ellinwood NM, Smith JD. Temporospatial Development of Neuropathologic Findings in a Canine Model of Mucopolysaccharidosis IIIB. *Vet Pathol*. janv 2021;58(1):205-22.
54. Gabrielli M, Raffaele S, Fumagalli M, Verderio C. The multiple faces of extracellular vesicles released by microglia: Where are we 10 years after? *Frontiers in Cellular Neuroscience* [Internet]. 2022 [cité 6 nov 2023];16. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2022.984690>
55. Piraud M, Boyer S, Mathieu M, Maire I. Diagnosis of mucopolysaccharidoses in a clinically selected population by urinary glycosaminoglycan analysis: a study of 2,000 urine samples. *Clinica Chimica Acta*. 5 mai 1993;221:11.
56. Van Deun J, Mestdagh P, Agostinis P, Akay Ö, Anand S, Anckaert J, et al. EV-TRACK: transparent reporting and centralizing knowledge in extracellular vesicle research. *Nat Methods*. mars 2017;14(3):228-32.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

57. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Current Protocols in Cell Biology* [Internet]. mars 2006 [cité 3 oct 2022];30(1). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471143030.cb0322s30>
58. Bergamelli M, Martin H, Bénard M, Ausseil J, Mansuy JM, Hurbain I, et al. Human Cytomegalovirus Infection Changes the Pattern of Surface Markers of Small Extracellular Vesicles Isolated From First Trimester Placental Long-Term Histocultures. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:689122.
59. Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci USA* [Internet]. 23 févr 2016 [cité 3 oct 2022];113(8). Disponible sur: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1521230113>
60. Bosch S, de Beaupaire L, Allard M, Mosser M, Heichette C, Chrétien D, et al. Trehalose prevents aggregation of exosomes and cryodamage. *Sci Rep.* déc 2016;6(1):36162.
61. Görgens A, Corso G, Hagey DW, Jawad Wiklander R, Gustafsson MO, Felldin U, et al. Identification of storage conditions stabilizing extracellular vesicles preparations. *J Extracell Vesicles.* juin 2022;11(6):e12238.
62. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol.* déc 2008;26(12):1367-72.
63. Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T, et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods.* sept 2016;13(9):731-40.
64. Ferré CA, Davezac N, Thouard A, Peyrin JM, Belenguer P, Miquel MC, et al. Manipulation of the N-terminal sequence of the Borna disease virus X protein improves its mitochondrial targeting and neuroprotective potential. *FASEB J.* avr 2016;30(4):1523-33.
65. Langhammer CG, Previtera ML, Sweet ES, Sran SS, Chen M, Firestein BL. Automated Sholl analysis of digitized neuronal morphology at multiple scales: Whole cell Sholl analysis versus Sholl analysis of arbor subregions. *Cytometry Part A.* 2010;77A(12):1160-8.

Supplementary material

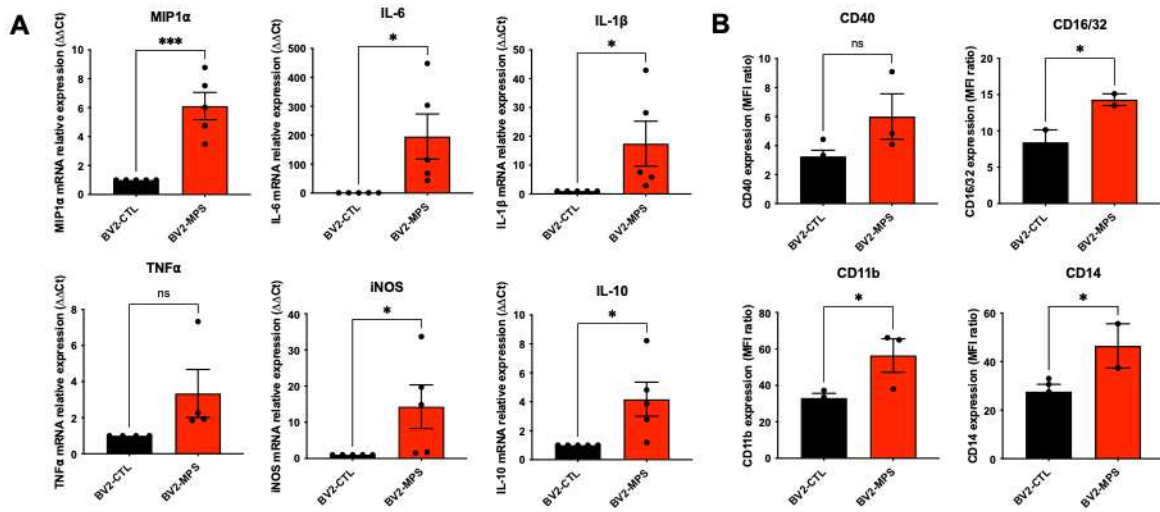


Fig. S1. Pro-inflammatory activation of BV-2 cells by GAGs extracted from urine of patients with MPS III

(A) An RT-qPCR analysis confirmed higher mRNA expression levels for MIP1α ($p=0.0003$), IL-6 ($p=0.0186$), IL-1β ($p=0.0335$), TNFα ($p=0.0643$), iNOS ($p=0.0291$), and IL-10 ($p=0.0137$) in BV-2-MPS cells. (B) Flow cytometry analysis revealed higher protein expression levels for the myeloid surface markers CD16/32 ($p=0.0322$), CD11b ($p=0.0314$) and CD14 ($p=0.0199$) in BV-2-MPS cells. (A-B) BV2 cells treated with MPS III GAG (BV2-MPS, in red) were compared with BV-2 cells treated with vehicle only (BV2-CTL, black) in bar plots. Unpaired t-test, $n=2-5$ biological replicates (each point represents 1 n), one-tailed p -value, $ns = p > 0.05$; $* = p \leq 0.05$; $** = p \leq 0.01$; $*** = p \leq 0.001$.

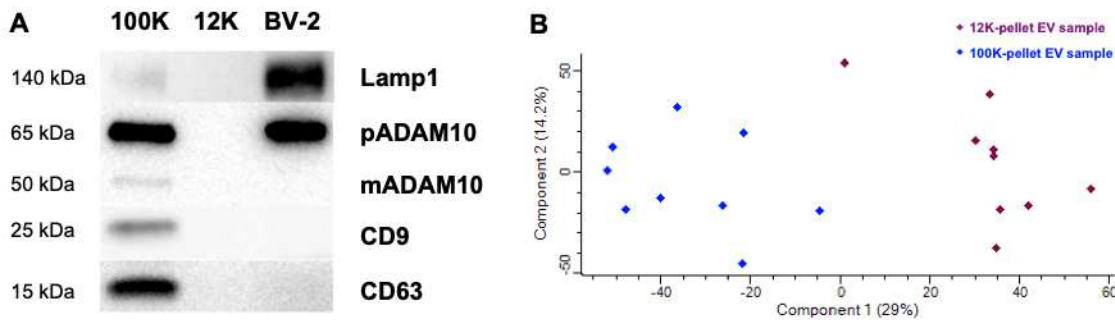


Fig S2. Quality check on proteins from large and small EVs.

(A) Western blots performed with CTL-100k EVs (100k), CTL-12k EVs (12k) and BV-2 cell lysates (BV-2) revealed the enrichment of specific EV protein markers CD9, CD63, pADAM10 and LAMP1 in CTL-100k EVs. (B) The results of a principal component analysis of the EV sample quality check, showing that the 12k-EV population (in brown) and the 100k-EV population (in blue) clustered together.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

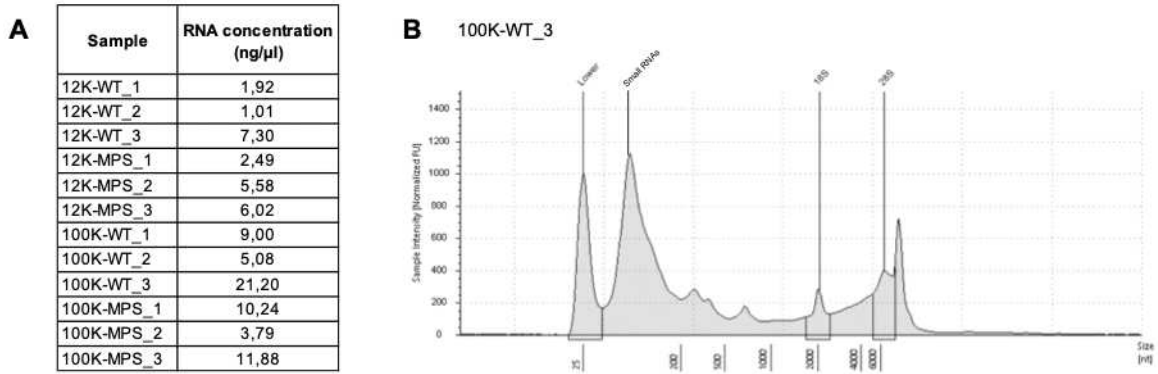


Fig. S3. Quality check of RNA samples from large and small EVs.

(A) Before sequencing, total RNA was quantified using a Qubit Fluorometer (Illumina QIAseq). (B) A representative total RNA electrophoresis profile evaluated on an Agilent 4150 TapeStation, showing the presence of small RNAs. Peaks from left to right: lower marker, small RNAs, ribosomal 18S and 28S RNAs.

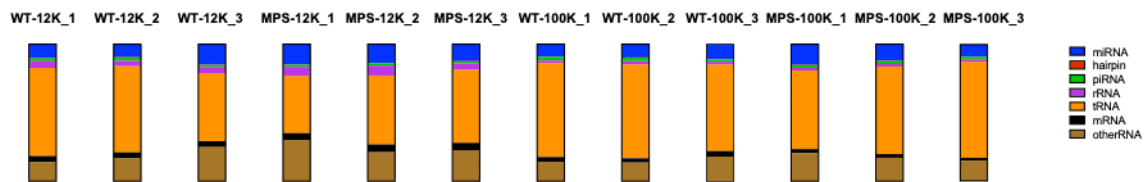


Fig. S4. Proportion of different types of RNA in EV samples. Transfer RNAs and miRNAs were the most frequent RNAs. The figure shows miRNAs (in blue), hairpins (in red), piRNAs (in green), rRNAs (in purple), tRNAs (in orange), mRNAs (in black), and other RNAs (in brown).

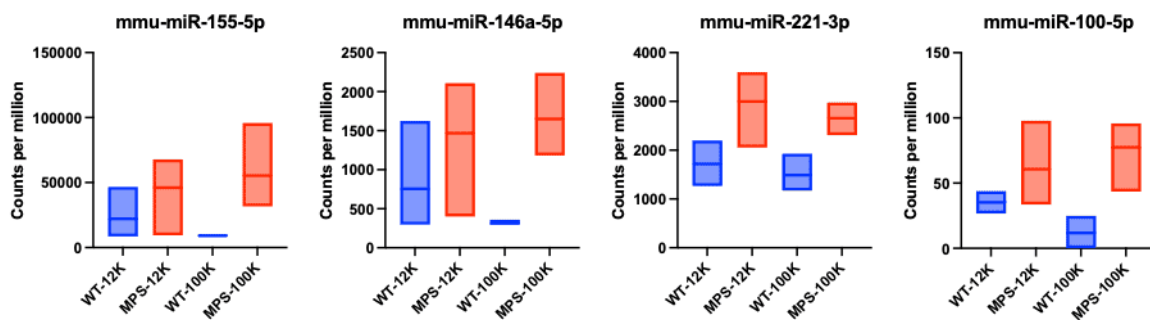


Fig. S5. Counts per million for the four miRNAs enriched in MPS-EVs (represented as violin plots). EVs were collected from conditioned media from BV-2 cells treated with WT-GAGs (WT, blue), MPS III-GAGs (MPS, red), and the RNA was extracted from the 12k pellet (12k) or the 100k pellet (100k). n=3 biological replicates (each bar of the violin plot represents 1 n).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

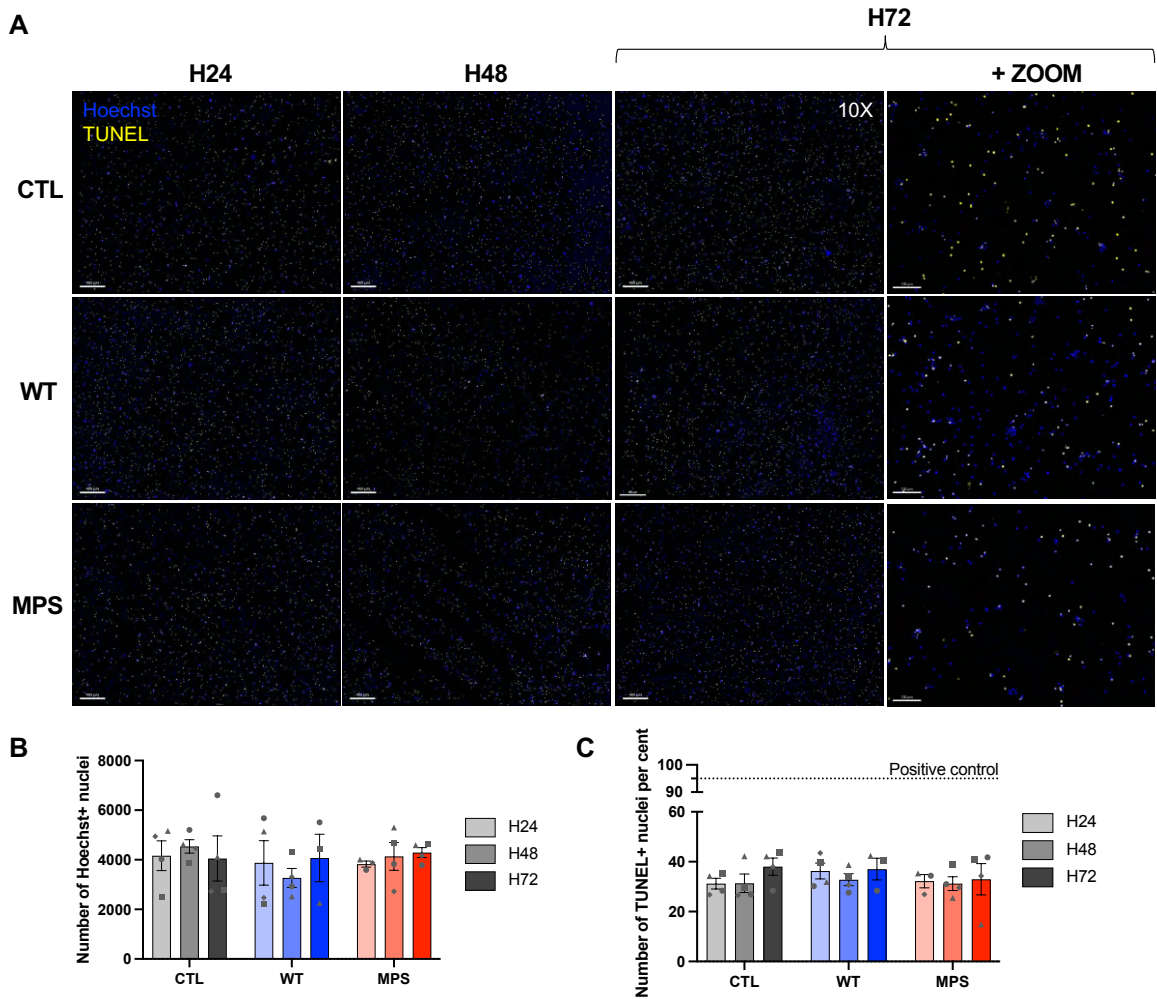


Fig. S6. DAPI staining and TUNEL assay results for neurons exposed to EVs

(A) Representative wide-field images of 25-square stitched mosaics (10X objective) of neurons treated with WT-EVs (WT), MPS-EVs (MPS) or with trehalose (CTL) for 24 hours (H24), 48 hours (H48) or 72 hours (H72). The nuclei were stained with Hoechst 33342 reagent (in cyan) or Alexa Fluor™ 488 dye (in yellow) when combined with a TUNEL assay. Scale bars = 400 μ m for the main images and 100 μ m for insets. (B) Exposure to EVs did not lead to a decrease in the number of Hoechst+ nuclei. (C) Quantification of colocalized TUNEL+ and Hoechst+ nuclei showed that EVs do not have an apoptotic effect on neurons. (B, C) Neurons treated with trehalose (CTL, grey), WT-EVs (WT, blue) or MPS-EVs (MPS, red) after 24 hours (H24, in light grey), 48 hours (H48, in medium grey) or 72 hours (H72, in dark grey) of treatment. Two-way ANOVA, n=4 (each point represents 1 n).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Table S1. List of specific protein markers of large and small EVs, as identified by mass spectrometry.

Gene names	Protein distribution in pellets	Uniprot IDs	Protein names
Actn4	12K	P57780	Alpha-actinin-4
Hsp90b1	12K	P08113	Endoplasmic
Hspa1a; Hspa1b	12K	Q61696;P17879	Heat shock 70 kDa protein 1A;Heat shock 70 kDa protein 1B
Immt	12K	Q8CAQ8	MICOS complex subunit Mic60
Abcc1	Both	Q35379	Multidrug resistance-associated protein 1
Aradc1	Both	Q99KN1	Arrestin domain-containing protein 1
Bsg	Both	P18572	Basigin
CD63	Both	P41731	CD63 antigen
CD82	Both	P40237	CD82 antigen
CD9	Both	P40240	CD9 antigen
Flot1	Both	O08917	Flotillin-1
Hspa8	Both	P63017	Heat shock cognate 71 kDa protein
Hspg2	Both	Q05793	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein;Endorepellin;LG3 peptide
Itga4	Both	Q00651	Integrin alpha-4
Itga5	Both	P11688	Integrin alpha-5;Integrin alpha-5 heavy chain;Integrin alpha-5 light chain
Itga6	Both	Q61739	Integrin alpha-6;Integrin alpha-6 heavy chain;Integrin alpha-6 light chain
Itgal	Both	P24063	Integrin alpha-L
Itgam	Both	P05555	Integrin alpha-M
Itgav	Both	P43406	Integrin alpha-V;Integrin alpha-V heavy chain;Integrin alpha-V light chain
Itgax	Both	Q9QXH4	Integrin alpha-X
Itgb1	Both	P09055	Integrin beta-1
Itgb2	Both	P11835	Integrin beta-2
Itgb7	Both	P26011	Integrin beta-7
Lamp1	Both	P11438	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1
Rhoa	Both	Q9QU10	Transforming protein RhoA
Sdc1	Both	P18828	Syndecan-1
Sdc3	Both	Q64519	Syndecan-3
Sdc4	Both	Q35988	Syndecan-4
Sdcbp	Both	O08992	Syntenin-1
Tfrc	Both	Q62351	Transferrin receptor protein 1
Vps4b	Both	P46467	Vacuolar protein sorting-associated protein 4B
Anxa2	100K	P07356	Annexin A2
Anxa3	100K	O35639	Annexin A3
Anxa5	100K	P48036	Annexin A5
Anxa8	100K	O35640	Annexin A8
Adam10	100K	O35598	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10
Anxa1	100K	P10107	Annexin A1
Anxa11	100K	P97384	Annexin A11
Anxa4	100K	P97429	Annexin A4
Anxa6	100K	P14824	Annexin A6
Anxa7	100K	Q07076	Annexin A7
CD81	100K	P35762	CD81 antigen
Pdcd6ip	100K	Q9WU78	Programmed cell death 6-interacting protein
Tsg101	100K	Q61187	Tumor susceptibility gene 101 protein

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Table S2. Number of reads and percentage of different types of RNA from each EV sample.
The data were produced by the Legacy Analysis Pipeline on the QIAGEN GeneGlobe portal.

Reads set	12K-WT_1		12K-WT_2		12K-WT_3		12K-MPS_1		12K-MPS_2		12K-MPS_3	
	Reads number	%	Reads number	%	Reads number	%	Reads number	%	Reads number	%	Reads number	%
total_reads	14 171 376	100	14 028 393	100	12 142 987	100	14 542 659	100	11 742 528	100	14 622 539	100
no_adapter_reads	661 606	5	921 381	7	1 195 919	10	750 957	5	840 160	7	747 963	5
too_short_reads	2 529 611	18	3 055 470	22	1 842 653	15	2 488 025	17	1 924 101	16	2 288 878	16
UMI_defective_reads	914 853	6	1 277 084	9	1 865 634	15	1 625 728	11	1 397 566	12	1 731 679	12
Total reads - defaults	10 065 306	71	8 774 458	63	7 238 781	60	9 677 949	67	7 580 701	65	9 854 019	67
miRNA_Reads	733 705	5	523 473	4	798 777	7	1 121 081	8	776 996	7	869 015	6
hairpin_Reads	11 993	0	14 180	0	14 881	0	14 318	0	12 703	0	13 329	0
piRNA_Reads	145 270	1	121 959	1	71 946	1	118 187	1	86 358	1	114 866	1
rRNA_Reads	366 310	3	215 689	2	234 357	2	505 560	3	404 048	3	326 975	2
tRNA_Reads	4 632 323	33	3 425 267	24	2 643 947	22	3 168 072	22	2 820 223	24	3 773 447	26
mRNA_Reads	328 920	2	225 739	2	233 529	2	378 021	3	316 174	3	381 509	3
otherRNA_Reads	1 002 687	7	925 160	7	1 328 657	11	2 286 748	16	1 192 253	10	1 605 922	11
notCharacterized_Mappable	848 410	6	948 710	7	591 278	5	689 948	5	617 793	5	806 159	6
notCharacterized_notMappable	1 995 688	14	2 374 281	17	1 321 409	11	1 416 014	10	1 354 153	12	1 962 797	13

Reads set	100K-WT_1		100K-WT_2		100K-WT_3		100K-MPS_1		100K-MPS_2		100K-MPS_3	
	Reads number	%	Reads number	%	Reads number	%	Reads number	%	Reads number	%	Reads number	%
total_reads	11 868 744	100	13 006 860	100	13 624 495	100	13 000 906	100	10 788 895	100	14 283 442	100
no_adapter_reads	657 906	6	851 701	7	630 224	5	1 034 491	8	767 790	7	689 372	5
too_short_reads	1 920 935	16	2 027 500	16	2 344 861	17	2 085 611	16	1 999 125	19	1 909 175	13
UMI_defective_reads	1 096 089	9	1 518 644	12	1 222 593	9	1 501 764	12	1 009 511	9	1 390 879	10
Total reads - defaults	8 193 814	69	8 609 015	66	9 426 817	69	8 379 040	64	7 012 469	65	10 294 016	72
miRNA_Reads	517 787	4	587 482	5	696 007	5	949 021	7	596 865	6	695 392	5
hairpin_Reads	13 336	0	15 300	0	12 592	0	16 669	0	10 947	0	16 699	0
piRNA_Reads	148 693	1	151 845	1	108 017	1	123 306	1	106 369	1	152 232	1
rRNA_Reads	113 033	1	161 104	1	138 852	1	129 807	1	92 205	1	121 951	1
tRNA_Reads	3 874 784	33	4 151 724	32	4 069 290	30	3 607 229	28	3 148 299	29	5 489 858	38
mRNA_Reads	192 852	2	188 884	1	266 619	2	187 639	1	133 068	1	176 971	1
otherRNA_Reads	811 183	7	829 882	6	1 167 023	9	1 294 313	10	846 707	8	1 143 937	8
notCharacterized_Mappable	706 579	6	743 437	6	839 704	6	654 517	5	620 655	6	753 382	5
notCharacterized_notMappable	1 815 567	15	1 779 357	14	2 128 713	16	1 416 539	11	1 457 354	14	1 743 594	12

PARTIE EXPÉRIMENTALE

2.1.2 Résultats complémentaires

J'ai également réalisé des expérimentations supplémentaires qui renforcent le message apporté par les résultats décrits précédemment et permettent d'appuyer la robustesse de cette étude *in vitro*.

En parallèle des GAGs, j'ai également traité des BV-2 avec du LPS (0,1 µg/mL) pendant 24h et isolé les EVs à partir du surnageant de culture avec la même technique de dUC (LPS-EVs). Les neurones ont été traités par des EVs pendant 24h, 48h ou 72h, fixés puis marqués avec des anticorps anti-βIII-tubuline et MAP-2 qui ciblent respectivement, les neurites et les dendrites. Dans cette première figure, nous pouvons voir par microscopie à fluorescence, que les neurones traités par des LPS-EVs à 72h ont un réseau avec une densité semblable à celle des neurones contrôles ou traités par les WT-EVs (Fig. 1A). Effectivement, avec le logiciel Imaris, j'ai pu quantifier l'aire totale des neurites et des dendrites et les rapporter aux valeurs quantifiées dans la condition contrôle. Nous avons pu constater qu'à 24h il n'y a pas de modulation de cette aire pour toutes les conditions. A 48h, il y a une baisse de cette aire qui est similaire entre toutes les conditions, et qu'à 72h les neurones traités par les WT-EVs retrouvent une morphologie basale avec des aires totales de leurs neurites et dendrites similaires à la condition contrôle. Or, pour les neurones traités par les MPS-EVs nous avons déjà montré dans le précédent travail qu'à 72h il n'y a pas de retour à l'état basal et même que leurs aires sont encore plus diminuées qu'à 48h (p-value < 0,05). Pour les neurones traités par les LPS-EVs nous pouvons observer qu'ils ne perdent pas plus de neurites ou de dendrites, bien que la plupart des échantillons ne retrouvent pas un état basal (Fig. 1B et C). De la même manière, nous pouvons constater qu'en étudiant le paramètre de mesure de la distance entre la terminaison et le soma, que seuls les neurones traités avec des MPS-EVs, voient la longueur de leurs dendrites diminuée à 72h (p-value < 0,05) (Fig. 1D).

Ces résultats, suggèrent que la diminution au cours du temps de l'aire du réseau neuronal induite par les MPS-EVs n'est pas uniquement dépendante d'un contenu pro-inflammatoire des EVs, mais plutôt d'un contenu spécifiquement lié à l'activation des BV-2 par des GAGs provenant de patients MPS III. En effet, j'ai réalisé une RT-qPCR des miR-146a-5p et miR-155-5p, des miRNAs pro-inflammatoires bien connus que nous avons déjà montré comme

PARTIE EXPÉRIMENTALE

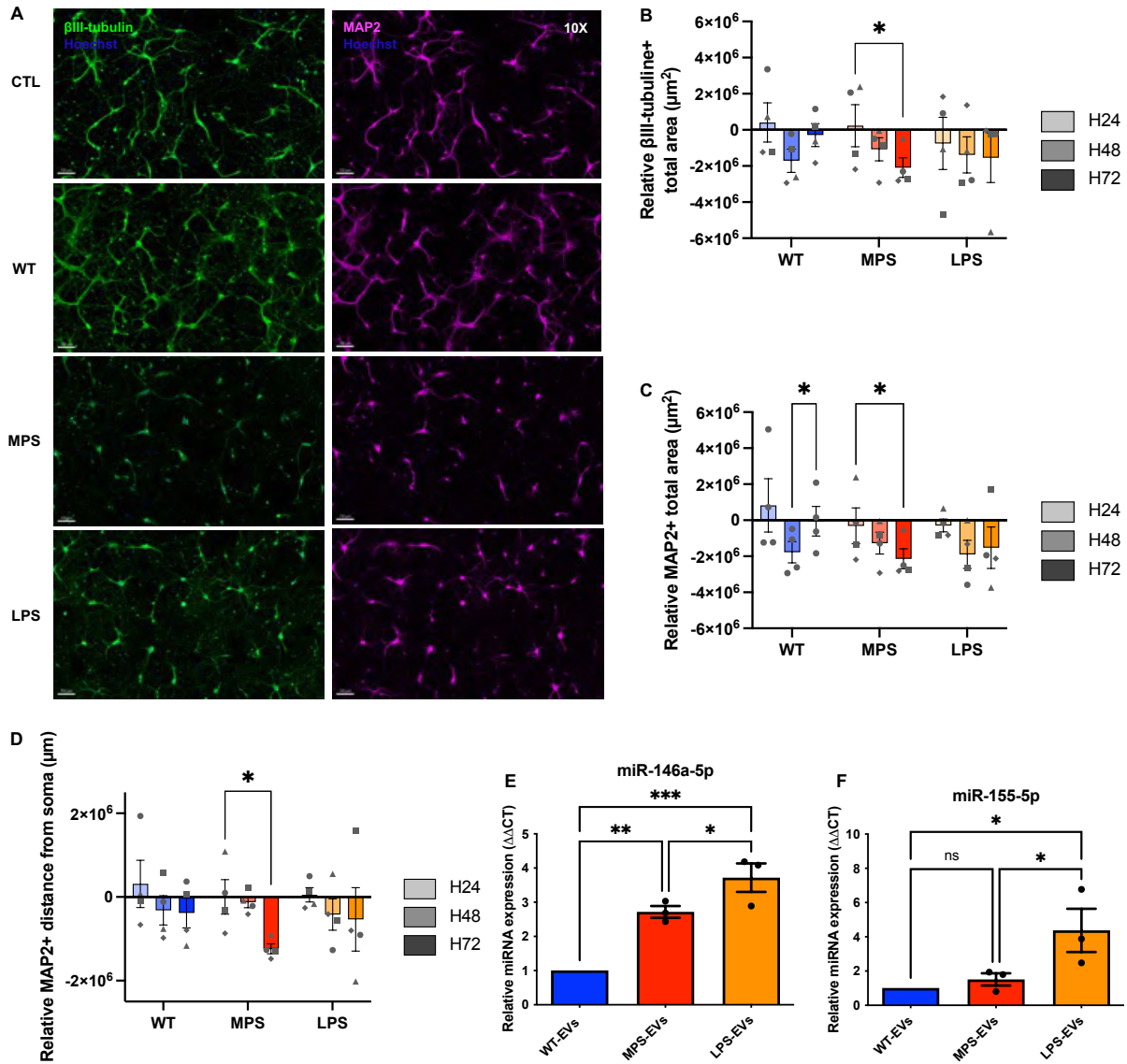


Fig. 1. β III-tubulin and MAP2 immunostaining of primary cortical neurons treated with WT-, MPS-EVs or LPS-EVs.

(A) Representative insets of wide-field zoomed images of neurons on 25 squares mosaics (10X objective) showed a relative decrease in the intensity of MAP2 immunostaining in neurons after 72h of treatment with MPS-EVs or LPS-EVs. (B-C) Quantification of the total β III-tubulin+ (B) and MAP2+ (C) surface area revealed a decrease in neurons treated with MPS-EVs but not with LPS-EVs or WT-EVs at 72h. (D) Quantification of the MAP2+ distance from soma revealed a decrease in neurons treated with MPS-EVs but not with LPS-EVs or WT-EVs at 72h. (A-D) Neurons were treated with WT-EVs (WT, blue), MPS-EVs (MPS, red), LPS-EVs (LPS, orange) or trehalose (CTL) for 24h (H24, in light grey), 48h (H48, in medium grey) or 72h (H72, in dark grey). Neurons were stained with an anti- β III-tubulin antibody coupled to Alexa FluorTM 647 (green) or with an anti-MAP2 antibody coupled to Alexa FluorTM 568 (in pink). Nuclei were stained with Hoechst 33342 (in blue). Scale bar = 100 μ m (B, C and D) Quantifications of wide-field neurons variables, normalized against non-treated control neurons

PARTIE EXPÉRIMENTALE

(CTL). Two-way ANOVA, n=4 biological replicates (each point represents 1 n), * = $p \leq 0.05$. **(E and F)** RT-qPCRs of miR-146a-5p (E) and miR-155-5p (F) represented by bar plots. RNA was extracted from EVs collected from conditioned media of BV-2 cells treated with WT-GAGs (WT-, blue), MPS-GAGs (MPS-, red) or LPS (LPS-, orange). One-way ANOVA, n=3 biological replicates (each point represents 1 n), ns = $p > 0.05$; * = $p \leq 0.05$; ** = $p \leq 0.01$; *** = $p \leq 0.001$.

étant enrichis dans les MPS-EVs. Nous pouvons voir qu'ils sont enrichis dans les LPS-EVs mais avec un fold-change plus important (p-value < 0,001 (miR-146a-5p) et < 0,05 (miR-155-5p)) que pour les MPS-EVs (p-value < 0,01 (miR-146a-5p)).

Finalement, nous avons aussi voulu vérifier que les 4 miRNAs enrichis dans nos MPS-EVs identifiés et validés par miRSeq et RT-qPCR, sont aussi présents *in vivo*, dans notre modèle murin MPS IIIB âgé de 4 mois.

A partir de tissus cérébraux j'ai isolé des EVs par une technique d'ultracentrifugation différentielle couplée à un gradient de densité (DG-dUC). J'ai ensuite extrait les ARNs totaux provenant des tissus entiers et des EVs de cerveaux de souris WT (4mo-WT) ou MPS IIIB (4mo-MPS).

Nous pouvons voir que dans tissus cérébraux MPS IIIB, les miR-146a-5p (p-value < 0,0001) et miR-155-5p (p-value < 0,05) sont plus fortement exprimés, mais avec un fold-change assez faible. En revanche, les miR-221-3p et miR-100-5p semblent y être exprimés plus fortement de manière constitutive mais leur expression n'est pas différente entre les 4mo-WT et 4mo-MPS (Fig. 2A). De façon similaire, nous pouvons observer dans les EVs que le miR-221-3p est très fortement exprimé dans les deux conditions et qu'il n'y a pas de différence. Or, le miR-155-5p se trouve enrichi dans les 4mo-MPS malgré un fold-change faible (p-value < 0,05). Quant au miR-146a-5p il est fortement différentiellement exprimé et enrichi dans les 4mo-MPS (p-value < 0,0001) (Fig. 2B).

Cette expérience, nous a permis de valider que nous pouvions retrouver *in vivo* le même enrichissement en miRNAs que dans notre système *in vitro*, simple et basé sur une lignée microgliale traitée par des GAGs de patients. Les EVs de cerveaux MPS IIIB étant issues d'un environnement plus complexe et représentatif de l'accumulation des HSOs.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

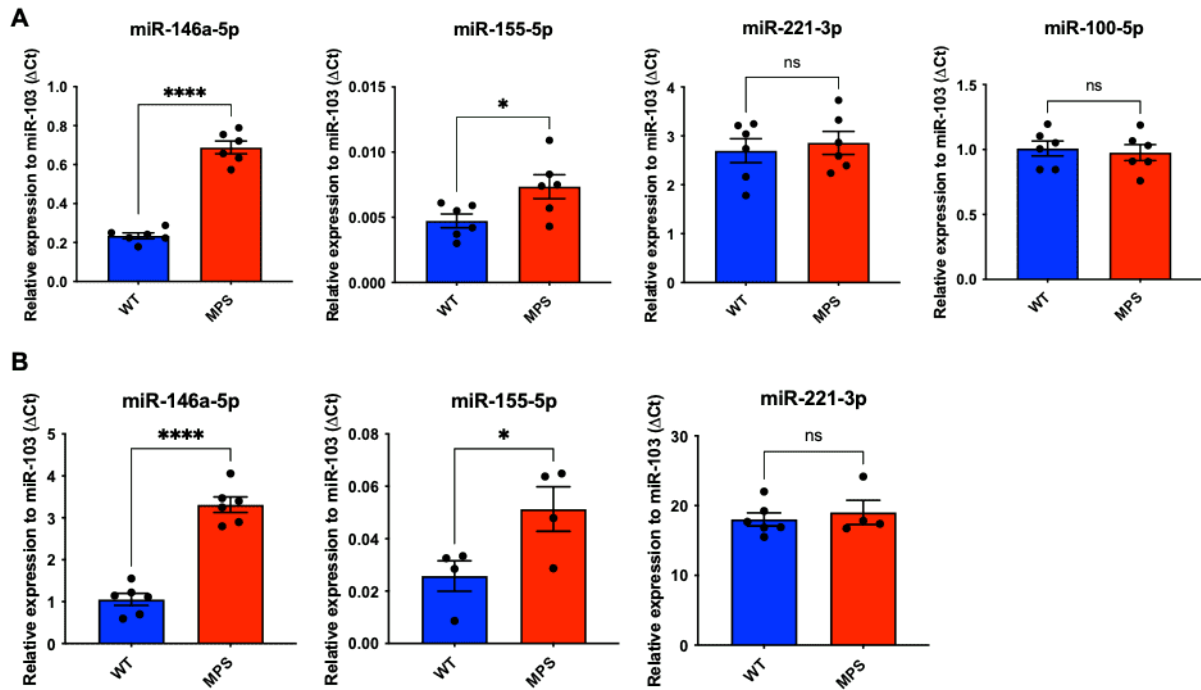


Fig. 2. Comparison of miRNAs levels in brain tissues or EVs from 4mo-WT or MPS III B mice by RT-qPCR.

Relative expression of miR-155-5p, miR-146-5p, miR-221-3p and miR-100-5p, represented by bar plots. RNA was extracted from brain tissues (A) or from brain EVs (B) of WT mice (WT, blue) or MPSIII B mice (MPS, red) and their expression determined by RT-qPCR experiments and ΔC_t related to miRNA control, miR-103. Unpaired t-test, $n=4-6$ biological replicates (each point represents 1 n), ns = $p > 0.05$; * = $p \leq 0.05$; **** = $p \leq 0.0001$.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

2.2 ARTICLE “BRAIN-DERIVED EXTRACELLULAR VESICLES FROM A MOUSE MODEL OF MUCOPOLYSACCHARIDOSIS TYPE IIIB DRIVE DISEASE STAGE-DEPENDENT NEUROPATHOLOGY”

F. Wilkinson, R. Petrova et J. Ausseil ont décrit dans leurs travaux sur la physiopathologie du modèle murin MPS IIIB, que la neuroinflammation bien qu'elle soit initiée par la microglie et visible dès 10 jours, va activer les autres types cellulaires et être aussi médiée par les astrocytes. Dans cet état de gliose, qui sera détectable aux alentours de 3 mois, les astrocytes ne seront plus capables de maintenir intacte la BHE et entraîneront avec l'ensemble des cellules cérébrales activées le recrutement de cellules immunitaires périphériques. De par sa chronicité, la neuroinflammation – couplée aux altérations intracellulaires causées par l'accumulation de HSOs – va induire des défauts de transmission nerveuse décrits entre 3 et 5 mois, et qui conduiront progressivement à des troubles du comportement cognitifs et moteurs visibles dès 6 mois, annonciateurs d'une neurodégénérescence sévère marquée à 8-9 mois (Ausseil et al. 2008; Petrova et al. 2023; Wilkinson et al. 2012).

En parallèle de mes travaux *in vitro*, dans lesquels j'ai démontré la transmission au neurone d'un message pathologique par les EVs de microglie, à l'origine d'une altération de leur morphologie, j'ai voulu explorer un modèle *ex vivo*. L'exploitation d'EVs provenant d'un système complexe nous permettra d'étudier le message de l'ensemble des cellules cérébrales dans un contexte d'accumulation d'HSOs anormaux et de valider *in vivo* notre hypothèse. Les premiers résultats obtenus avec ce modèle *ex vivo* sont présentés dans cette ébauche d'article scientifique intitulé « *Brain-derived extracellular vesicles from a mouse model of Mucopolysaccharidosis type IIIB drive disease stage-dependent neuropathology* ». Ces résultats de RNAseq seront étoffés par d'autres analyses bioinformatiques en cours d'interprétation à ce jour ainsi que par des expérimentations fonctionnelles supplémentaires qui seront exposées dans la partie Discussion et Perspectives.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Dans notre équipe, nous disposons du modèle murin MPS IIIB décrit précédemment, dont l'apparition et l'évolution de la maladie est similaire à ce qui est décrit chez l'Homme. Nous avons choisi d'étudier des EVs provenant de souris âgées de 1, 4 et 8 mois permettant ainsi de retracer la progression de la neuroinflammation et de la neurodégénérescence. Pour ce faire, les EVs ont été isolées à partir de tissus cérébraux par la technique de DG-dUC, que j'ai développée dans le laboratoire à partir d'une méthode adaptée aux échantillons tissulaires déjà décrite (Muraoka et al. 2021). Le gradient de densité va séparer le culot d'EVs en sept différentes fractions que j'ai caractérisées par Western-Blot (WB), microscopie électronique à transmission (TEM), et NTA, afin de déterminer les fractions enrichies en EVs et de les utiliser pour le traitement des neurones.

Pour répondre au mieux à l'hypothèse du rôle des EVs dans la propagation de la neuropathologie, j'ai réalisé une étude transcriptomique par RNAseq de neurones corticaux primaires murins isolés à partir de souriceaux sauvages et traités avec des EVs isolées de cerveaux de souris WT ou MPS IIIB âgées de 1, 4 ou 8 mois.

Par microscopie optique à contraste de phase nous avons déjà pu montrer que seuls les MPSIIIB-EVs provenant de cerveaux de 8 mois, altèrent physiquement les neurones primaires après une exposition chronique de 72h. L'analyse transcriptomique nous a permis de révéler des différences d'expression des mRNAs impliqués dans différentes voies biologiques entre des neurones traités par des EVs WT et MPS IIIB isolées à trois stades différents de la pathologie.

Nous avons montré que les neurones traités par des MPS IIIB-EVs isolées de souris d'un mois, présentent déjà une réponse adaptative au stress traduite par une augmentation des mRNAs impliqués dans l'activité mitochondriale et la synthèse protéique, associée à une diminution de la réponse inflammatoire et à une augmentation de la signalisation endocannabinoïde. De plus, nous avons vu une augmentation de l'expression d'une voie décrite dans le cancer en lien avec une production de ROS et qui pourrait être dépendante de l'augmentation de la phosphorylation oxydative mitochondriale. Finalement, nous avons également trouvé une augmentation de l'expression de voies impliquées dans les maladies neurodégénératives de l'adulte.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Les neurones traités par des MPSIIIB-EVs isolées de souris de 4 mois, présentent uniquement une diminution des voies biologiques associées à l'immunité innée et directement liée à la signalisation du TLR4, présentant les mêmes voies impliquées que dans la condition 1 mois. Finalement, les neurones traités par des MPS IIIB-EVs isolées de souris de 8 mois, montrent une baisse de l'expression de la voie associée aux ribosomes, et suggèrerait une diminution de la synthèse protéique contrairement à la condition avec des MPSIIIB-EVs de 1 mois. L'analyse transcriptomique a également révélé une diminution des mRNAs de la voie des protéoglycanes dans le cancer, et spécifiquement celle des HSPGs, cette voie est essentielle à la survie et la prolifération des cellules. Étant inhibée elle traduit directement la mort des neurones, en adéquation avec la diminution de la synthèse protéique mais surtout avec la morphologie altérée de ces neurones, tel qu'observé avec les images de microscopie. Cette voie altérée ciblant spécifiquement les HSPGs suggère fortement un transport de HSOs par les EVs.

Dans leur ensemble, ces résultats qui nécessiteront d'être validés à travers différentes expérimentations fonctionnelles montrent d'ores et déjà que les EVs sont capables d'induire dans des neurones sauvages, une réponse complexe et fine et qui est dépendante de l'évolution de la pathologie chez la souris. Ce travail permet plus que jamais d'envisager favorablement l'utilisation des EVs comme biomarqueurs de suivi longitudinal de l'efficacité thérapeutique dans le cadre d'essais cliniques dans la MPS III.

Title page

Title

Brain-derived extracellular vesicles from a mouse model of Mucopolysaccharidosis type IIIB drive disease stage-dependent neuropathology

Authors

Chloé Dias¹, Katia Alileche¹, Nissrine Ballout¹, Margot Zahm¹, Jerome Ausseil^{1,2}, Stephanie Trudel^{1,2}

Affiliations

1 Toulouse Institute for Infectious and Inflammatory Diseases (Infinity), University of Toulouse, Inserm U1291, CNRS U5051, Toulouse, France

2 Laboratoire de Biochimie, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Toulouse, France

Mail addresses

chloe.dias@inserm.fr

katia.alileche@inserm.fr

nissrine.ballout@inserm.fr

margot.zahm@inserm.fr

jerome.ausseil@inserm.fr

stephanie.trudel-ausseil@inserm.fr

Corresponding Authors

Stephanie Trudel and Chloé Dias

Keywords

Mucopolysaccharidosis type IIIB, Sanfilippo syndrome, Neuroinflammation, Neurodegeneration, Extracellular vesicles, Heparan sulfate, N-acetylglucosaminidase

Results

Characterization of brain-derived extracellular vesicles

Brain-derived extracellular vesicles (EVs) were purified directly from mouse brain tissue following the density gradient – differential ultracentrifugation purification scheme shown in Fig. 1A, according to the method described by Muraoka et al. (1).

As specified in the guidelines from the International Society for Extracellular Vesicles (2,3), the vesicles from each fraction of the sucrose density gradient (III to IX, corresponding approximately to 1.06 to 1.28 g/cm³) obtained after centrifugation at 140.000 x g, were analyzed with regard to particle size and concentration, using transmission electron microscopy (TEM) (Fig. 1B) and nanoparticle tracking analysis (NTA) (Fig. 1D and E). The presence of EV protein markers was checked using Western blotting (Fig. 1C).

Transmission electron microscopy

The purified EVs were examined by TEM and negative staining revealed heterogenous populations of EVs from the different sucrose gradient fractions with sizes between 100 and 670 nm. EVs in the V and IX fractions, appears to present in a lower quantity when compared to others fractions (Fig. 1B).

Nanoparticle tracking analysis

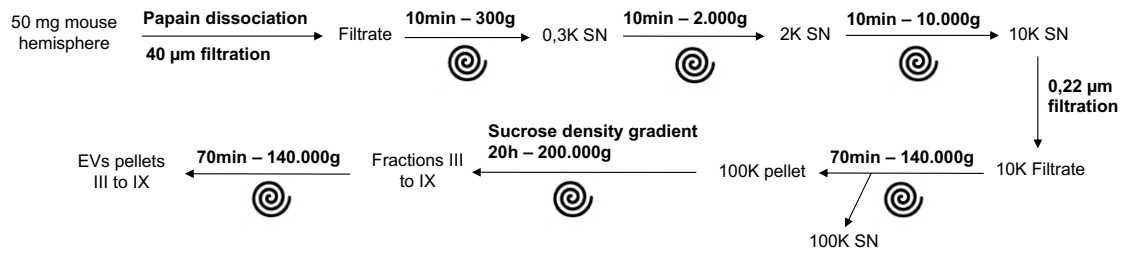
Size distribution graphs of EVs purified from fractions III to IX showed that all fractions had a similar average particle size (mean) and peak particle size (mode). The particle size was consistent with that observed in the TEM. When comparing all fractions together, the total particle concentration was at least two times higher in fraction VI and ten times higher in fraction VII (Fig. 1C and Table 1A).

EV protein marker analysis

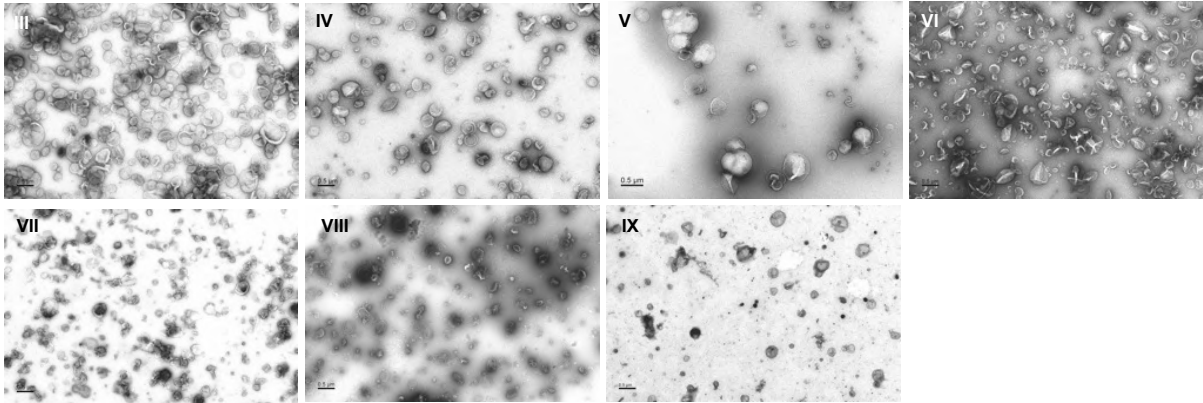
We used Western blotting of the EV proteins extracted from fractions III to IX to establish the presence of typical transmembrane protein markers of EVs (CD9 and CD81) and cytoplasmic lipid-bound protein marker (ANXA2) (Fig. 1D). Tetraspanins CD9 and CD81 were enriched in the fractions VI to IX and V to VIII respectively, and both were highly enriched concomitantly in fraction VII. ANXA2 was enriched in fractions V and VI. Moreover, the Golgi apparatus marker GM130 was not detected in any fractions (Fig. 1D),

PARTIE EXPÉRIMENTALE

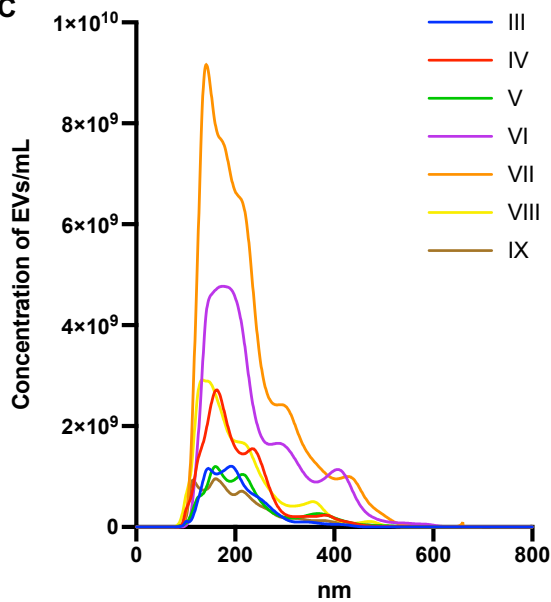
A Density gradient – differential ultracentrifugation *ex vivo* protocol



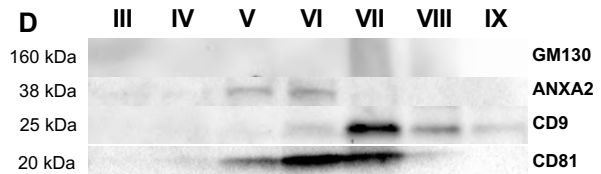
B



C



D



E

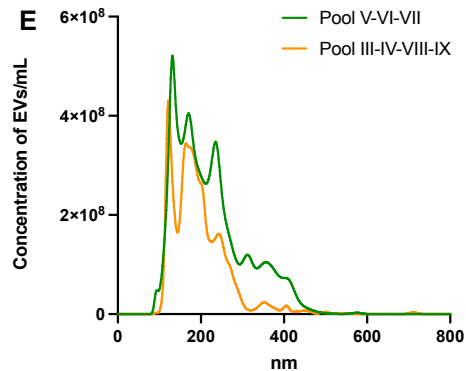


Fig. 1. Purification and characterization of EVs from mouse brain tissue

(A) Density gradient – differential ultracentrifugation purification scheme of EVs from mouse brain tissue. (B) Representative images of negative-stained TEM showing pure EV preparations from the seven different sucrose density gradient fractions (III to IX). Scale bar = 500 nm. (C) NTA size distribution graphs of the purified EVs from the seven different fractions (III to IX) of the sucrose density gradient. The diameter of all EVs populations ranges from 100 to 500 nm. The results are expressed as the mean EV concentration per mL for each nm in size. $n=3$, each color represents a fraction. (D) Western blots performed with lysates of EVs from the seven different fractions (III to IX) revealed the enrichment of the specific EV protein markers ANXA2 in the both V and VI fractions, CD9

PARTIE EXPÉRIMENTALE

in VI to IX fractions, and CD81 in V to VIII fractions. WB showed the absence of GM130 proteins in all pellets. **(E)** NTA size distribution graphs of the purified EVs from the EV-enriched pool (V to VII fractions, in green) or from the EV-deprived pool (III, IV, VIII and IX fractions, in yellow). The diameter of all EVs populations ranges from 100 to 500 nm. The results are expressed as the mean EV concentration per mL for each nm in size. n=6. **(A-E)** EVs were isolated from brains of C57Bl/6J^{Naglu} heterozygous mice.

suggesting a very good purity of our EVs preparations, and was consistent with the TEM images.

All together, these results comforted us to define fractions V, VI and VII (1.10–1.22 g/cm³) as the EV-enrich fractions, as also determined by Muraoka et al (1). We decided to pool these EV-enriched fractions, obtain the pellet of pooled EVs after centrifugation and to use this pool for further experiments.

Before doing so, we checked by NTA the size distribution graphs of both EV-enriched and EV-deprived pools. We did not observe a major difference in peak size or mean concentration between them. The main difference was the presence of an EV population ranging between 300 and 450 nm that is more abundant in the EV-enriched pool, consistent with an increase mean size of about 30 nm when comparing both pools (Fig. 1E, Table 1B). Although the calculated mean concentration was not quite different, when normalizing to brain tissue, we determined that the quantity of EVs per mg of brain tissue is ten times higher in the EV-enriched pool (Table 1B).

Given that the characterization of the EVs from brain tissues gave satisfactory results, we pursued the experiments by evaluating the effect of EVs isolated from brain tissues of C57Bl/6J WT mice (WT-EVs) and MPS IIIB mice C57Bl/6J^{Naglu} ^{-/-} (MPSIIIB-EVs) on the transcriptome of primary cortical neurons by RNA sequencing analysis.

As we wanted to investigate the specific effect of the EVs according to the stage of the disease, we studied EVs purified from three different aged mice, one month, four months and eight months. At one month old, the MPS IIIB mouse model presents mainly a mild neuroinflammation, at four months old this neuroinflammation becomes moderate combined with some neurotransmission defects and at eight months old, mice present severe neuroinflammation with motor and cognitive declines, associated with neurodegeneration.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Table 1. Results of the NTA. General statistics of **(A)** purified EVs from the 7 different fractions (III to IX) of the sucrose density gradient (n=3) and **(B)** purified EVs from the EV-enriched pool (V to VII fractions) or from the EV-depleted pool (III, IV, VIII and IX fractions) (n=6).

A	Conditions	Mode (nm)	Mean (nm)	Total concentration (EVs/mL)
	III	168 ± 22	200 ± 9	2E+11 ± 1E+11
	IV	163 ± 9	204 ± 8	3E+11 ± 8E+10
	V	158 ± 12	215 ± 17	2E+11 ± 2E+11
	VI	182 ± 7	238 ± 8	7E+11 ± 2E+11
	VII	151 ± 10	224 ± 8	1E+12 ± 4E+11
	VIII	136 ± 5	206 ± 20	3E+11 ± 2E+11
	IX	134 ± 19	208 ± 19	1E+11 ± 5E+10

B	Conditions	Mode (nm)	Mean (nm)	Total concentration (EVs/mL)	Quantity per mg of brain tissue (n)
	Pool V-VI-VII	153 ± 10	221 ± 14	6E+10 ± 3E+10	3E+08 ± 1E+08
	Pool III-IV-VIII-IX	153 ± 27	191 ± 5	4E+10 ± 3E+10	2E+07 ± 7E+07

Morphological effects of MPSIIIB-EVs uptake by primary cortical neurons

To further explore the neuronal reaction to the cargo transmitted by brain EVs, we exposed primary cortical neurons isolated from WT mouse pups (P0-P1) to MPSIIIB-EVs or WT-EVs isolated from mice at one month, 4 months and 8 months of age (1.25×10^9 EVs/mL) every 24 hours for 72 hours (Fig. S1A).

For the following results we therefore have six different groups of EVs, isolated from either WT-brains (1mo-WT-EVs, 4mo-WT-EVs and 8mo-WT-EVs) and MPSIIIB-brains (1mo-MPSIIIB-EVs, 4mo-MPSIIIB-EVs and 8mo-MPSIIIB-EVs).

At DIV10, following the treatment of neurons with EVs and before total RNA extraction, we checked, the integrity of neuronal networks by phase contrast optical microscopy. We observed that neurons exposed to WT-EVs at different ages showed similar morphology as neurons from control condition. We could even observe that the neuronal extensions seem to be thicker in neurons treated with WT-EVs. The morphology of neurons treated with 1mo-MPSIIIB-EVs and 4mo-MPSIIIB-EVs was also similar to that of control neurons, but we noted an increase in soma clustering, leading to spheroid formations. In contrast, treatment with 8mo-MPSIIIB-EVs showed a major fragmentation of neuronal extensions and an increase of the amount of cellular debris, similarly to neurons treated with culture supernatant (depleted in EVs) from MPS III GAG-activated microglia (positive control condition) (Fig. S1B).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

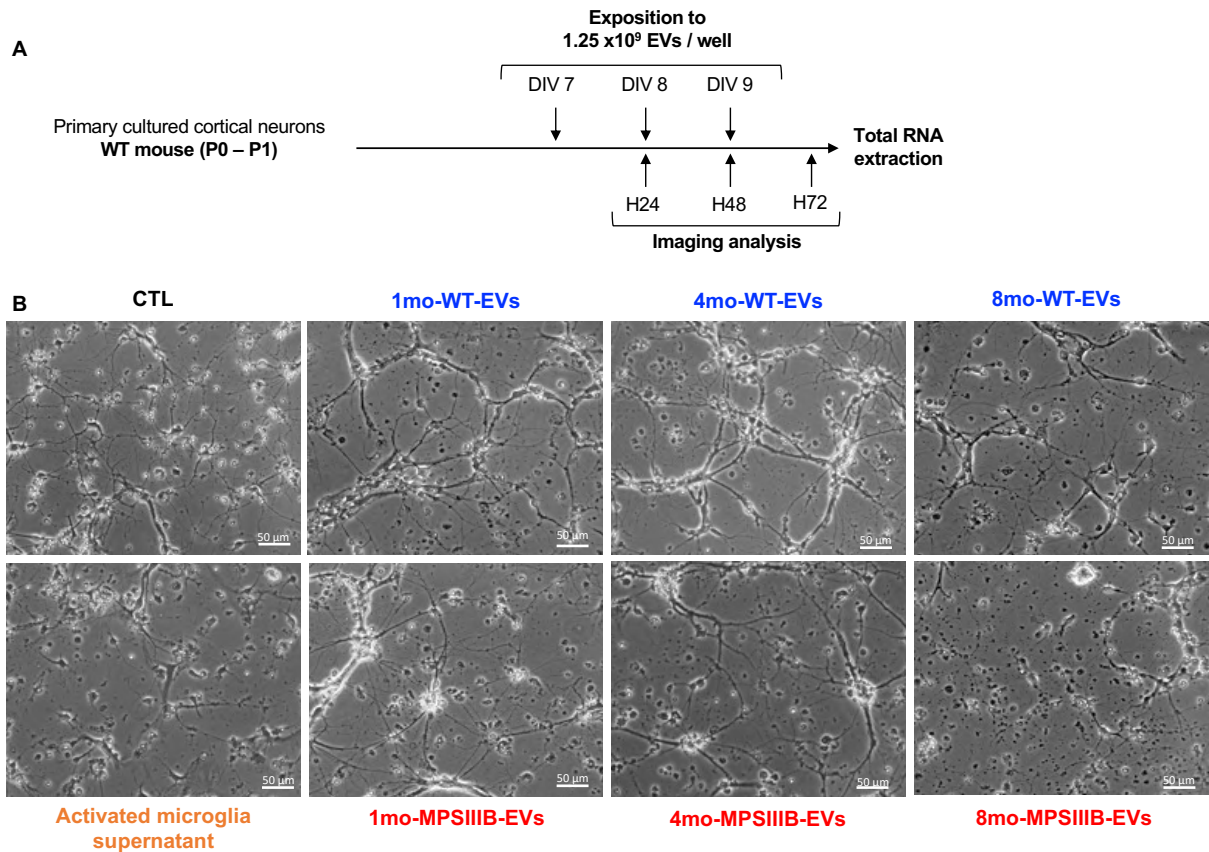


Fig. S1. Transmitted light microscopy of primary cortical neurons treated with WT- or MPSIII-B-EVs isolated from mice brains at different stages of the disease.

(A) A diagram showing the experiment scheme for chronic exposure of neurons to EVs and the time points for optical imaging quality control and total RNA extraction. (B) Representative wide-field zoomed images (10X objective) showed that neuronal extensions were decreased after neurons had been treated for 72h (DIV10) with 8mo-MPSIII-B-EVs or exposed to BV-2 microglia murine cell line supernatant after activation with pathologic GAGs from MPS III patient (positive control) when compared to treatment with MPSIII-B-EVs isolated from younger mice or WT-EVs and negative control condition (vehicle only, CTL). Scale bar = 50 μ m.

Transcriptomic analysis of neurons treated with WT-EVs or MPSIII-B-EVs

Quality control of RNAs and RNA sequencing experiment

Total RNA was extracted from the primary cortical neurons obtained after treatment with WT-EVs or MPSIII-B-EVs and for the next results we will name them respectively WT-neurons and MPSIII-B-neurons (see Table S1 for sample ID and experimental details). The total RNA quantity ranged from 110.75 to 498.6 ng (Fig. S2A). Electrophoresis of the extracted

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Table S1. Samples metadata

sample	condition	month	genotype	replicat	sequencing
1mo-WT_1	WT_1m	1	WT	1	1
1mo-WT_1bis	WT_1m	1	WT	1	2
1mo-WT_3	WT_1m	1	WT	3	1
1mo-WT_4	WT_1m	1	WT	4	1
1mo-WT_4bis	WT_1m	1	WT	4	2
1mo-WT_5	WT_1m	1	WT	5	1
4mo-WT_1	WT_4m	4	WT	6	2
4mo-WT_5	WT_4m	4	WT	7	2
4mo-WT_6	WT_4m	4	WT	8	2
4mo-WT_7	WT_4m	4	WT	9	2
8mo-WT_1	WT_8m	8	WT	1	1
8mo-WT_1bis	WT_8m	8	WT	1	2
8mo-WT_3	WT_8m	8	WT	3	1
8mo-WT_4	WT_8m	8	WT	4	1
8mo-WT_4bis	WT_8m	8	WT	4	2
8mo-WT_5	WT_8m	8	WT	5	1
1mo-MPSIIIB_1	MPS_1m	1	MPS	1	1
1mo-MPSIIIB_1bis	MPS_1m	1	MPS	1	2
1mo-MPSIIIB_3	MPS_1m	1	MPS	3	1
1mo-MPSIIIB_4	MPS_1m	1	MPS	4	1
1mo-MPSIIIB_4bis	MPS_1m	1	MPS	4	2
1mo-MPSIIIB_5	MPS_1m	1	MPS	5	1
4mo-MPSIIIB_1	MPS_4m	4	MPS	6	2
4mo-MPSIIIB_5	MPS_4m	4	MPS	7	2
4mo-MPSIIIB_6	MPS_4m	4	MPS	8	2
4mo-MPSIIIB_7	MPS_4m	4	MPS	9	2
8mo-MPSIIIB_1	MPS_8m	8	MPS	1	1
8mo-MPSIIIB_1bis	MPS_8m	8	MPS	1	2
8mo-MPSIIIB_3	MPS_8m	8	MPS	3	1
8mo-MPSIIIB_4	MPS_8m	8	MPS	4	1
8mo-MPSIIIB_4bis	MPS_8m	8	MPS	4	2
8mo-MPSIIIB_5	MPS_8m	8	MPS	5	1

RNA showed that the samples were of good quality, as revealed by the RNA Integrity Number (RIN) above 8.0 for all RNAs samples (Fig. S2A and B). Also, the processing of libraries was efficient, as represented by the expected large peak comprised between 200 and 700 bp (Fig. S2C). The total reads obtained from RNA sequencing ranged from 37 to 66 millions of raw sequences and the mappable reads used for alignment were normalized for each biological replicates (1mo-, 4mo-, 8mo-WT-neurons and 1mo-, 4mo-, 8mo-MPSIIIB-neurons) (Table S2). RNA sequencing PCA revealed that samples clustered regarding biological replicates (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 and 9) (Fig. S3A) so the batch effect was statistically corrected allowing samples to cluster regarding the genotypes (Fig. S3B).

Differential expression analysis

RNA sequencing identified a total of 16899 mRNAs. However, differential expression analysis (DEA) when applying a student t-test, revealed a low number of mRNAs with

PARTIE EXPÉRIMENTALE

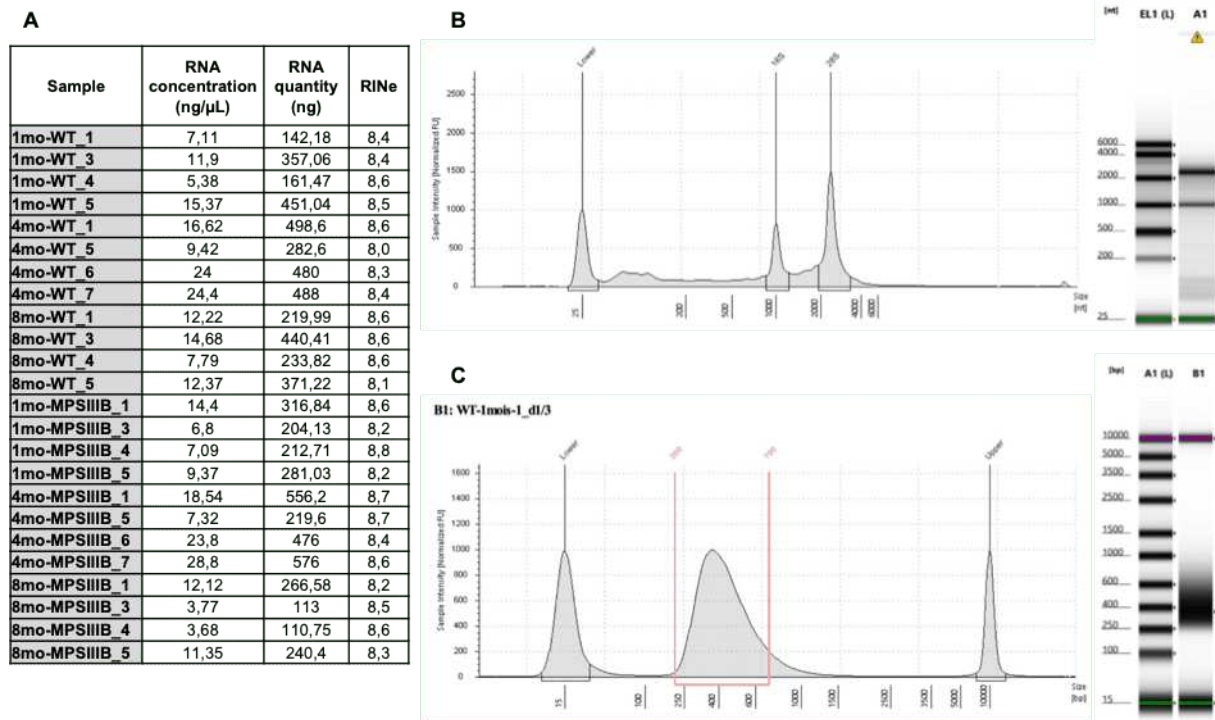


Fig. S2. Quality check of RNA samples from primary cortical neurons treated with Brain-EVs.

(A) Before sequencing, total RNA was quantified using a Qubit Fluorometer (Invitrogen). (B) A representative electrophoresis profile of total RNA, showing the presence of small RNAs (< 200 bp), mRNAs and rRNAs. Peaks from left to right: lower marker, ribosomal 18S and 28S rRNAs. (C) A representative electrophoresis profile of libraries, showing that the major peak is present between 200 and 700 bp. Peaks from left to right: lower marker, libraries, upper marker. (B-C) Profiles were evaluated on an Agilent 4150 TapeStation.

expression levels statistically different (i.e. a $\log_2 |\text{fold-change}| \geq 1$ and *adjusted p-value* < 0.05) when comparing WT and MPS IIIB conditions for one-month and eight-months stages, and no difference for the four-months stage. Using unsupervised hierarchical clustering of these 15 differentially abundant mRNAs for the one-month condition, we observed that a group of 11 mRNAs was upregulated and a group of four mRNAs was downregulated in MPSIIIB-neurons, relative to WT-EVs (Table 2A and Fig. 2A). For the eight-months conditions, among the 12 differentially expressed mRNAs, three were upregulated and nine were downregulated in MPSIIIB-neurons, relative to WT-EVs (Table 2B and Fig. 2B). The criteria used for the DEA did not allow us to realize a functional enrichment analysis, so we decided to perform a gene set enrichment analysis (GSEA) to explore the biological pathways affected by the neuronal uptake of MPSIIIB-EVs.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Table S2. Number of reads and percentage of different types of RNA from each EV sample.

The data were processed using nextflow nf-core/RNAseq pipeline (version 3.2).

Sample	Sequencing	Raw total sequences	Reads mapped
1mo-WT_1	1	44799995	44799995
1mo-WT_3	1	48370550	48370550
1mo-WT_4	1	38818635	38818635
1mo-WT_5	1	49358197	49358197
1mo-WT_1bis	2	64656857	64656857
1mo-WT_4bis	2	52648666	52648666
4mo-WT_1	2	62473785	62473785
4mo-WT_5	2	65169529	65169529
4mo-WT_6	2	71033530	71033530
4mo-WT_7	2	59016282	59016282
8mo-WT_1	1	44037750	44037750
8mo-WT_3	1	47184550	47184550
8mo-WT_4	1	43539362	43539362
8mo-WT_5	1	44347587	44347587
8mo-WT_1bis	2	60802515	60802515
8mo-WT_4bis	2	63022150	63022150
1mo-MPSIIIB_1	1	37934956	37934956
1mo-MPSIIIB_3	1	44834210	44834210
1mo-MPSIIIB_4	1	45886181	45886181
1mo-MPSIIIB_5	1	45056577	45056577
1mo-MPSIIIB_1bis	2	55489602	55489602
1mo-MPSIIIB_4bis	2	64550828	64550828
4mo-MPSIIIB_1	2	48954783	48954783
4mo-MPSIIIB_5	2	59489371	59489371
4mo-MPSIIIB_6	2	55694058	55694058
4mo-MPSIIIB_7	2	54165886	54165886
8mo-MPSIIIB_1	1	31383076	31383076
8mo-MPSIIIB_3	1	40490895	40490895
8mo-MPSIIIB_4	1	49156016	49156016
8mo-MPSIIIB_5	1	42351393	42351393
8mo-MPSIIIB_1bis	2	45042788	45042788
8mo-MPSIIIB_4bis	2	66587672	66587672

Gene set enrichment analysis

GSEA allowed us to identify GO biological process (GOBP) families (Fig. 3) and KEGG pathways (Fig. 4) modulated by exposure of neurons to EVs.

First, neurons treated with 1 month-MPSIIIB-EVs presented upregulated mRNAs that were involved in GOBP related to oxidative phosphorylation (i.e. GO:0015986; proton motive force-driven mitochondrial ATP synthesis, GO:0006119; oxidative phosphorylation, GO:0010257; NADH dehydrogenase complex assembly, GO:0032981; mitochondrial respiratory chain complex I assembly) and protein synthesis (i.e. GO:0002181; cytoplasmic translation, GO:0009201; ribonucleoside triphosphate biosynthetic process, GO:0140241; translation at synapse) (Fig. 3A). In addition, when interrogating KEGG database, we also found the Ribosome KEGG pathway (mmu03010) and oxidative phosphorylation (mmu00190). Additionally, we identified Thermogenesis (mmu04714) and Chemical carcinogenesis –

PARTIE EXPÉRIMENTALE



Fig. S3. Principal component analysis on RNAseq samples from 1mo-, 4mo- and 8mo-neurons.

The results of a principal component analysis of neurons treated with different types of EVs, showing that before correction of the batch effect **(A)** samples clustered regarding the biological replicates (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 and 9) and after correction of the batch effect **(B)** samples clustered regarding genotype (WT, point and MPS, triangle). Graphs from top to bottom : RNAseq samples of neurons treated with 1mo-EV, 4mo-EV and 8mo-EV. n=4 biological replicates for each condition.

reactive oxygen species (mmu05208) as upregulated in 1mo-MPSIIIIB-neurons, both KEGG pathways could be associated to mitochondrial activity (Fig 4A and C).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

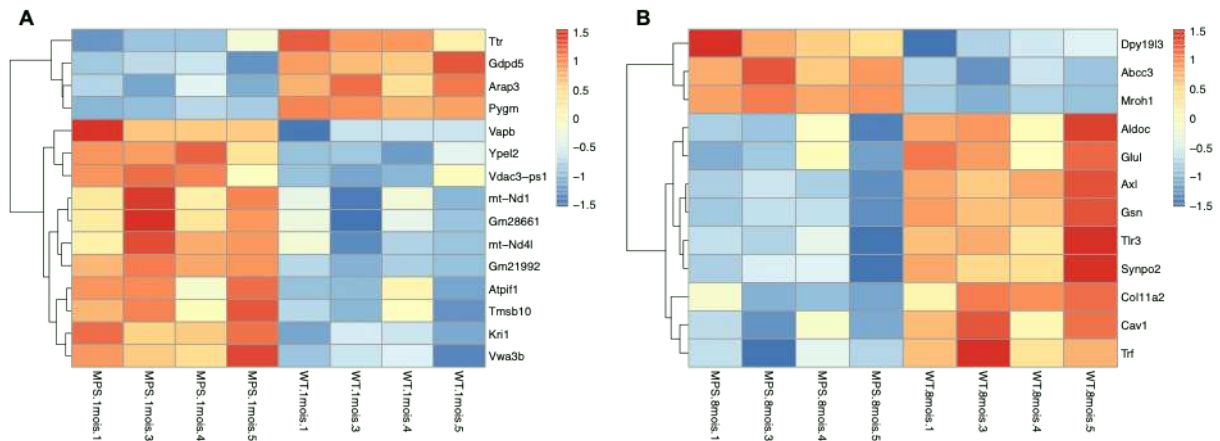


Fig. 2. Differential expression analysis of mRNAs from neurons treated with WT-EVs vs. MPSIIIB-EVs.

A heat map generated in a quantitative differential expression analysis (DESeq2) of mRNAs present in neurons, as a function of the MPSIIIB-EVs treatment. Neural RNAs were extracted after treatment with WT-EVs (WT.) or MPSIIIB-EVs (MPS.) isolated from mice brains aged of **(A)** one-month (.1mois) or **(B)** eight-months (.8mois). Log₂ fold-change, using RNA sequencing quantified and normalized CPM. The adjusted p-value was determined in an ANOVA performed on the R tool with the DESeq2 package. The heat colors were scaled for each marker (high expression in red; low expression in blue). n=4 biological replicates for each condition.

Table 2. List of mRNAs expressed differentially when comparing MPSIIIB-neurons and WT-neurons.

(A) The 15 mRNAs differentially expressed in the one-month condition and **(B)** the 12 mRNAs differentially expressed in the eight-months condition are ranked by adjusted p-value.

A	GENEID	GENENAME	log2FoldChange	pvalue	padj
	ENSMUSG00000065947	mt-Nd4l	0,78	4,72E-08	0,00055
	ENSMUSG00000024451	Arap3	-2,03	6,85E-08	0,00055
	ENSMUSG00000075053	Vdac3-ps1	2,28	5,43E-07	0,00290
	ENSMUSG00000050122	Vwa3b	1,36	1,73E-06	0,00692
	ENSMUSG000000079523	Tmsb10	0,68	5,01E-06	0,01375
	ENSMUSG00000061808	Ttr	-0,46	5,16E-06	0,01375
	ENSMUSG00000018427	Ypel2	0,60	6,14E-06	0,01404
	ENSMUSG00000035314	Gdpd5	-0,53	7,54E-06	0,01509
	ENSMUSG00000054455	Vapb	0,47	1,58E-05	0,02810
	ENSMUSG00000035047	Kri1	0,75	2,12E-05	0,03390
	ENSMUSG000000064341	mt-Nd1	0,51	2,73E-05	0,03973
	ENSMUSG000000096370	Gm21992	0,80	3,22E-05	0,04118
	ENSMUSG00000054428	Atpif1	0,66	3,35E-05	0,04118
	ENSMUSG00000032648	Pygm	-0,48	3,78E-05	0,04322
	ENSMUSG000000102070	Gm28661	0,46	4,66E-05	0,04974
B	GENEID	GENENAME	log2FoldChange	pvalue	padj
	ENSMUSG00000022558	Mroh1	0,44	8,75E-09	0,00012
	ENSMUSG00000043671	Dpy19l3	0,55	5,91E-07	0,00403
	ENSMUSG00000007655	Cav1	-1,14	2,67E-06	0,00911
	ENSMUSG00000024330	Col11a2	-1,23	2,03E-06	0,00911
	ENSMUSG00000032554	Trf	-0,89	3,56E-06	0,00971
	ENSMUSG00000026879	Gsn	-0,44	7,45E-06	0,01525
	ENSMUSG00000031639	Tlr3	-0,90	7,84E-06	0,01525
	ENSMUSG00000002602	Axl	-0,55	1,17E-05	0,01984
	ENSMUSG00000017390	Aldoc	-0,43	1,41E-05	0,02139
	ENSMUSG00000020865	Abcc3	1,04	3,68E-05	0,04556
	ENSMUSG00000026473	Glul	-0,36	3,47E-05	0,04556
	ENSMUSG00000050315	Synpo2	-0,50	4,32E-05	0,04902

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Interestingly, we found that, in contrast, in neurons exposed to 8mo-MPSIIIIB-EVs this Ribosome (mmu03010) KEGG pathway is downregulated (Fig. 4B and D).

In 1mo-MPSIIIIB-neurons we also found that GOBP involved in inflammation were all downregulated (i.e. GO:0009617; response to bacterium, GO:0002252; immune effector process and GO:0045087; innate immune response) (Fig. 3A). These specific innate immunity GOBP families were also suppressed in neurons treated with 4mo-MPSIIIIB-EVs, in addition to Inflammatory response (GO:0006954) (Fig. 3B). None of GOBP families related to immune system were identified in neurons treated with 8mo-MPSIIIIB-EVs.

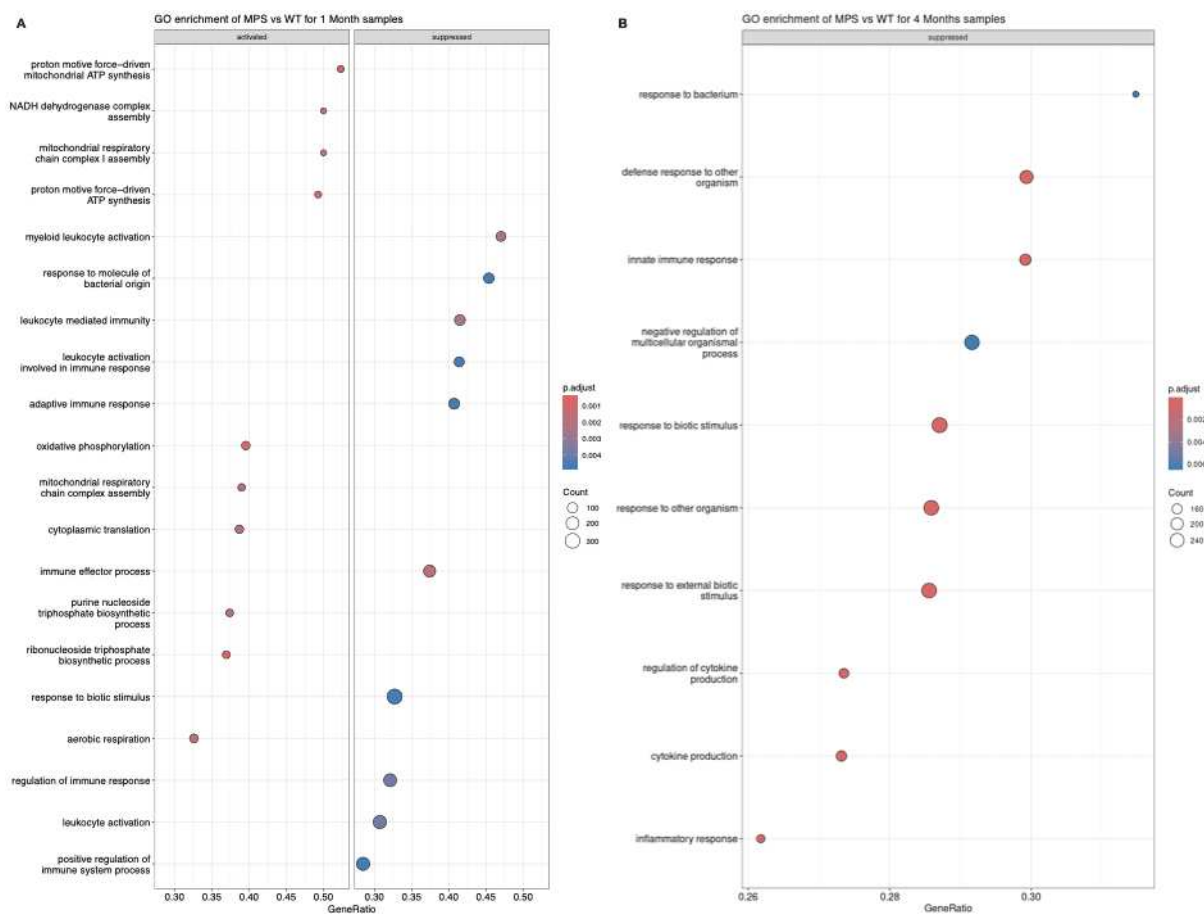
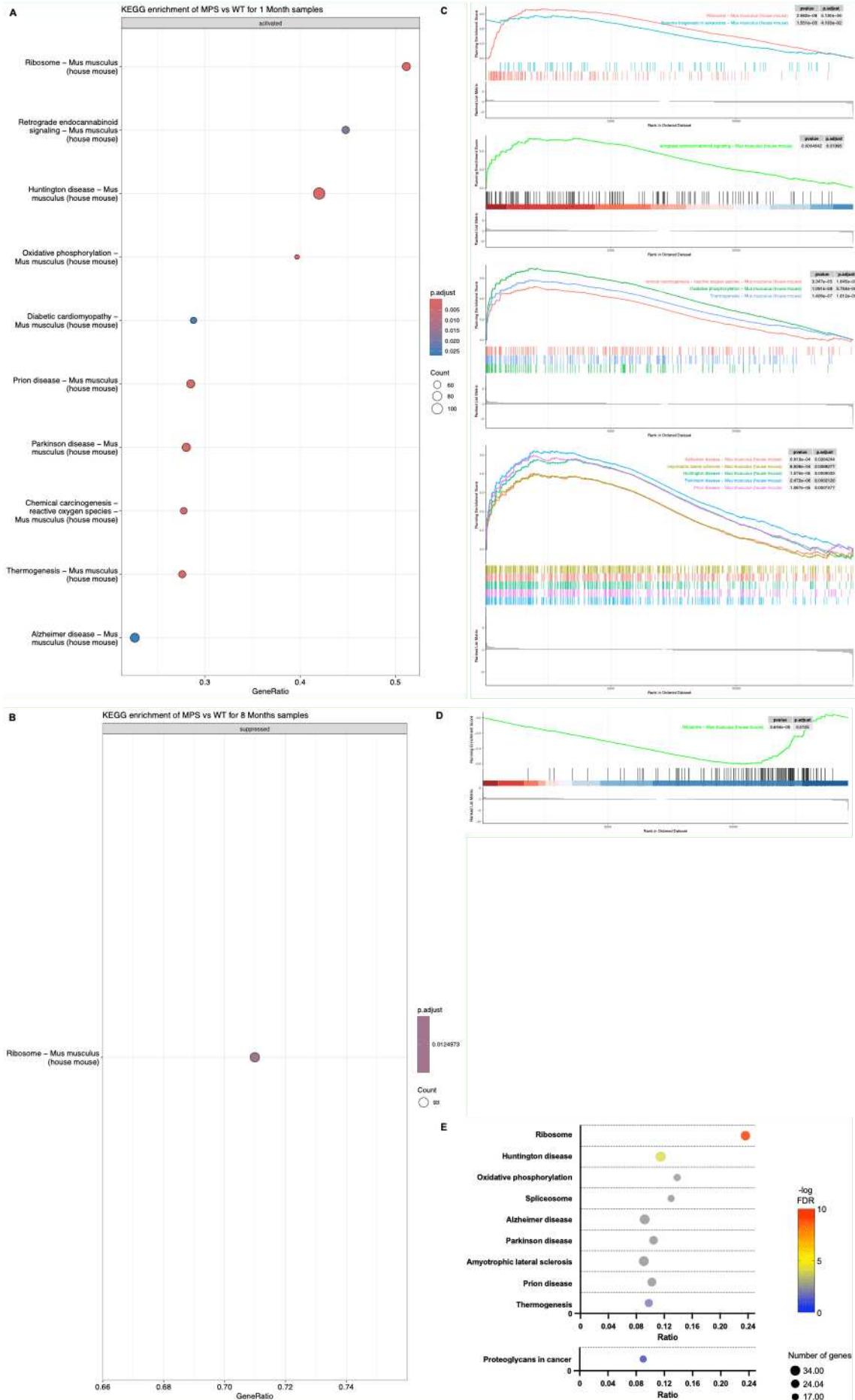


Fig. 3. Neuronal functional enrichment in gene ontology families after gene set enrichment analysis of mRNAs from neurons treated with WT-EVs vs. MPSIIIIB-EVs.

(A) Significant gene ontology (GO) biological process families activated (left panel) or suppressed (right panel) in 1mo-MPSIIIIB-neurons. (B) Significant gene ontology (GO) biological process families or suppressed in 1mo-MPSIIIIB-neurons. (A-B) GO families were ranked by their adjusted p-value. Each GO is shown as a circle, with the color representing the adjusted p-value, the size corresponds to the number of genes, and the X axis represents the gene ratios.

PARTIE EXPÉRIMENTALE



PARTIE EXPÉRIMENTALE

Fig. 4. Neuronal functional enrichment in KEGG biological pathways after gene set enrichment analysis or differential expression analysis of mRNAs from neurons treated with WT-EVs vs. MPSIIIB-EVs.

(A) Significant KEGG pathways activated in 1mo-MPSIIIB-neurons. (B) Significant KEGG pathway suppressed in 8mo-MPSIIIB-neurons. (C-D) Representative profiles of our gene set size founded in KEGG pathway, including genes present in the core enrichment defined by a high increase of the running enrichment score showed by the green curve. (E) KEGG pathways activated in 1mo-MPSIIIB-neurons and suppressed in 8mo-MPSIIIB-neurons using DEA gene list with a p-value < 0,05. (A, B and E) KEGG pathways were ranked by their adjusted p-value (A, B) or -log₁₀ FDR (E). Each KEGG is shown as a circle, with the color representing the adjusted p-value (A, B) or -log₁₀ FDR (E), the size corresponds to the number of genes, and the X axis represents the gene ratios.

Very interestingly, in 1mo-MPSIIIB-neurons we also identified activated KEGG pathways related to neurodegenerative diseases (i.e. mmu05012, Parkinson disease; mmu05020, Prion disease; mmu05016, Huntington disease; mmu05010, Alzheimer disease and mmu05014, Amyotrophic lateral sclerosis) and to Endocannabinoid system (i.e. mmu 04723, Retrograde endocannabinoid signaling) (Fig. 4A and C).

Finally, as we found only one biological pathway (Ribosome) altered in 8mo-MPSIIIB-neurons following the GSEA, we tried to query the STRING database using our DEA gene list using a p-value < 0,05. We found an interesting KEGG pathway, Proteoglycans in cancer (mmu05205) that was downregulated and most of the gene targets were located in the pathway specific to heparan sulfate. When using DEA gene list and STRING tool for 1mo-MPSIIIB-neurons, we were able to confirm all the KEGG pathways identified using GSEA.

Discussion

The onset of neuroinflammation in MPS IIIB due to HSOs accumulation is largely described and mainly attributed to microglia. But the mechanisms responsible for its spreading and the gliosis enhancement also involving astrocytes, still need to be elucidated. This chronic neuroinflammation and damages that it provokes are one of the major causes at the origin of neurodegeneration. It is well known in adult neurodegenerative diseases that EVs are key

PARTIE EXPÉRIMENTALE

players in the propagation of pathological content and participate to the transmission of neuroinflammation, but the role of EVs in MPS IIIB has never been investigated.

EVs are biological tools widely used to study the reflect of cells specific states. Their ability to transfer to recipient cell a complex molecular cargo offers the possibility to explore *ex vivo* intercellular communication.

Our first study reveals that EVs derived from an *in vitro* model of MPS III microglia transport cargo specifically related to the pathophysiology, and that their uptake by primary cortical neurons impair neurite growth. Yet we need to learn more about neuronal functional response. Here, to evaluate the involvement of EVs in the pathophysiology of MPS IIIB we choose to isolate EVs from mice brains at different stages of the disease and to study the neuronal transcriptional signature after their exposure to these different types of EVs.

MPS IIIB-EVs form early stage induce an adaptive response to stress by neurons

The first finding highlighted by this transcriptomic analysis, is that MPS IIIB-EVs from early stage induce in neurons an upregulation of oxidative phosphorylation process, from the increase of respiratory chain complex assembly to ATP biosynthesis. In fact, mitochondria are highly represented in neurons, which are high energy demanders, as ATP production and homeostasis functions are crucial to an efficient neurotransmission (4,5).

Moreover, ATP is mandatory for a lot of vital cellular processes such as protein synthesis, and we found in our study an increase of genes belonging to the ribosome KEGG pathway, translating an increase of ribosomal subunits mRNA expression. Therewith we observe in both presynaptic and postsynaptic compartments an increase of translation at synapse processes. It has been shown that ribosomes are highly located in synapses where they perform local protein synthesis which is essential for neurotransmitter biogenesis and release or synaptic plasticity (6). To regulate neurotransmission, the retrograde endocannabinoid signaling has been described to enhance protein synthesis through mTOR signaling. Very interestingly, it could be a part of the translation boost revealed in our model as the retrograde endocannabinoid (7).

Although KEGG pathways in neurodegenerative diseases and genes involved in are upregulated, most of them should be downregulated to lead to neurodegeneration.

Actually, common to all neurodegenerative diseases pathways (i.e. Alzheimer's, Parkinson's, Huntington's, Prion's and Amyotrophic Lateral Sclerosis) found in our analysis, there is an

PARTIE EXPÉRIMENTALE

increase of α -tubulin and β -tubulin subunits mRNAs. A study shows that local protein synthesis is also useful for dendritic growth (8). In our model, because of stress content delivered by MPS IIIB-EVs, we could hypothesize that neurons should increase their translation to reorganize their prolongments and synthetize new tubule proteins. Also, good neuronal network is essential to neurotransmission and for this, ribosomes need as well as mitochondria to be transported along microtubules to reach terminations (9).

Additionally, we found an upregulation of PSMs proteasome subunits and ubiquitin mRNAs. In MPS IIIC, ubiquitin material accumulation has been reported but was concomitant with proteasome defects (10). Here, as we are studying wildtype neurons (i.e. with an efficient Naglu enzyme and without HSOs accumulation) treated with pathogenic MPS IIIB-EVs, we could suppose that neurons initiate degradation of aggregated proteins drove by EVs (11). But if this EV-message could lead to this adaptative response by a well-developed neuron, we may think that in an MPS IIIB brain even if the neurodegeneration occurs in late stages, EV-cargo could be warning signs of disease (12).

Otherwise, we found in these neurodegenerative pathways mRNAs of enzymes producing reactive oxygen species (ROS). On one hand, it is known that ROS are a byproduct of oxidative phosphorylation and when mitochondrial activity is increased, this could lead to deleterious oxidative stress (13). On the other hand, we know that in MPS IIIB, oxidative stress is increasing independently of neuroinflammation, and that ROS products are massively secreted by all brain cells but mostly neurons due to their high number of mitochondria, and maybe this could be through EVs secretion (14). In our model we also note the induction of NADH dehydrogenase complex assembly biological process, which is targeting superoxide ions and reduce them, underlying once again active processes ran by neurons to fight against MPS IIIB-EVs (15).

MPS IIIB-EVs form early and intermediate stages induce feedback response to neuroinflammation by neurons

Quite surprisingly, neurons treated with one- and four-months MPSIII-EVs show decreased biological processes in immune response. As described, neuroinflammation is central in MPS IIIB pathophysiology (12,16,17), and inflammatory molecules are often transported by EVs, as shown in our first study on MPS III microglial-EVs and by others groups working in adult neurodegenerative diseases (18,19).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

The processes downregulated are related to inflammatory response, cytokine production, LPS response and TLR4 signaling and even if the neuron is not an immune hyperactive cell, it still has defense system and able to induce TLR4-NF κ B-NLRP3 signaling pathway (20,21).

We investigated genes involved in these GOBP families and we found that most of them are pro-inflammatory receptors. As reported in recent study, we can hypothesize that neurons send negative feedback to inflammation propagated by EVs, by downregulating the transcription of their inflammatory receptors, produce anti-inflammatory cytokines, and inhibit the signaling. Moreover, this study shows that EVs-derived from neurons spread anti-inflammatory content and regulate the microglia pro-inflammatory activity (22).

MPS IIIB-EVs form late stage impair neuronal survival

In contrast to findings in neurons treated with one-month MP SIIIB-EVs, those exposed to eight-months MPS IIIB-EVs showed a downregulation of ribosome KEGG pathway. Interestingly, almost all of the genes included in this pathway are the same found upregulated in the one-month condition. Consistent with neuronal imaging showing the decrease of neural network area, we could assume that due to MPS IIIB-EVs treatment, neurons no longer synthesize proteins and start neurodegeneration as reported in mouse model at this stage of the disease (12,23).

According to our result, KEGG proteoglycans in cancer pathway is downregulated in neurons and very interestingly, most of these genes are located on the specific HSPGs pathway leading in both downregulation of PI3K/AKT and MAPK/ERK signaling and finally to the decrease of cell survival (24).

Downregulation of HSPGs signaling suggests the presence of HSOs in MPS IIIB-EVs, maybe also attached to HSPGs in the coronary compartment of EVs, which those could be also already full of HSOs chains (25,26). Furthermore, it is well known that HSPGs are essential for EVs biogenesis and internalization (27,28). As MPS IIIB-EVs may transport accumulated HSOs, the neuron could physically stop their uptake or their spreading thought *de novo* EVs synthesis, by downregulating the translation and expression of HSPGs at the plasma membrane.

Finally, HSPGs is known as TLR4 co-receptor and can also mediate neuroinflammation by their own (29,30). In response to the massive pro-inflammatory cargo from MPS IIIB-EVs and consistently with the advanced neuropathology, decrease of HSPGs expression may be the last feedback sent by neurons for their survival.

Conclusion

Taking together, these results following transcriptomic analysis of primary cortical neurons treated with MPS IIIB-EVs isolated at different stage of the disease revealed that EVs participate to the spreading of the disease maybe thought the transport of inflammatory and oxidative content as it has been already described. Also, we are convinced that they propagate HSOs, although this remains to be confirmed. Furthermore, MPS IIIB-EVs drive specific content and induce effects according to the evolution of the disease highlighting the fact that EVs could be good surrogate markers for monitoring gene therapy efficiency.

Material and Methods

Mouse models

Mouse experiments were performed by authorized investigators and were in compliance with the guidelines of the European Union (2010/63/EU) and the French Committee of Ethics (87/848) policies and with the specific approval from the local ministry-approved committee on ethics in animal experimentation (Ethics Committee UMS006 CEEA-122, projects APAFIS #28713-202012151508886 v2 and PI-U1291-JA-37). C57Bl/6J^{Naglu^{-/-}} MPSIIIB mice for brain collection were obtained from Professor E. Neufeld (UCLA, Los Angeles, CA) (31). C57Bl/6J mice for primary cortical neurons culture were purchased from Charles River Laboratories (Saffron Walden, UK). Housing, care, coupling and gestation were performed in the US 006/CREFRE INSERM/UPS - Service de production Ranguel and Zootechnie Expérimentation Purpan animal facility (Toulouse, France).

MPSIIIB mouse model has been described previously (31,32) and C57Bl/6J^{Naglu^{-/-}} mutant and C57Bl/6J^{Naglu^{+/+}} embryos were identified by PCR on DNA from tail clippings.

Brain collection

Brains were isolated from mice at 1, 4 or 8 months (see Table 1). Before brain collection, in order to remove all the blood in brain vessels mice were perfused intracardially with 0,9% NaCl for 10 min with a peristaltic pump. Brains were extracted from the cranial cavity, cerebellum and brain stem was removed. Hemispheres were separated, placed in collection cryotube, and quickly frozen in liquid nitrogen. All brains used were cryopreserved at -80°C.

Isolation and characterization of EVs from brain tissue

Isolation of EVs

Procedures were adapted from references (1,33,34), according to International Society for Extracellular Vesicles guidelines (2) (see Fig. 1A for a detailed diagram of the experiment scheme for ultracentrifugation).

For each EV purification, 1/3 of one hemisphere (representing approximately 50 mg) was collected and must contain cortical layers and subcortical areas including basal ganglia. Tissues were sliced in cold Hibernate E medium (Fisher Scientific) with scalpel in 1 mm sections before incubation for 15 min at 37°C in a mix of 15% ultrapure water and 85% Hank's balanced salt solutions (HBSS, Sigma) containing 20U of papain (Sigma). The lysis reaction was stopped by

PARTIE EXPÉRIMENTALE

adding 1:1 cold Hibernate E medium and the homogenate was gently dissociated in and then filtered on 40 μm sterile cell strainer.

Suspensions were centrifuged at 4°C in 50 mL or 15 mL centrifuge tubes (Falcon) with a 5810R centrifuge and an A-4-81 rotor (Eppendorf) and in 13.2 mL polyallomer Ultra Clear ultracentrifuge tubes (Beckman Coulter) with an Optima XPN-80 ultracentrifuge and an SW 41 Ti Rotor (Beckman Coulter) at maximum acceleration and brake, except for sucrose gradient density for which the acceleration was set at 5 and with no brake.

To pellet the cells, conditioned medium was centrifuged at $300 \times g$ for 10 min at 4°C (yielding the 0.3K pellet). Supernatant was centrifuged at $2,000 \times g$ for 10 min at 4°C (yielding the 2K pellet), transferred to ultracentrifugation tubes, and ultracentrifuged first for 10 min at $10,000 \times g$ (yielding the 10k pellet) before 0.2 μm filtration of the 10K supernatant and then for 70 min at $140,000 \times g$ (yielding the 140k pellet). The 140k pellets were resuspended in 0.475 M sucrose (Sigma) diluted in PBS 1X (Eurobio). Sucrose density gradient was manually created in 13.2 mL polyallomer Ultra Clear ultracentrifuge tube with steps starting from 2.0 M to 1.5 M, 1.0 M, 0.825 M, 0.65 M, and 0.475 M (corresponding to approximately from 1.28 to 1.06 g/cm^3) containing the resuspended pellet. The gradient was ultracentrifuged for 20 h at $200,000 \times g$ at 4°C yielding 7 fractions (numerated from III to IX) with corresponding to interphases between the different density.

For characterization, each fraction was diluted in PBS in 13.2 mL polyallomer Ultra Clear ultracentrifuge tube and ultracentrifuged for 90 min at $140,000 \times g$ at 4°C.

For neuron treatments, V to VII fractions were pooled and diluted in PBS 1X in 13.2 mL polyallomer Ultra Clear ultracentrifuge tube and ultracentrifuged for 90 min at $140,000 \times g$ at 4°C.

All EV preparations used were cryopreserved at -80°C in sterile (0.22 μm filtered) PBS containing 25 mM trehalose (35,36). The EV concentration per mL was quantified by NTA.

NTA

The size distribution and particle concentrations of EV preparations were analyzed using a NanoSight NS300 NTA system (Malvern Panalytical) equipped with a blue laser (488 nm, 70 mW), a CMOS camera (Hamamatsu Photonics), and a syringe pump. EV preparations were resuspended in 100 μL of sterile, filtered PBS containing 25 mM trehalose and stored at -80°C before the NTA experiment. Next, the EV preparations were diluted 1:1000 in filtered PBS for the measurement of 20–100 particles/frame under all conditions, injected at a speed of 30 arbitrary units into the measurement chamber. The EV flow was recorded during triplicate

PARTIE EXPÉRIMENTALE

measurements of 60 s each, at 20°C. The data acquisition settings were the same in all experiments, with the camera level set to 9-11, the screen gain set to 7, and the threshold set to 3-4. Data from at least three different experiments were analyzed with NTA 3.2 software (Malvern Panalytical).

Transmission Electron Microscopy (TEM)

EV preparations were resuspended in 100 mM Tris-HCl and stored at 4°C for 24h at most before the TEM experiment. The EV samples were prepared for TEM in a conventional negative staining procedure. Briefly, 10 µL of EV samples were absorbed for 2 min on formvar-carbon-coated copper grids previously ionized using the PELCO easyGlow™ Glow Discharge Cleaning System (Ted Pella Inc., Redding, CA, USA). Preparations were then blotted and negatively stained with 1% uranyl acetate for 1 min. Grids were examined using an 80 kV JEM-1400 electron microscope (JEOL Inc., Peabody, MA, USA), and images were acquired with a digital camera (Gatan Orius, Gatan Inc., Pleasanton, CA, USA).

Protein extraction

EV preparations and 0.3K, 2K and 10K pellets were lysed in RIPA lysis buffer 1X (Sigma) supplemented with protease inhibitor cocktail (Roche) for 20 min on ice, centrifuged at 18,500 × g for 15 min, and stored at -20°C before western blotting experiments.

Western blotting

The protein concentration in cell lysates was assayed using a BCA gold kit (Life Technologies). Proteins were denatured (or not) in Laemmli buffer under reducing conditions (5% β-mercaptoethanol) and then heated for 5 min at 95°C. 5 µg of proteins from 0.3K, 2K and 10K pellets or a third of the EV protein extract were loaded onto 4–15% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels (Biorad) in Tris-glycine buffer for electrophoresis at constant amperage (20 mA per gel) for 1h. Proteins were electrotransferred onto nitrocellulose membranes using the trans-blot turbo transfer system (constant voltage: 25V, maximum amperage: 1 A; 30 min, Biorad) and membranes were blocked with Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 (TBST), 5% milk, or bovine serum albumin (BSA) for 2h at room temperature. Membranes were then incubated with primary antibodies in TBST containing 5% milk or BSA overnight at 4°C, followed by incubation with secondary antibodies for 1h at room temperature (see Table 2 for antibody dilutions and blocking conditions). Membranes were washed five times in TBST

PARTIE EXPÉRIMENTALE

for 5 min after each incubation step and visualized using the Chemidoc XRS+ Imaging System (LI-COR Biosciences). None of the membrane was stripped.

Culture and treatment of primary cortical neurons

Dissociation and culture of primary cortical neurons

Primary cortical neurons were prepared from newborn C57BL/6J mice, using a protocol adapted from (37) as previously described (**ref Dias et al**). Briefly, the neocortices were isolated from pups on day 0-1 and after dissociation the cells were filtered through a 4% BSA cushion by centrifugation, and seeded at a density of 500000 cells/well in 12-well plates. The plates had been coated with 1 mg/mL poly-D-lysine (Merck).

Treatment of neurons with mouse brain EVs

Primary cortical neurons were maintained for 7 days (DIV 7) before EV treatment at 37°C in 5% CO₂ and cultured in serum-free Neurobasal medium (Life Technologies) supplemented with 1.2% GlutaMAX-I (Life Technologies), 1.2 U/mL of penicillin, 1.2 µg/mL streptomycin, and 2% B-27 supplement (Life Technologies). Neurons were treated from DIV 7 to DIV 9 with 1.25 x 10⁹ EVs per well or with vehicle every 24h for 72h (see Table 2).

Cells were detached from wells (3 for each condition) and pooled before centrifugation at 400 × g for 10 min at 4°C and total RNA was directly extracted.

Transmission microscopy

All the neurons' purifications and treatments were followed and imaged using an Invitrogen EVOS M5000 (Thermofisher, Waltham, MA, USA) phase contrast optical microscope, with a 10X wide field objective.

RT-qPCR and small RNA sequencing

RNA extraction

For RNA sequencing and RTqPCR of miRNAs, total RNAs from brain tissues, cell lysates and EV preparations were extracted using the miRNeasy Tissue/Cells Advanced Micro Kit (QIAGEN), according to the manufacturer's instructions. The purified RNAs were eluted into 20 µL nuclease-free water, quantified using Nanodrop 2000 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific), and stored at -80°C until analysis.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

RT-qPCRs of miRNA

For miRNAs, RT and amplification was performed using miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit (QIAGEN), according to the manufacturer's instructions. For RT, a synthetic RT spike-in internal control (UniSp6) was added, and reactions were incubated in a thermocycler for 60 min at 42 °C and then 5 min at 95 °C to inactivate the reaction. Amplification of first-strand cDNAs was performed on a LightCycler 480 Real-Time PCR system (Roche) in 96-well plates at 95 °C for 2 min and 45 cycles of 95 °C for 10 s and 56 °C for 60 s, followed by melting curve analysis at 60–95 °C. The expression levels of the endogenous miRNAs and spike-ins were examined using the miRCURY LNA miRNA PCR Assay (QIAGEN), using primers designed for the *Homo sapiens* genome and validated for the *Mus musculus* genome (Table 3). Gene expression-level differences were considered to be as statistically significant if they had a p-value <0.05 in an ordinary one-way ANOVA. Four independent replicates were analyzed in technical duplicates.

Additional controls were performed for each cDNA amplification: the assessment of amplification efficiency, and the detection of possible primer dimerization via an analysis of dissociation curves. The cycle threshold (Ct) value was determined as the number of PCR cycles at which specific amplification of the target sequence occurred. A Ct >38 was considered to be the background signal. The amount of cDNA was expressed as ΔCt , the difference between the Ct measured for the amplification of the examined cDNA and the reference Ct measured for the amplification of miR-103a-3p cDNAs. The fold change was expressed as $\Delta\Delta Ct$, which is the difference between the ΔCt in the treated condition and the ΔCt of the control condition.

Library preparation and RNA sequencing

RNA was quantified using the Qubit RNA HS Assay Kit assay kit on the Qubit Fluorometer (Invitrogen). The quality was evaluated on an Agilent 4150 TapeStation with the High Sensibility RNA ScreenTape kit (Agilent). Each sample's libraries were built with the Illumina stranded total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus (Illumina, 20040529) with ILMN RNA UDI B Lig Index 96 idx 96 spl (Illumina, 20040554) according to the manufacturer's instructions, and quantified using the Qubit 1X dsDNA HS kit on the Qubit Fluorometer (Invitrogen). All libraries were sequenced using a single-read strategy (400 million reads per sample) on an NextSeq550 platform, with 300 cycles of the HighOutput flowcell (Illumina), a read length of 2x150 bp, and dual indices of 10 bp, for a production of 25M reads/sample. Raw data were converted to FASTQ files using bcl2fastq (v2.20).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Bioinformatic analysis

Quantification of RNA expression

Raw sequencing reads were processed using the nf-core RNAseq pipeline v.3.9 developed using Nextflow (38,39). Briefly, this pipeline trims adapters and removes low quality sequences using Cutadapt v.3.4 wrapped with Trimgalore v.0.6.7 (40,41). Then, STAR v.2.7.10a (42) aligns trimmed reads to the Mus Musculus GRCm39 assembly with annotation v.107 using parameters

```
--outSAMstrandField intronMotif --quantTranscriptomeBan Singleend --runRNGseed 0  
--twopassMode Basic --quantMode TranscriptomeSAM. Finally, Salmon v.1.5.2 (43)  
quantifies reads with parameter --libType=ISR.
```

Differential Expression Analyses

Expressed genes were identified as genes with at least 10 raw counts for two samples of a same condition. The R package DESeq2 v.1.40.2 was used to normalize and perform the differential expression analyses (44). PCA performed on variance-stabilized counts shown a strong batch effect between samples. This batch effect was corrected in two different ways depending on the analyses.

For DEA between WT and MPS of a same month, one normalization was performed per month. The design formula was set to \sim batch + condition. For DEA between samples from different months, we used the sva package v.3.35.2. The number of surrogate variables was set to the minimum required to correct for batch clustering in PCA, here 5. These 5 variables were then added to the design formula of DESeq2 object.

Enrichment analyses

Enrichment analyses were performed with the R package clusterProfiler v.4.10.1 (45) on gene sets from Gene Ontology (GO.db_3.18.0), KEGG (online version of 4th of April 2024), Reactome (reactome.db_1.86.2) and Wikipathway (online version 20240410) databases. Gene Set Expression Analyses were performed on gene list ranked by log2FoldChange extracted from DESeq2 object. Over Representation Analyses were performed on DEG defined as genes with an adjusted p-value below 0.05.

Statistical analyses

All statistical tests were performed with GraphPad Prism software (version 10.1.0, GraphPad Software LLC, San Diego, CA, USA). Intergroup differences were analyzed using an

PARTIE EXPÉRIMENTALE

independent-sample T-test. The threshold for statistical significance was set to $p < 0.05$, unless otherwise stated. Data were expressed as the mean \pm SEM.

Table 1 : Characteristics of mice populations

Mouse code	Genotype	Sexe	Age (days)	Phenotype
1mo-WT_1	WT	M	30	/
1mo-WT_2	WT	F	30	/
1mo-WT_3	WT	M	32	/
1mo-WT_4	WT	M	33	/
1mo-MPS_1	KO Naglu	M	31	Mild neuroinflammation
1mo-MPS_2	KO Naglu	F	31	Mild neuroinflammation
1mo-MPS_3	KO Naglu	M	40	Mild neuroinflammation
1mo-MPS_4	KO Naglu	F	33	Mild neuroinflammation
4mo-WT_1	WT	M	120	/
4mo-WT_2	WT	M	124	/
4mo-WT_3	WT	M	120	/
4mo-WT_4	WT	M	122	/
4mo-MPS_1	KO Naglu	M	116	Moderate neuroinflammation, neurotransmission defects
4mo-MPS_2	KO Naglu	M	110	Moderate neuroinflammation, neurotransmission defects
4mo-MPS_3	KO Naglu	M	116	Moderate neuroinflammation, neurotransmission defects
4mo-MPS_4	KO Naglu	F	116	Moderate neuroinflammation, neurotransmission defects
8mo-WT_1	WT	M	243	/
8mo-WT_2	WT	M	254	/
8mo-WT_3	WT	M	254	/
8mo-WT_4	WT	M	254	/
8mo-MPS_1	KO Naglu	F	276	Chronic neuroinflammation, neurodegeneration, motor and cognitive decline
8mo-MPS_2	KO Naglu	F	255	Chronic neuroinflammation, neurodegeneration, motor and cognitive decline
8mo-MPS_3	KO Naglu	F	250	Chronic neuroinflammation, neurodegeneration, motor and cognitive decline
8mo-MPS_4	KO Naglu	F	250	Chronic neuroinflammation, neurodegeneration, motor and cognitive decline

Table 2: Western blot antibodies

Antigen	Host/target species	Dilution	Supplier
ANXA2	Rabbit anti-human, mouse, rat, dog	1:500	Abcam (ab41803)
CD9	Rabbit anti-human, mouse	1:2000	GeneTex (GTX55564)
CD81	Mouse anti-mouse, rat, human	1:500	Santa Cruz (Sc-166029)
GM130	Mouse anti-rat, mouse, human, dog	1:500	BD Biosciences (610823)
Mouse-HRP	Horse	1:2000	Cell Signaling (7076S)
Rabbit-HRP	Goat	1:2000	Cell Signaling (7074S)

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Table 3: RT-qPCR primers

Target	Sequence
hsa-miR-103a-3p	5'-AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA-3' (YP00204063)
hsa-miR-100-5p	5'-AACCCGUAGAUCGGAACUUGUG-3' (YP00205689)
hsa-miR-221-3p	5'-AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC-3' (YP00204532)
mmu-miR-155-5p	5'-UUA AUGCUAAUUGUGAUAGGGGU-3' (YP02119303)
hsa-miR-146a-5p	5'-UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU-3' (YP00204688)
UniSp6	(YP00203954)

References

1. Muraoka S, Lin W, Chen M, Hersh SW, Emili A, Xia W, et al. Assessment of separation methods for extracellular vesicles from human and mouse brain tissues and human cerebrospinal fluids. *Methods*. mai 2020;177:35-49.
2. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, 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. *Journal of Extracellular Vesicles*. 1 déc 2018;7(1):1535750.
3. Welsh JA, Goberdhan DCI, O'Driscoll L, Buzas EI, Blenkiron C, Bussolati B, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *J Extracell Vesicles*. févr 2024;13(2):e12404.
4. Lee A, Hirabayashi Y, Kwon SK, Lewis TL, Polleux F. Emerging roles of mitochondria in synaptic transmission and neurodegeneration. *Current Opinion in Physiology*. 1 juin 2018;3:82-93.
5. Ly CV, Verstreken P. Mitochondria at the Synapse. *Neuroscientist*. août 2006;12(4):291-9.
6. Hafner AS, Donlin-Asp PG, Leitch B, Herzog E, Schuman EM. Local protein synthesis is a ubiquitous feature of neuronal pre- and postsynaptic compartments. *Science*. 17 mai 2019;364(6441):eaau3644.
7. Younts TJ, Monday HR, Dudok B, Klein ME, Jordan BA, Katona I, et al. Presynaptic Protein Synthesis Is Required for Long-Term Plasticity of GABA Release. *Neuron*. 19 oct 2016;92(2):479-92.
8. Slomnicki LP, Pietrzak M, Vashishta A, Jones J, Lynch N, Elliot S, et al. Requirement of Neuronal Ribosome Synthesis for Growth and Maintenance of the Dendritic Tree. *J Biol Chem*. 11 mars 2016;291(11):5721-39.
9. Zaninello M, Bean C. Highly Specialized Mechanisms for Mitochondrial Transport in Neurons: From Intracellular Mobility to Intercellular Transfer of Mitochondria. *Biomolecules*. juin 2023;13(6):938.
10. Pan X, Taherzadeh M, Bose P, Heon-Roberts R, Nguyen ALA, Xu T, et al. Glucosamine amends CNS pathology in mucopolysaccharidosis IIIC mouse expressing misfolded HGSNAT. *Journal of Experimental Medicine*. 15 juin 2022;219(8):e20211860.
11. Fernández-Cruz I, Reynaud E. Proteasome Subunits Involved in Neurodegenerative Diseases. *Archives of Medical Research*. 1 janv 2021;52(1):1-14.
12. Wilkinson FL, Holley RJ, Langford-Smith KJ, Badrinath S, Liao A, Langford-Smith A, et al. Neuropathology in Mouse Models of Mucopolysaccharidosis Type I, IIIA and IIIB. Kremer EJ, éditeur. *PLoS ONE*. 27 avr 2012;7(4):e35787.
13. Nolfi-Donagan D, Braganza A, Shiva S. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biology*. 1 oct 2020;37:101674.
14. Trudel S, Trécherel E, Gomila C, Peltier M, Aubignat M, Gubler B, et al. Oxidative stress is independent of inflammation in the neurodegenerative Sanfilippo syndrome type B. *J Neurosci Res*. mars 2015;93(3):424-32.
15. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. 1 janv 2009;417(Pt 1):1-13.
16. Ausseil J, Desmaris N, Bigou S, Attali R, Corbineau S, Vitry S, et al. Early Neurodegeneration Progresses Independently of Microglial Activation by Heparan Sulfate in the Brain of Mucopolysaccharidosis IIIB Mice. El Khoury J, éditeur. *PLoS ONE*. 28 mai 2008;3(5):e2296.
17. Bigger BW, Begley DJ, Virgintino D, Pshezhetsky AV. Anatomical changes and

PARTIE EXPÉRIMENTALE

pathophysiology of the brain in mucopolysaccharidosis disorders. *Molecular Genetics and Metabolism*. 1 déc 2018;125(4):322-31.

18. Gabrielli M, Raffaele S, Fumagalli M, Verderio C. The multiple faces of extracellular vesicles released by microglia: Where are we 10 years after? *Frontiers in Cellular Neuroscience* [Internet]. 2022 [cité 6 nov 2023];16. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2022.984690>

19. Prada I, Gabrielli M, Turola E, Iorio A, D'Arrigo G, Parolisi R, et al. Glia-to-neuron transfer of miRNAs via extracellular vesicles: a new mechanism underlying inflammation-induced synaptic alterations. *Acta Neuropathol*. 1 avr 2018;135(4):529-50.

20. Leow-Dyke S, Allen C, Denes A, Nilsson O, Maysami S, Bowie AG, et al. Neuronal toll-like receptor 4 signaling induces brain endothelial activation and neutrophil transmigration in vitro. *Journal of Neuroinflammation*. 3 oct 2012;9(1):230.

21. Mandolfo O, Parker H, Bigger B. Innate Immunity in Mucopolysaccharide Diseases. *IJMS*. 11 févr 2022;23(4):1999.

22. Peng H, Harvey BT, Richards CI, Nixon K. Neuron-Derived Extracellular Vesicles Modulate Microglia Activation and Function. *Biology (Basel)*. 22 sept 2021;10(10):948.

23. Jiao L, Liu Y, Yu XY, Pan X, Zhang Y, Tu J, et al. Ribosome biogenesis in disease: new players and therapeutic targets. *Sig Transduct Target Ther*. 9 janv 2023;8(1):1-22.

24. Tóthová Z, Šemeláková M, Solárová Z, Tomc J, Debeljak N, Solár P. The Role of PI3K/AKT and MAPK Signaling Pathways in Erythropoietin Signalization. *IJMS*. 19 juill 2021;22(14):7682.

25. Gerlach JQ, Griffin MD. Getting to know the extracellular vesicle glycome. *Mol BioSyst*. 22 mars 2016;12(4):1071-81.

26. Heidarzadeh M, Zarebkohan A, Rahbarghazi R, Sokullu E. Protein corona and exosomes: new challenges and prospects. *Cell Communication and Signaling*. 27 mars 2023;21(1):64.

27. Cerezo-Magaña M, Bång-Rudenstam A, Belting M. The pleiotropic role of proteoglycans in extracellular vesicle mediated communication in the tumor microenvironment. *Seminars in Cancer Biology*. 1 mai 2020;62:99-107.

28. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. avr 2018;19(4):213-28.

29. Collins LE, Troeberg L. Heparan sulfate as a regulator of inflammation and immunity. *J Leukoc Biol*. janv 2019;105(1):81-92.

30. O'Callaghan P, Zhang X, Li JP. Heparan Sulfate Proteoglycans as Relays of Neuroinflammation. *J Histochem Cytochem*. avr 2018;66(4):305-19.

31. Li HH, Yu WH, Rozengurt N, Zhao HZ, Lyons KM, Anagnostaras S, et al. Mouse model of Sanfilippo syndrome type B produced by targeted disruption of the gene encoding α -N-acetylglucosaminidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 7 déc 1999;96(25):14505-10.

32. Puy V, Darwiche W, Trudel S, Gomila C, Lony C, Puy L, et al. Predominant role of microglia in brain iron retention in Sanfilippo syndrome, a pediatric neurodegenerative disease. *Glia*. août 2018;66(8):1709-23.

33. Perez-Gonzalez R, Gauthier SA, Kumar A, Levy E. The Exosome Secretory Pathway Transports Amyloid Precursor Protein Carboxyl-terminal Fragments from the Cell into the Brain Extracellular Space. *Journal of Biological Chemistry*. déc 2012;287(51):43108-15.

34. Vella LJ, Scicluna BJ, Cheng L, Bawden EG, Masters CL, Ang CS, et al. A rigorous method to enrich for exosomes from brain tissue. *Journal of Extracellular Vesicles*. 1 déc 2017;6(1):1348885.

35. Bosch S, de Beaurepaire L, Allard M, Mosser M, Heichette C, Chrétien D, et al. Trehalose prevents aggregation of exosomes and cryodamage. *Sci Rep*. déc 2016;6(1):36162.

36. Görgens A, Corso G, Hagey DW, Jawad Wiklander R, Gustafsson MO, Felldin U, et al.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

- Identification of storage conditions stabilizing extracellular vesicles preparations. *J Extracell Vesicles*. juin 2022;11(6):e12238.
37. Ferré CA, Davezac N, Thouard A, Peyrin JM, Belenguer P, Miquel MC, et al. Manipulation of the N-terminal sequence of the Borna disease virus X protein improves its mitochondrial targeting and neuroprotective potential. *FASEB J*. avr 2016;30(4):1523-33.
38. Di Tommaso P, Chatzou M, Floden EW, Barja PP, Palumbo E, Notredame C. Nextflow enables reproducible computational workflows. *Nat Biotechnol*. 11 avr 2017;35(4):316-9.
39. Ewels PA, Peltzer A, Fillinger S, Patel H, Alneberg J, Wilm A, et al. The nf-core framework for community-curated bioinformatics pipelines. *Nat Biotechnol*. mars 2020;38(3):276-8.
40. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*. 2 mai 2011;17(1):10-2.
41. Krueger F. Trim Galore [Internet]. 2023 [cité 3 mai 2023]. Disponible sur: <https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore>
42. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 1 janv 2013;29(1):15-21.
43. Patro R, Duggal G, Love MI, Irizarry RA, Kingsford C. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat Methods*. avr 2017;14(4):417-9.
44. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. déc 2014;15(12):550.
45. Wu T, Hu E, Xu S, Chen M, Guo P, Dai Z, et al. clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. *The Innovation*. 28 août 2021;2(3):100141.

3 DISCUSSION ET PERSPECTIVES

A ce jour, la mucopolysaccharidose de type III demeure une maladie pédiatrique sévère et mortelle. Bien que tous les gènes soient connus et leurs anomalies moléculaires identifiables, la MPS III reste difficilement diagnosticable et incurable. Évidemment la recherche clinique reste la priorité et des efforts considérables sont mis en place dans le développement de thérapies efficaces. Cependant elle nécessite un apport constant par la recherche fondamentale en connaissances physiopathologiques, sans quoi la découverte de traitements et d'outils de diagnostic et de suivi adaptés reste vaine. Car si cette maladie est monogénique, elle conduit à une pléthore de conséquences cellulaires et moléculaires nécessitant chacune notre considération. Ainsi, mon équipe et moi-même nous sommes intéressés au rôle des EVs dans le développement et l'évolution de la pathologie de la MPS III. Tant pour la pertinence que représente cet objet biologique dans la dissémination de contenu pathologique riche et complexe que dans son utilisation en recherche translationnelle.

L'ensemble de mes travaux de thèse ont permis de démontrer, dans des modèles de MPS III, que les EVs jouent un rôle dans la progression de la neuropathologie. Et que le contenu et les effets qui leur sont associés chez les neurones sont dépendants du stade d'évolution de la maladie. Ces résultats descriptifs et fonctionnels sont les premiers sur des EVs dans le contexte de la MPS III et des MSLs neuropathiques ouvrent une perspective stimulante pour la continuité de la recherche dans ce domaine. En effet, mon travail de thèse pose aujourd'hui de nombreuses hypothèses à élucider et de nouvelles voies à explorer, en suivant des perspectives à plus ou moins long terme.

Altération de la morphologie neuritique et réponse adaptative du neurone

Premièrement, j'ai vu que le contenu spécifique des MPS III-EVs provenant de microglie activée par les GAGs de patients – qui pourrait s'apparenter à un modèle inflammatoire aigu à travers l'activation microgliale dépendante de la voie TLR4 – modifie la morphologie neuronale et particulièrement celle des dendrites. Par des cascades cellulaires à identifier, j'ai pu révéler

PARTIE EXPÉRIMENTALE

par microscopie à fluorescence que les neurones présentaient des altérations déjà observées dans différents modèles *in vivo* de la MPS III. Telle que l'augmentation du nombre de dendrites, plus courtes, conduisant directement à une modification de l'arborisation dendritique devenant moins ramifiée (Hocquemiller et al. 2010; Pará et al. 2021). Effectivement, l'immunomarquage des dendrites est réalisé par MAP2 qui n'est autre qu'une protéine stabilisatrice des microtubules et dont la diminution du marquage aurait un lien direct avec la dépolymérisation de ces derniers.

Nous pourrions faire l'hypothèse que l'augmentation du nombre de ces dendrites serait la conséquence d'une atteinte du réseau neuronal induite par un stress, conduisant le neurone à créer une multitude de nouveaux prolongements dans le but d'établir des connexions. Cette croissance accrue de prolongements, pourrait expliquer l'augmentation de la surface des somas que nous avons remarquée dans les neurones traités par les MPS III-EVs. Cette caractéristique a déjà été décrite dans des modèles MPS IIIB humain et canin traduisant une accumulation de matériel et de vacuoles (Hamano et al. 2008; Harm et al. 2021). Dans notre modèle nous pouvons avancer que ce n'est pas causé par une augmentation de vacuoles LC3-B+, puisque j'ai réalisé un immunomarquage qui n'a pas montré de différence entre les conditions (résultats non présentés). Nous pourrions également l'expliquer par une augmentation du nombre de mitochondries dans le corps cellulaire (Seager et al. 2020). D'une part par une potentielle diminution du transport de ces mitochondries le long des prolongements, puisque ceux-ci sont altérés et d'autre part par une augmentation de la phosphorylation oxydative fournissant l'énergie nécessaire à cette croissance comme nous l'avons observé dans les neurones traités par des MPS IIIB-EVs de souris de 1 mois (Lee et al. 2018; Zaninello et Bean 2023). Cette phosphorylation oxydative serait directement liée à la présence de ribosomes nécessaires à la synthèse des protéines et qui pourraient aussi participer à ce gonflement du soma (Hafner et al. 2019). Les résultats de transcriptomique nous ont ouvert de nombreuses pistes que nous devons rapidement valider par des tests fonctionnels, tels que la mesure de l'activité mitochondriale ou de synthèse protéique. De même, il serait intéressant de caractériser l'arbre dendritique des neurones traités par des MPS IIIB-EVs de souris de 1 mois, pour évaluer si l'augmentation de la phosphorylation oxydative, de la traduction des protéines et de l'expression des mRNAs de sous-unités de tubuline est directement liée à ces changements d'organisation des dendrites.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Dans ce sens, j'ai aussi remarqué une augmentation du nombre d'épines dendritiques immatures, et considérant la désorganisation dendritique, qui serait certainement liée à un défaut de maturation des épines et traduisant une diminution de synaptogenèse, et *in fine* une neurotransmission défectueuse (Pará et al. 2021). Je me suis intéressée à cette synaptogenèse par microscopie à fluorescence, en marquant tout d'abord la protéine synaptophysine, mais malheureusement je n'ai pas réussi à mettre au point ce marquage sur les neurones primaires. Comme alternative, nous pourrions marquer les vésicules synaptiques en ciblant la synapsine-1 ou encore les densités post-synaptiques avec la PSD-95 ou la géphyrine, et réaliser une analyse plus poussée de la morphologie des épines dendritiques.

De manière intéressante par analyse prédictive j'ai pu observer que le miR-221-3p cible principalement des mRNAs, dont il pourrait réprimer la traduction, impliqués dans le guidage axonal et la synaptogenèse. Par exemple, il aurait parmi ses nombreuses cibles la β -synucléine qui se trouve être essentielle dans la plasticité synaptique mais qui aurait aussi pour rôle d'empêcher l'agrégation de l' α -synucléine dans la maladie de Parkinson (Hashimoto et al. 2001). Ou encore l' α -tubuline, que nous avons également trouvée comme modulée dans l'étude transcriptomique des neurones traités par les MPS IIIB-EVs issus du stade précoce de la maladie, et qui est directement liée à la polymérisation des microtubules et donc le guidage axonal. Dans les modèles MPS IIIA, B et C, il a déjà été rapporté la présence d'altérations de l'axone dans sa croissance ou son guidage, son gonflement avec l'apparition de structures sphéroïdes, ou des défauts de myélinisation (cible principale du miR-100-5p). Ces défauts, communs à ceux des maladies neurodégénératives de l'adulte impliquent l'accumulation d' α -synucléine ou encore Tau, qui n'est autre que la protéine stabilisatrice des microtubules axonaux et qui s'accumule dans la maladie d'Alzheimer (Beard et al. 2017; Bigger et al. 2018; Pan et al. 2022; Pará et al. 2021).

Par analyse prédictive j'ai aussi montré que le contenu des MPS III-EVs de microglie est enrichi en miR-221-3p mais dépourvu en protéines qui sont impliquées dans le guidage axonal. Cependant je n'ai pas pu, par un immunomarquage à la β III-tubuline, apprécier de différence morphologique de l'axone. Il me paraîtrait donc intéressant de marquer la protéine tau afin d'évaluer les caractéristiques physiques de l'axone, et nous pourrions également utiliser des chambres microfluidiques ou l'imagerie "en live" pour analyser la pousse et le guidage axonal suite à une exposition aux EVs (Gu et al. 2014). De plus nous pourrions réaliser les traitements

PARTIE EXPÉRIMENTALE

des neurones par les EVs, avant que ceux-ci aient formé leurs réseaux, ainsi nous pourrions voir si les MPS III-EVs et 1mo-MPS IIIB-EVs empêchent la croissance des neurites et à l'inverse, si les WT-EVs et 1mo-WT-EVs la potentialise, comme rapporté par certaines études (Lemaire et al. 2019; Mallach et al. 2021).

Finalement, il me semble pertinent d'évaluer l'expression du miR-221-3p dans les 1mo-MPS IIIB-EVs, car j'ai pu le tester dans les 4mo-MPS IIIB-EVs et 4mo-WT-EVs mais nous n'avons pas observé de différence d'expression, ce miRNA étant très fortement exprimé basalement dans ces EVs de cerveaux. Nous pourrions faire de même pour le miR-100-5p, voir réaliser une étude du miRNome sur les EVs de cerveaux.

De manière intéressante, les LPS-EVs ne semblent pas altérer de la même façon que les MPSIII-EVs l'organisation des prolongements neuronaux, malgré qu'ils transportent en plus grande quantité les miR-146-5p et miR-155-5p. Il serait intéressant de valider l'absence des miR-221-3p et miR-100-5p dans ces LPS-EVs, même si nos résultats montrent que la composante pro-inflammatoire des EVs n'est pas suffisante pour induire ce phénotype aux neurones. Comme exposé dans les travaux réalisés par Prada et al., en fonction du stimulus, la microglie va charger dans ces EVs différents types de miRNAs (Prada et al. 2018).

Modulation de la neuroinflammation

Il est évident et même rassurant que les MPS III-EVs et 4mo-MPS IIIB-EVs de la même manière que les LPS-EVs soient enrichis en miRNAs pro-inflammatoires, tels que les miR-146-5p et miR-155-5p (Cunha et al. 2016; Prada et al. 2018), résultant de l'activation des récepteurs TLR4 par les HSOs accumulés dans le cerveau ou par les GAGs (enrichis en HSOs) présents dans le milieu de culture de la microglie. Également, nous avons validé par analyse de cytométrie en flux, dans le modèle *in vitro* l'expression de marqueurs membranaires spécifiques d'un phénotype pro-inflammatoire par la BV-2 activée par les GAGs de patient MPS III, ainsi que l'augmentation d'expression de mRNAs codant pour des protéines pro-inflammatoires. Ceci suggère que le message des EVs sera spécifiquement et uniquement pro-inflammatoire, or ils sont aussi enrichi en miR-221-3p et miR-100-5p qui auraient des effets plutôt anti-inflammatoires (Li et al. 2022; Li, Fu, et Xing 2019).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Ce serait certainement ce pool caractéristique formé de ces 4 miRNAs qui ferait la signature du cargo des MPS III-EVs. Mais alors, qu'est ce qui est à l'origine de cette différence entre les LPS-EVs et MPS III-EVs/4mo-MPS IIIB-EVs ? Et bien qu'il ait été démontré que l'activation de la microglie passe par la voie TLR4-Myd88 (Ausseil et al. 2008), qu'elle divergence existe-t-il entre un signal LPS et HSOs induisant cette différence de réponse ?

Il a été largement décrit que le HS code mais aussi les défauts de dégradation des chaînes d'HS ou encore l'activité de l'HSPE vont régir des variations de taille et de sulfatation à l'origine de variabilité dans la réponse (Bishop et al. 2007; Bruyère et al. 2015; Bülow et Hobert 2004; Condomitti et de Wit 2018; Dwyer et al. 2017; Lawrence et al. 2014; Mandolfo et al. 2022; Wilkinson et al. 2012). Ces modifications pourraient expliquer une affinité plus forte avec le TLR4, puis un encombrement allostérique du récepteur lié à l'accumulation des HSOs qui pourrait être induit *in vitro* par le traitement et *in vivo*, par la déficience en Naglu qui va entraîner des défauts de dégradation (De Pasquale et Pavone 2019). De plus, puisque les HSPGs, jouent le rôle de corécepteurs au TLR4 et qu'ils sont aussi capables de médier une réponse inflammatoire, nous pouvons imaginer que dans le cas d'une activation par les HSOs un couplage fort TLR4-HSPGs puisse induire un fort signal pro-inflammatoire (Collins et Troeberg 2019; O'Callaghan et al. 2018). Ou encore, que la surcharge en ligand du TLR4 conduise à une activation secondaire des HSPGs par les HSOs, augmentant la puissance du message cellulaire. Toutes ces questions mécanistiques seraient intéressantes à étudier par des techniques d'affinité entre récepteurs ou protéines membranaires et ligands comme le SPR (pour résonance plasmonique de surface). Mais avant tout, ces hypothèses pourraient expliquer que le récepteur TLR4 se retrouve sous-exprimé dans les MPS III-EVs de microglie, de par son possible encombrement membranaire provoquant la diminution de son recyclage ou par le rétrocontrôle de sa traduction par la cellule. En revanche, l'augmentation du TLR2 dans ces MPS III-EVs pourrait-elle résulter de leur recyclage massif par la cellule pour empêcher leur activation.

Il est important de rappeler qu'au sein du SNC la microglie est loin d'être majoritaire et que même si dans un cerveau MPS IIIB l'inflammation est centrale et touche toutes les cellules, le contenu d'une EV varie tout de même en fonction de la cellule qui la sécrète. Ainsi, la réponse induite chez les neurones par les MPS IIIB-EVs ne traduit qu'une réponse globale et il serait intéressant de trier les EVs de cerveau en fonction de leur cellule sécrétrice. Le tri

PARTIE EXPÉRIMENTALE

magnétique des EVs grâce aux marqueurs de surface spécifiques est envisageable et fonctionne bien, avec des résultats préliminaires encourageants. Mais les EVs restent difficiles à manipuler et le manque de techniques adaptées ont rendu le tri inapproprié dans le cas d'expériences de transmission aux neurones de par la taille de la bille magnétique. Je n'ai donc pas continué ces manipulations, mais nous pourrions envisager d'isoler des EVs de cellules souches pluripotentes (iPSC) MPS IIIB (que nous avons récemment obtenues au laboratoire) dérivées en différents types cellulaires cérébraux.

Il est également connu que l'effet de l'EV dépend finalement de la cellule qui l'internalise, il serait pertinent d'explorer la réponse d'autres cellules du SNC à ces EVs, peut-être par système de coculture d'iPSC, l'utilisation de cellules primaires microgliales étant compliqué. Ou encore par la culture de tranches organotypiques, offrant l'étude d'un environnement cellulaire plus complexe nous permettant d'étudier les phénomènes de gliose mais aussi de visualiser la vascularisation de la tranche et donc la modulation de la perméabilité de la BHE qui est également décrite dans la MPS III (Bigger et al. 2018; Ohmi et al. 2003; Sofroniew 2015; Wilkinson et al. 2012).

Toujours est-il que, les neurones semblent répondre aux MPS IIIB-EVs par un message anti-inflammatoire comme montré par la diminution des processus biologiques (GO-BP) associés à la réponse inflammatoire et plus particulièrement au LPS dans les conditions 1 mois et 4 mois. De manière intéressante, dans ces GO-BP nous avons noté une diminution des expressions de mRNAs des TLR2 et 4 mais aussi du HSPG syndécan-4, qui pourrait résulter d'un rétrocontrôle du neurone à l'induction de l'inflammation de par le contenu pro-inflammatoire transporté par l'EV et qui suggère aussi fortement la présence de HSOs dans les EVs. Dans la condition 8 mois, c'est dans la voie KEGG des HSPGs dans le cancer que nous retrouvons une diminution des expressions des mRNAs de TLR2 et 4 mais surtout des syndécan-1, 2 et 4, soulignant l'importance du lien entre les TLRs et les syndécans et encore une fois la présence des HSOs dans les EVs.

La caractérisation du contenu des EVs en HSOs est donc primordiale et nous avons démarré une collaboration avec une équipe expérimentée dans la quantification des GAGs par spectrométrie de masse (Auray-Blais et al. 2016; Menkovic et al. 2019). Également, il pourrait être envisagé de réaliser une fragmentation de la membrane des EVs pour distinguer les protéines présentes dans le lumen de l'EV de celles présentes dans les compartiments

PARTIE EXPÉRIMENTALE

transmembranaire et coronaire (Tóth et al. 2021). Nous pourrions évidemment élargir cette étude aux HSPGs.

Atteinte de la survie des neurones

Tel qu'avancé précédemment, l'ensemble des neurones traités par les EVs de cerveaux y répondent par une diminution de l'expression des gènes codants pour les syndécans, expliquant certainement une réduction de l'expression de ces récepteurs à la membrane. Effectivement, nous savons que les syndécans sont impliqués dans l'internalisation mais aussi dans la biogenèse des EVs, et que le neurone doit se prémunir de ces événements cellulaires (Cerezo-Magaña et al. 2020; van Niel et al. 2018). Soit pour éviter d'intégrer plus de contenu pathologique dont des HSOs et toutes les réactions qui en découlent, soit d'en propager aux autres cellules. Nous avons vu dans les BV-2 et les neurones que l'internalisation des EVs à lieu par endocytose et ce dès 1h d'interaction (résultats non présentés). Il serait intéressant de bloquer les syndécans chimiquement ou génétiquement afin d'évaluer s'ils sont à l'origine de cette internalisation.

De plus, nous avons pu voir que la diminution de l'expression des mRNAs touche plus de sous-types syndécans dans la condition 8 mois et qui se traduit dans la voie KEGG des HSPGs dans le cancer à une diminution de la survie neuronale (Tóthová et al. 2021). Effectivement, cette réponse semble en adéquation avec les images des neurones traités par les 8mo-MPSIIIB-EVs. Mais finalement quelle est la différence de message entre ces 8mo-MPSIIIB-EVs et tous les autres ? Car l'imagerie des neurones traités par les 1mo- et 4mo-MPSIIIB-EVs ne semble pas provoquer de mortalité, et que nous n'avons pas remarqué de perte de noyaux ou encore d'augmentation du marquage TUNEL dans les neurones traités par les MPS III-EVs. Nous devons valider la présence de mortalité dans notre modèle *ex vivo* de transmission d'EVs de 8 mois et nous pourrions également évaluer l'apoptose, la fragmentation de l'ADN et la toxicité liée à la mitochondrie.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Ces résultats de la condition à 8 mois, suggèrent que l'étude de l'effet des EVs sur les neurones ne sera certainement pas suffisante pour répondre à toutes nos questions. Et que nous devrions envisager de réaliser une analyse protéomique des EVs de cerveaux, séparés par cellules sécrétrices, pour avoir une compréhension plus fine des différences des effets observés dans les neurones et pour le développement de biomarqueurs.

Mais dans un premier temps, afin de compléter cette étude transcriptomique, nous avons à notre disposition des données et analyses bio-informatiques qui ne sont pas encore exploitées. Ces données sont issues d'analyses d'expression différentielle (DEA) comparant des neurones traités par des MPS IIIB-EVs mais isolés de cerveaux à différents âges de la souris. Contrairement aux analyses comparant les génotypes (MPS IIIB vs WT), ces DEA reflètent la réponse spécifique du neurone, en fonction de la différence d'environnement cérébral qui dépend de l'évolution de la pathologie entre deux stades et non de l'état physiopathologique à un instant précis. Ces analyses pourraient ainsi faire ressortir des marqueurs qui varient donc avec la progression de la maladie.

Développement de biomarqueurs

L'ensemble de ces résultats soulignent la pertinence de rechercher la présence de biomarqueurs dans les EVs issus de fluides biologiques tels que le LCR, le plasma, ou les urines provenant de modèles précliniques MPS IIIB. Grâce à l'étude préclinique de thérapie génique en cours au sein de notre laboratoire, nous aurons à notre disposition des échantillons prélevés chez le chien et la souris MPS IIIB traités ou non par thérapie génique. Ainsi, nous réalisons une étude comparative entre les EVs issus du LCR directement représentatifs du SNC avec les EVs périphériques issus du plasma ou des urines. Cela nous permettrait de caractériser et de définir à partir des EVs circulants, les EVs provenant des neurones directement ou encore des cellules gliales, nécessitant des marqueurs de surface spécifiques et fortement représentés à la surface des EVs (de Menezes et al. 2022).

Des biomarqueurs de suivi robustes, reflétant l'état des neurones au moment donné nous permettraient de réaliser un suivi longitudinal de l'efficacité thérapeutique dans le cadre d'essais cliniques dans la MPS III chez l'enfant. Ce besoin de biomarqueurs sériques est important car jusqu'à présent les seuls biomarqueurs disponibles chez l'enfant sont isolés à

PARTIE EXPÉRIMENTALE

partir des tissus cérébraux ou dans du LCR, nécessitant des gestes très invasifs. De plus, le dosage des GAGs accumulés dans les urines n'est pas directement corrélé à une diminution de la surcharge lysosomale dans le SNC. Ce manque d'outils biologiques rend très difficile le suivi thérapeutique.

Les 4 miRNAs enrichis dans les EVs dans leur ensemble, sont de bons candidats pour leur identification par PCR digitale en gouttelettes (ddPCR), qui permet une plus grande sensibilité que la PCR classique. Concernant les protéines, leur détection est plus complexe puisqu'elles ne sont pas amplifiables, même si nous avons trouvé des niveaux d'expression importants pour Saa3 et Umod dans nos MPS III-EVs de microglie.

Peut-être que nous pourrions nous intéresser à d'autres types de biomarqueurs, comme les lipides puisque que les GM2 (et éventuellement les GM3) peuvent se retrouver dans la membrane de l'EV et qu'ils sont en quantité importante dans les cellules cérébrales MPS III (Ausseil et al. 2008; Pan et al. 2022; Roy et al. 2012). Ou par l'utilisation de la technologie MSD (pour Meso Scale Discovery) nous pourrions nous intéresser à la détection du contenu en cytokines et chimiokines généralement transportés au niveau coronaire de l'EV. Et finalement, l'ADN mitochondrial peut se trouver enrichi dans les EVs sécrétées par des cellules présentant du stress mitochondrial (important dans la MPS III) et bien évidemment les HSOs pourraient directement refléter l'accumulation cellulaire (lumen et membranaire) mais aussi extracellulaire (coronaire).

Mon travail de thèse a permis de décrire dans nos modèles, que les EVs reflètent un état physiopathologique spécifique de la cellule. Dans le cadre d'essais cliniques dans la MPS III et d'autres MSLs, leur utilisation en tant que biomarqueurs dans le suivi longitudinal de l'efficacité thérapeutique est plus que prometteuse.

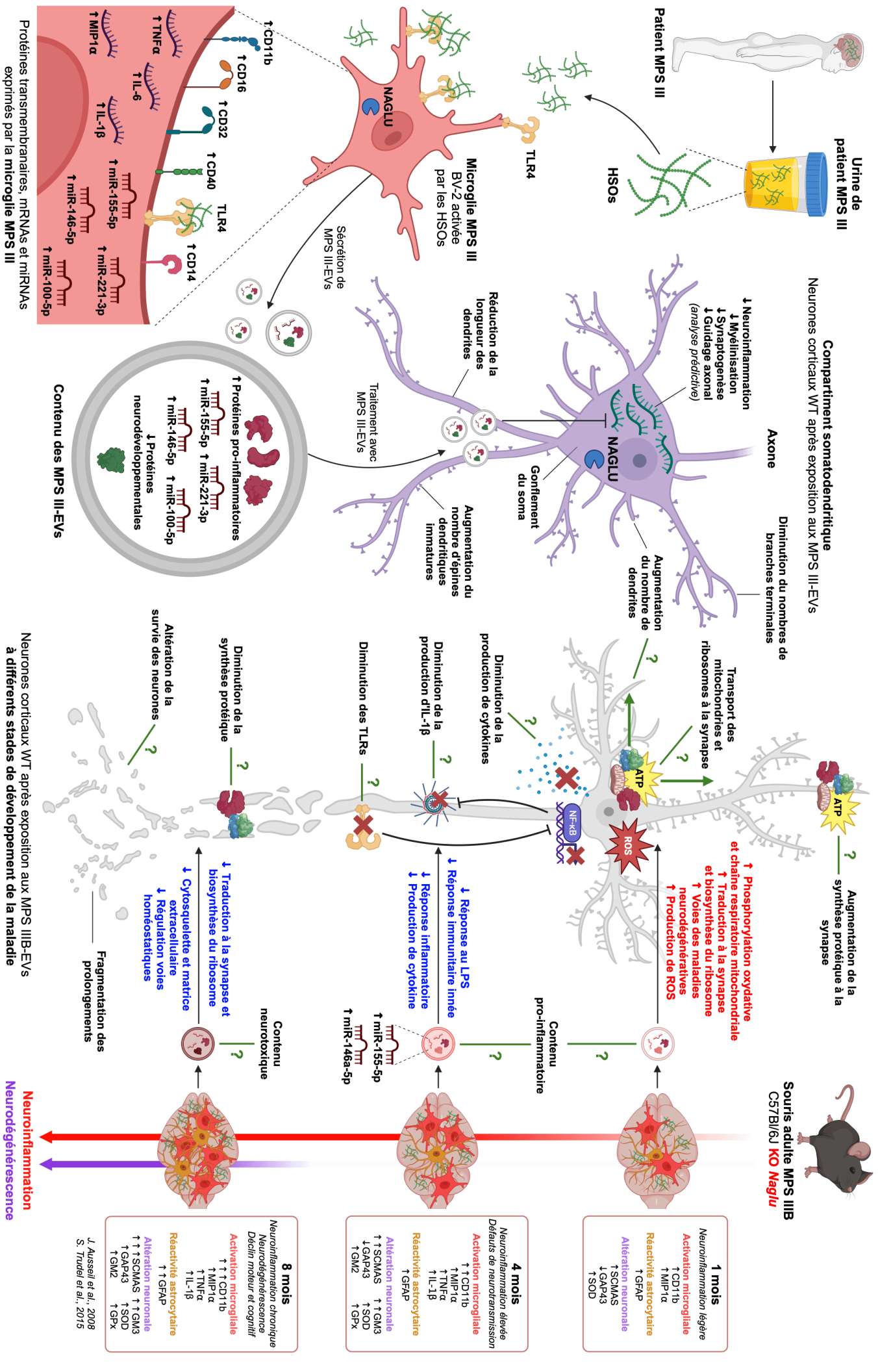


Schéma récapitulatif de l'ensemble des résultats obtenus et interprétés lors de ma thèse, dans les deux modèles *in vitro* et *ex vivo*. Légendes indiquées par un trait noir représentent des observations réalisées par microscopie puis quantifiées. Légendes indiquées par un trait vert représentent des hypothèses posées suite à l'analyse d'enrichissement fonctionnel des ARNs différentiellement exprimés dans les neurones (voies biologiques en rouge et en bleu).

J. Aussel et al., 2008
S. Trudel et al., 2015

PARTIE EXPÉRIMENTALE

RÉFÉRENCES

RÉFÉRENCES

RÉFÉRENCES

Abels, Erik R., et Xandra O. Breakefield. 2016. « Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake ». *Cellular and Molecular Neurobiology* 36(3):301-12. doi: 10.1007/s10571-016-0366-z.

Aboudounya, Mohamed M., et Richard J. Heads. 2021. « COVID-19 and Toll-Like Receptor 4 (TLR4): SARS-CoV-2 May Bind and Activate TLR4 to Increase ACE2 Expression, Facilitating Entry and Causing Hyperinflammation ». *Mediators of Inflammation* 2021:8874339. doi: 10.1155/2021/8874339.

Afratis, Nikos, Chrisostomi Gialeli, Dragana Nikitovic, Theodore Tsegenidis, Evgenia Karousou, Achilleas D. Theocharis, Mauro S. Pavão, George N. Tzanakakis, et Nikos K. Karamanos. 2012. « Glycosaminoglycans: Key Players in Cancer Cell Biology and Treatment ». *The FEBS Journal* 279(7):1177-97. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08529.x.

Al-Nedawi, Khalid, Brian Meehan, Johann Micallef, Vladimir Lhotak, Linda May, Abhijit Guha, et Janusz Rak. 2008. « Intercellular Transfer of the Oncogenic Receptor EGFRvIII by Microvesicles Derived from Tumour Cells ». *Nature Cell Biology* 10(5):619-24. doi: 10.1038/ncb1725.

Amodeo, Giuseppe Federico, Brenda Yasia Lee, Natalya Krilyuk, Carina Teresa Filice, Denis Valyuk, Daniel Erik Otzen, Sergey Noskov, Zoya Leonenko, et Evgeny V. Pavlov. 2021. « C Subunit of the ATP Synthase Is an Amyloidogenic Calcium Dependent Channel-Forming Peptide with Possible Implications in Mitochondrial Permeability Transition ». *Scientific Reports* 11(1):8744. doi: 10.1038/s41598-021-88157-z.

Andrade, Fernando, Luis Aldámiz-Echevarría, Marta Llarena, et María Luz Couce. 2015. « Sanfilippo Syndrome: Overall Review ». *Pediatrics International* 57(3):331-38. doi: 10.1111/ped.12636.

Arfi, Audrey, Magali Richard, Christelle Gandolphe, Dominique Bonnefont-Rousselot, Patrice Théron, et Daniel Scherman. 2011. « Neuroinflammatory and Oxidative Stress Phenomena in MPS IIIA Mouse Model: The Positive Effect of Long-Term Aspirin Treatment ». *Molecular Genetics and Metabolism* 103(1):18-25. doi: 10.1016/j.ymgme.2011.01.015.

Asai, Hirohide, Seiko Ikezu, Satoshi Tsunoda, Maria Medalla, Jennifer Luebke, Tarik Haydar, Benjamin Wolozin, Oleg Butovsky, Sebastian Kügler, et Tsuneya Ikezu. 2015. « Depletion of Microglia and Inhibition of Exosome Synthesis Halt Tau Propagation ». *Nature Neuroscience* 18(11):1584-93. doi: 10.1038/nn.4132.

Atkin-Smith, Georgia K., Rochelle Tixeira, Stephanie Paone, Suresh Mathivanan, Christine Collins, Michael Liem, Katharine J. Goodall, Kodi S. Ravichandran, Mark D. Hulett, et Ivan K. H. Poon. 2015. « A Novel Mechanism of Generating Extracellular Vesicles during Apoptosis via a Beads-on-a-String Membrane Structure ». *Nature Communications* 6(1):7439. doi: 10.1038/ncomms8439.

Auray-Blais, Christiane, Pamela Lavoie, Shunji Tomatsu, Vassili Valayannopoulos, John J. Mitchell, Julian Raiman, Maxime Beaudoin, Bruno Maranda, et Joe T. R. Clarke. 2016. « UPLC-MS/MS Detection of Disaccharides Derived from Glycosaminoglycans as Biomarkers of Mucopolysaccharidoses ». *Analytica Chimica Acta* 936:139-48. doi: 10.1016/j.aca.2016.06.054.

Ausseil, Jérôme, Nathalie Desmaris, Stéphanie Bigou, Ruben Attali, Sébastien Corbiveau,

RÉFÉRENCES

- Sandrine Vitry, Mathieu Parent, David Cheillan, Maria Fuller, Irène Maire, Marie-Thérèse Vanier, et Jean-Michel Heard. 2008. « Early Neurodegeneration Progresses Independently of Microglial Activation by Heparan Sulfate in the Brain of Mucopolysaccharidosis IIIB Mice » édité par J. El Khoury. *PLoS ONE* 3(5):e2296. doi: 10.1371/journal.pone.0002296.
- Baietti, Maria Francesca, Zhe Zhang, Eva Mortier, Aurélie Melchior, Gisèle Degeest, Annelies Geeraerts, Ylva Ivarsson, Fabienne Depoortere, Christien Coomans, Elke Vermeiren, Pascale Zimmermann, et Guido David. 2012. « Syndecan–Syntenin–ALIX Regulates the Biogenesis of Exosomes ». *Nature Cell Biology* 14(7):677-85. doi: 10.1038/ncb2502.
- Ballabio, Andrea. 2016. « The Awesome Lysosome ». *EMBO Molecular Medicine* 8(2):73-76. doi: 10.15252/emmm.201505966.
- Ballabio, Andrea, et Juan S. Bonifacino. 2020. « Lysosomes as Dynamic Regulators of Cell and Organismal Homeostasis ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21(2):101-18. doi: 10.1038/s41580-019-0185-4.
- Bandtlow, Christine E., et Dieter R. Zimmermann. 2000. « Proteoglycans in the Developing Brain: New Conceptual Insights for Old Proteins ». *Physiological Reviews* 80(4):1267-90. doi: 10.1152/physrev.2000.80.4.1267.
- Banushi, Blerida, et Fiona Simpson. 2022. « Overlapping Machinery in Lysosome-Related Organelle Trafficking: A Lesson from Rare Multisystem Disorders ». *Cells* 11(22):3702. doi: 10.3390/cells11223702.
- Beard, Helen, Sofia Hassiotis, Wei-Ping Gai, Emma Parkinson-Lawrence, John J. Hopwood, et Kim M. Hemsley. 2017. « Axonal Dystrophy in the Brain of Mice with Sanfilippo Syndrome ». *Experimental Neurology* 295:243-55. doi: 10.1016/j.expneurol.2017.06.010.
- Bécot, Anaïs, Charlotte Volgers, et Guillaume van Niel. 2020. « Transmissible Endosomal Intoxication: A Balance between Exosomes and Lysosomes at the Basis of Intercellular Amyloid Propagation ». *Biomedicines* 8(8):272. doi: 10.3390/biomedicines8080272.
- Benetó, Noelia, Lluïsa Vilageliu, Daniel Grinberg, et Isaac Canals. 2020. « Sanfilippo Syndrome: Molecular Basis, Disease Models and Therapeutic Approaches ». *International Journal of Molecular Sciences* 21(21):7819. doi: 10.3390/ijms21217819.
- Betriu, Nausika, Juan Bertran-Mas, Anna Andreeva, et Carlos E. Semino. 2021. « Syndecans and Pancreatic Ductal Adenocarcinoma ». *Biomolecules* 11(3):349. doi: 10.3390/biom11030349.
- Bigger, Brian W., David J. Begley, Daniela Virgintino, et Alexey V. Pshzhetsky. 2018. « Anatomical changes and pathophysiology of the brain in mucopolysaccharidosis disorders ». *Molecular Genetics and Metabolism* 125(4):322-31. doi: 10.1016/j.ymgme.2018.08.003.
- Bishop, Joseph R., Manuela Schuksz, et Jeffrey D. Esko. 2007. « Heparan Sulphate Proteoglycans Fine-Tune Mammalian Physiology ». *Nature* 446(7139):1030-37. doi: 10.1038/nature05817.
- Bonora, Massimo, Angela Bononi, Elena De Marchi, Carlotta Giorgi, Magdalena Lebiezinska, Saverio Marchi, Simone Patergnani, Alessandro Rimessi, Jan M. Suski, Aleksandra Wojtala, Mariusz R. Wieckowski, Guido Kroemer, Lorenzo Galluzzi, et Paolo Pinton. 2013. « Role of

RÉFÉRENCES

the c subunit of the FO ATP synthase in mitochondrial permeability transition ». *Cell Cycle* 12(4):674-83. doi: 10.4161/cc.23599.

Braulke, Thomas, et Juan S. Bonifacino. 2009. « Sorting of lysosomal proteins ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1793(4):605-14. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.10.016.

Bright, Nicholas A., Luther J. Davis, et J. Paul Luzio. 2016. « Endolysosomes Are the Principal Intracellular Sites of Acid Hydrolase Activity ». *Current Biology* 26(17):2233-45. doi: 10.1016/j.cub.2016.06.046.

Bruyère, Julie, Elise Roy, Jérôme Ausseil, Thomas Lemonnier, Guillaume Teyre, Delphine Bohl, Sandrine Etienne-Manneville, Hugues Lortat-Jacob, Jean Michel Heard, et Sandrine Vitry. 2015. « Heparan Sulfate Saccharides Modify Focal Adhesions: Implication in Mucopolysaccharidosis Neuropathophysiology ». *Journal of Molecular Biology* 427(4):775-91. doi: 10.1016/j.jmb.2014.09.012.

Budnik, Vivian, Catalina Ruiz-Cañada, et Franz Wendler. 2016. « Extracellular Vesicles Round off Communication in the Nervous System ». *Nature Reviews Neuroscience* 17(3):160-72. doi: 10.1038/nrn.2015.29.

Bülöw, Hannes E., et Oliver Hobert. 2004. « Differential Sulfations and Epimerization Define Heparan Sulfate Specificity in Nervous System Development ». *Neuron* 41(5):723-36. doi: 10.1016/S0896-6273(04)00084-4.

Buzás, Edit I., Eszter Á. Tóth, Barbara W. Sódar, et Katalin É. Szabó-Taylor. 2018. « Molecular Interactions at the Surface of Extracellular Vesicles ». *Seminars in Immunopathology* 40(5):453-64. doi: 10.1007/s00281-018-0682-0.

Cao, Jiqing, Margaret B. Zhong, Carlos A. Toro, Larry Zhang, et Dongming Cai. 2019. « Endo-Lysosomal Pathway and Ubiquitin-Proteasome System Dysfunction in Alzheimer's Disease Pathogenesis ». *Neuroscience Letters* 703:68-78. doi: 10.1016/j.neulet.2019.03.016.

de Castro, María José, Mireia del Toro, Roberto Giugliani, et María Luz Couce. 2021. « Gene Therapy for Neuronopathic Mucopolysaccharidoses: State of the Art ». *International Journal of Molecular Sciences* 22(17):9200. doi: 10.3390/ijms22179200.

Celik, Betül, Saori C. Tomatsu, Shunji Tomatsu, et Shaukat A. Khan. 2021. « Epidemiology of Mucopolysaccharidoses Update ». *Diagnostics* 11(2):273. doi: 10.3390/diagnostics11020273.

Cerezo-Magaña, M., A. Bång-Rudenstam, et M. Belting. 2020. « The pleiotropic role of proteoglycans in extracellular vesicle mediated communication in the tumor microenvironment ». *Seminars in Cancer Biology* 62:99-107. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.07.001.

Cesar-Silva, Daniella, Filipe S. Pereira-Dutra, Ana Lucia Moraes Moraes Giannini, et Cecília Jacques G. Jacques G. De Almeida. 2022. « The Endolysosomal System: The Acid Test for SARS-CoV-2 ». *International Journal of Molecular Sciences* 23(9):4576. doi: 10.3390/ijms23094576.

Chen, Yi-He, Rong-Rong Lin, et Qing-Qing Tao. 2021. « The role of P2X7R in neuroinflammation and implications in Alzheimer's disease ». *Life Sciences* 271:119187. doi:

RÉFÉRENCES

10.1016/j.lfs.2021.119187.

Chhabra, Ekta Seth, et Henry N. Higgs. 2007. « The Many Faces of Actin: Matching Assembly Factors with Cellular Structures ». *Nature Cell Biology* 9(10):1110-21. doi: 10.1038/ncb1007-1110.

Ciardello, Chiara, Rossella Migliorino, Alessandra Leone, et Alfredo Budillon. 2020. « Large extracellular vesicles: Size matters in tumor progression ». *Cytokine & Growth Factor Reviews* 51:69-74. doi: 10.1016/j.cytogfr.2019.12.007.

Clarke, Lorne A., Patricia Dickson, N. Matthew Ellinwood, et Terri L. Klein. 2020. « Newborn Screening for Mucopolysaccharidosis I: Moving Forward Learning from Experience ». *International Journal of Neonatal Screening* 6(4):91. doi: 10.3390/ijns6040091.

Colin-Pierre, Charlie, Oussama Baraka, Louis Danoux, Vincent Bardey, Andre Valerie, Laurent Ramont, et Stéphane Brézillon. 2022. « Regulation of stem cell fate by HSPGs: implication in hair follicle cycling ». *npj Regenerative Medicine* 7. doi: 10.1038/s41536-022-00267-y.

Collins, Laura E., et Linda Troeberg. 2019. « Heparan Sulfate as a Regulator of Inflammation and Immunity ». *Journal of Leukocyte Biology* 105(1):81-92. doi: 10.1002/JLB.3RU0618-246R.

Colombo, Marina, Graça Raposo, et Clotilde Théry. 2014. « Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 30(1):255-89. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.

Condomitti, Giuseppe, et Joris de Wit. 2018. « Heparan Sulfate Proteoglycans as Emerging Players in Synaptic Specificity ». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 11.

Couch, Yvonne, Edit I. Buzàs, Dolores Di Vizio, Yong Song Gho, Paul Harrison, Andrew F. Hill, Jan Lötvall, Graça Raposo, Philip D. Stahl, Clotilde Théry, Kenneth W. Witwer, et David R. F. Carter. 2021. « A brief history of nearly EV-erything – The rise and rise of extracellular vesicles ». *Journal of Extracellular Vesicles* 10(14):e12144. doi: 10.1002/jev2.12144.

Cserép, Csaba, Balázs Pósfai, et Ádám Dénes. 2021. « Shaping Neuronal Fate: Functional Heterogeneity of Direct Microglia-Neuron Interactions ». *Neuron* 109(2):222-40. doi: 10.1016/j.neuron.2020.11.007.

Cullen, Peter J., et Florian Steinberg. 2018. « To Degrade or Not to Degrade: Mechanisms and Significance of Endocytic Recycling ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19(11):679-96. doi: 10.1038/s41580-018-0053-7.

Cunha, Carolina, Cátia Gomes, Ana Rita Vaz, et Dora Brites. 2016. « Exploring New Inflammatory Biomarkers and Pathways during LPS-Induced M1 Polarization ». *Mediators of Inflammation* 2016:6986175. doi: 10.1155/2016/6986175.

D'Acunzo, Pasquale, Yohan Kim, Jonathan M. Ungania, Rocío Pérez-González, Chris N. Goulbourne, et Efrat Levy. 2022. « Isolation of Mitochondria-Derived Mitovesicles and Subpopulations of Microvesicles and Exosomes from Brain Tissues ». *Nature Protocols* 17(11):2517-49. doi: 10.1038/s41596-022-00719-1.

RÉFÉRENCES

- D'Arrigo, Giulia, Martina Gabrielli, Federica Scaroni, Paolo Swuec, Ladan Amin, Anna Pegoraro, Elena Adinolfi, Francesco Di Virgilio, Dan Cojoc, Giuseppe Legname, et Claudia Verderio. 2021. « Astrocytes-derived Extracellular Vesicles in Motion at the Neuron Surface: Involvement of the Prion Protein ». *Journal of Extracellular Vesicles* 10(9). doi: 10.1002/jev2.12114.
- De Duve, Christian. 1983. « Lysosomes Revisited ». *European Journal of Biochemistry* 137(3):391-97. doi: 10.1111/j.1432-1033.1983.tb07841.x.
- De Duve, Christian. 2005. « The Lysosome Turns Fifty ». *Nature Cell Biology* 7(9):847-49. doi: 10.1038/ncb0905-847.
- De Pasquale, Valeria, et Luigi Michele Pavone. 2019. « Heparan Sulfate Proteoglycans: The Sweet Side of Development Turns Sour in Mucopolysaccharidoses ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1865(11):165539. doi: 10.1016/j.bbadis.2019.165539.
- Deczkowska, Aleksandra, Hadas Keren-Shaul, Assaf Weiner, Marco Colonna, Michal Schwartz, et Ido Amit. 2018. « Disease-Associated Microglia: A Universal Immune Sensor of Neurodegeneration ». *Cell* 173(5):1073-81. doi: 10.1016/j.cell.2018.05.003.
- Deiva, Kumaran, Jérôme Ausseil, Stéphanie de Bournonville, Michel Zerah, Béatrice Husson, Marie-Lise Gougeon, Béatrice Poirier-Beaudouin, Dimitrios Zafeiriou, Giancarlo Parenti, Jean-Michel Heard, et Marc Tardieu. 2021. « Intracerebral Gene Therapy in Four Children with Sanfilippo B Syndrome: 5.5-Year Follow-Up Results ». *Human Gene Therapy* 32(19-20):1251-59. doi: 10.1089/hum.2021.135.
- Dekaban, Anatole S., et George Constantopoulos. 1977. « Mucopolysaccharidosis Types I, II, IIIA and V: Pathological and Biochemical Abnormalities in the Neural and Mesenchymal Elements of the Brain ». *Acta Neuropathologica* 39(1):1-7. doi: 10.1007/BF00690379.
- Delevoeye, Cédric, Michael S. Marks, et Graça Raposo. 2019. « Lysosome-Related Organelles as Functional Adaptations of the Endolysosomal System ». *Current Opinion in Cell Biology* 59:147-58. doi: 10.1016/j.ceb.2019.05.003.
- Delpech, Jean-Christophe, Shawn Herron, Mina B. Botros, et Tsuneya Ikezu. 2019. « Neuroimmune Crosstalk through Extracellular Vesicles in Health and Disease ». *Trends in Neurosciences* 42(5):361-72. doi: 10.1016/j.tins.2019.02.007.
- Dikic, Ivan, et Zvulun Elazar. 2018. « Mechanism and Medical Implications of Mammalian Autophagy ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19(6):349-64. doi: 10.1038/s41580-018-0003-4.
- Dixon, Andrew C., T. Renee Dawson, Dolores Di Vizio, et Alissa M. Weaver. 2023. « Context-Specific Regulation of Extracellular Vesicle Biogenesis and Cargo Selection ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 24(7):454-76. doi: 10.1038/s41580-023-00576-0.
- Dogterom, Emma J., Margreet A. E. M. Wagenmakers, Martina Wilke, Serwet Demirdas, Nicole M. Muschol, Sandra Pohl, Jan C. van der Meijden, Dimitris Rizopoulos, Ans T. van der Ploeg, et Esmée Oussoren. 2021. « Mucopolysaccharidosis Type II and Type III: A Systematic Review of 843 Published Cases ». *Genetics in Medicine* 23(11):2047-56. doi: 10.1038/s41436-021-01244-4.

RÉFÉRENCES

Driedonks, Tom A. P., et Esther N. M. Nolte-'t Hoen. 2019. « Circulating Y-RNAs in Extracellular Vesicles and Ribonucleoprotein Complexes; Implications for the Immune System ». *Frontiers in Immunology* 9:3164. doi: 10.3389/fimmu.2018.03164.

Dudas, B., et K. Semeniken. 2012. « Glycosaminoglycans and Neuroprotection ». P. 325-43 in *Heparin - A Century of Progress*. Vol. 207, *Handbook of Experimental Pharmacology*, édité par R. Lever, B. Mulloy, et C. P. Page. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

de Duve, C., B. C. Pressman, R. Gianetto, R. Wattiaux, et F. Appelmans. 1955. « Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue ». *Biochemical Journal* 60(4):604-17.

Dwyer, Chrissa A., Samantha L. Scudder, Ying Lin, Lara E. Dozier, Dustin Phan, Nicola J. Allen, Gentry N. Patrick, et Jeffrey D. Esko. 2017. « Neurodevelopmental Changes in Excitatory Synaptic Structure and Function in the Cerebral Cortex of Sanfilippo Syndrome IIIA Mice ». *Scientific Reports* 7:46576. doi: 10.1038/srep46576.

Ebrahimi, Tahereh, Mozghan Abasi, Fatemeh Seifar, Shirin Eyvazi, Mohammad Saeid Hejazi, Vahideh Tarhriz, et Soheila Montazersaheb. 2021. « Transplantation of Stem Cells as a Potential Therapeutic Strategy in Neurodegenerative Disorders ». *Current Stem Cell Research & Therapy* 16(2):133-44. doi: 10.2174/1574888X15666200628141314.

Egea-Jimenez, Antonio Luis, et Pascale Zimmermann. 2018. « Phospholipase D and phosphatidic acid in the biogenesis and cargo loading of extracellular vesicles: Thematic Review Series: Exosomes and Microvesicles: Lipids as Key Components of their Biogenesis and Functions ». *Journal of Lipid Research* 59(9):1554-60. doi: 10.1194/jlr.R083964.

Egeland, Martin T., Marta M. Tarczyluk-Wells, Melissa M. Asmar, Evan G. Adintori, Roger Lawrence, Elizabeth M. Snella, Jackie K. Jens, Brett E. Crawford, Jill C. M. Wait, Emma McCullagh, Jason Pinkstaff, Jonathan D. Cooper, et N. Matthew Ellinwood. 2020. « Central nervous system pathology in preclinical MPS IIIB dogs reveals progressive changes in clinically relevant brain regions ». *Scientific Reports* 10:20365. doi: 10.1038/s41598-020-77032-y.

Elleder, M., J. Sokolová, et M. Hřebíček. 1997. « Follow-up Study of Subunit c of Mitochondrial ATP Synthase (SCMAS) in Batten Disease and in Unrelated Lysosomal Disorders ». *Acta Neuropathologica* 93(4):379-90. doi: 10.1007/s004010050629.

Ellinwood, N. M., P. Wang, T. Skeen, N. J. H. Sharp, M. Cesta, S. Decker, N. J. Edwards, I. Bublot, J. N. Thompson, W. Bush, E. Hardam, M. E. Haskins, et U. Giger. 2003. « A Model of Mucopolysaccharidosis IIIB (Sanfilippo Syndrome Type IIIB): N-Acetyl-Alpha-D-Glucosaminidase Deficiency in Schipperke Dogs ». *Journal of Inherited Metabolic Disease* 26(5):489-504. doi: 10.1023/a:1025177411938.

Eskelinen, Eeva-Liisa, et Paul Saftig. 2009. « Autophagy: A Lysosomal Degradation Pathway with a Central Role in Health and Disease ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1793(4):664-73. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.07.014.

Favret, Jacob M., Nadav I. Weinstock, M. Laura Feltri, et Daesung Shin. 2020. « Pre-clinical Mouse Models of Neurodegenerative Lysosomal Storage Diseases ». *Frontiers in Molecular Biosciences* 7.

RÉFÉRENCES

- Fedele, Anthony. 2015. « Sanfilippo Syndrome: Causes, Consequences, and Treatments ». *The Application of Clinical Genetics* 269. doi: 10.2147/TACG.S57672.
- Filocamo, Mirella, et Amelia Morrone. 2011. « Lysosomal Storage Disorders: Molecular Basis and Laboratory Testing ». *Human Genomics* 5(3):156. doi: 10.1186/1479-7364-5-3-156.
- Frühbeis, Carsten, Dominik Fröhlich, Wen Ping Kuo, et Eva-Maria Krämer-Albers. 2013. « Extracellular Vesicles as Mediators of Neuron-Glia Communication ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7. doi: 10.3389/fncel.2013.00182.
- Frühbeis, Carsten, Wen Ping Kuo-Elsner, Christina Müller, Kerstin Barth, Leticia Peris, Stefan Tenzer, Wiebke Möbius, Hauke B. Werner, Klaus-Armin Nave, Dominik Fröhlich, et Eva-Maria Krämer-Albers. 2020. « Oligodendrocytes support axonal transport and maintenance via exosome secretion ». *PLoS Biology* 18(12):e3000621. doi: 10.1371/journal.pbio.3000621.
- Gabrielli, Martina, Stefano Raffaele, Marta Fumagalli, et Claudia Verderio. 2022. « The multiple faces of extracellular vesicles released by microglia: Where are we 10 years after? » *Frontiers in Cellular Neuroscience* 16.
- Gabrielli, Martina, Francesca Tozzi, Claudia Verderio, et Nicola Origlia. 2022. « Emerging Roles of Extracellular Vesicles in Alzheimer's Disease: Focus on Synaptic Dysfunction and Vesicle–Neuron Interaction ». *Cells* 12(1):63. doi: 10.3390/cells12010063.
- Gandhi, Neha S., et Ricardo L. Mancera. 2008. « The Structure of Glycosaminoglycans and Their Interactions with Proteins ». *Chemical Biology & Drug Design* 72(6):455-82. doi: 10.1111/j.1747-0285.2008.00741.x.
- Gao, Chao, Jingwen Jiang, Yuyan Tan, et Shengdi Chen. 2023. « Microglia in neurodegenerative diseases: mechanism and potential therapeutic targets ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 8:359. doi: 10.1038/s41392-023-01588-0.
- Gelb, Michael H., Zoltan Lukacs, Enzo Ranieri, et Peter C. J. I. Schielen. 2018. « Newborn Screening for Lysosomal Storage Disorders: Methodologies for Measurement of Enzymatic Activities in Dried Blood Spots ». *International Journal of Neonatal Screening* 5(1):1. doi: 10.3390/ijns5010001.
- Gerken, Ewan, Syahida Ahmad, Lakshay Rattan, Kim Hemsley, Karissa Barthelson, et Michael Lardelli. 2023. « Zebrafish Models of Mucopolysaccharidosis Types IIIA, B, & C Show Hyperactivity and Changes in Oligodendrocyte State ». 2023.08.02.550904.
- Gerlach, Jared Q., et Matthew D. Griffin. 2016. « Getting to Know the Extracellular Vesicle Glycome ». *Molecular BioSystems* 12(4):1071-81. doi: 10.1039/C5MB00835B.
- Ginsberg, Stephen D., James E. Galvin, Virginia M. Y. Lee, Lucy B. Rorke, Dennis W. Dickson, John H. Wolfe, Margaret Z. Jones, et John Q. Trojanowski. 1999. « Accumulation of Intracellular Amyloid- β Peptide (A β 1–40) in Mucopolysaccharidosis Brains ». *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 58(8):815-24. doi: 10.1097/00005072-199908000-00004.
- Giusti, Veronica, Gurkirat Kaur, Elena Giusto, et Laura Civiero. 2024. « Brain clearance of protein aggregates: a close-up on astrocytes ». *Molecular Neurodegeneration* 19(1):5. doi: 10.1186/s13024-024-00703-1.

RÉFÉRENCES

- Gómez-Grau, Marta, Elena Garrido, Mónica Cozar, Víctor Rodríguez-Sureda, Carmen Domínguez, Concepción Arenas, Richard A. Gatti, Bru Cormand, Daniel Grinberg, et Lluïsa Vilageliu. 2015. « Evaluation of Aminoglycoside and Non-Aminoglycoside Compounds for Stop-Codon Readthrough Therapy in Four Lysosomal Storage Diseases ». *PLoS ONE* 10(8):e0135873. doi: 10.1371/journal.pone.0135873.
- Goodall, Katharine J., Ivan K. H. Poon, Simon Phipps, et Mark D. Hulett. 2014. « Soluble Heparan Sulfate Fragments Generated by Heparanase Trigger the Release of Pro-Inflammatory Cytokines through TLR-4 ». *PLOS ONE* 9(10):e109596. doi: 10.1371/journal.pone.0109596.
- Griffiths, Gareth, Bernard Hoflack, Kai Simons, Ira Mellman, et Stuart Kornfeld. 1988. « The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes ». *Cell* 52(3):329-41. doi: 10.1016/S0092-8674(88)80026-6.
- Gu, Ling, Bryan Black, Simon Ordonez, Argha Mondal, Ankur Jain, et Samarendra Mohanty. 2014. « Microfluidic Control of Axonal Guidance ». *Scientific Reports* 4(1):6457. doi: 10.1038/srep06457.
- Guo, Min, Jian Wang, Yanxin Zhao, Yiwei Feng, Sida Han, Qiang Dong, Mei Cui, et Kim Tieu. 2020. « Microglial Exosomes Facilitate α -Synuclein Transmission in Parkinson's Disease ». *Brain* 143(5):1476-97. doi: 10.1093/brain/awaa090.
- Hafner, Anne-Sophie, Paul G. Donlin-Asp, Beulah Leitch, Etienne Herzog, et Erin M. Schuman. 2019. « Local protein synthesis is a ubiquitous feature of neuronal pre- and postsynaptic compartments ». *Science* 364(6441):eaau3644. doi: 10.1126/science.aau3644.
- Hamano, Kimiko, Masaharu Hayashi, Kei Shioda, Ryo Fukatsu, et Shuki Mizutani. 2008. « Mechanisms of Neurodegeneration in Mucopolysaccharidoses II and IIIB: Analysis of Human Brain Tissue ». *Acta Neuropathologica* 115(5):547-59. doi: 10.1007/s00401-007-0325-3.
- Harding, Clifford V., John E. Heuser, et Philip D. Stahl. 1983. « Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes ». *The Journal of Cell Biology* 97(2):329-39.
- Harm, Tyler A., Shannon J. Hostetter, Ariel S. Nenninger, Bethann N. Valentine, N. Matthew Ellinwood, et Jodi D. Smith. 2021. « Temporospatial Development of Neuropathologic Findings in a Canine Model of Mucopolysaccharidosis IIIB ». *Veterinary pathology* 58(1):205-22. doi: 10.1177/0300985820960128.
- Hashimoto, Makoto, Edward Rockenstein, Michael Mante, Margaret Mallory, et Eliezer Masliah. 2001. « Beta-Synuclein Inhibits Alpha-Synuclein Aggregation: A Possible Role as an Anti-Parkinsonian Factor ». 32:213-23.
- Hassiotis, Sofia, Helen Beard, Amanda Luck, Paul J. Trim, Barbara King, Marten F. Snel, John J. Hopwood, et Kim M. Hemsley. 2014. « Disease Stage Determines the Efficacy of Treatment of a Paediatric Neurodegenerative Disease ». *European Journal of Neuroscience* 39(12):2139-50. doi: 10.1111/ejn.12557.
- He, Lin, et Gregory J. Hannon. 2004. « MicroRNAs: Small RNAs with a Big Role in Gene Regulation ». *Nature Reviews Genetics* 5(7):522-31. doi: 10.1038/nrg1379.

RÉFÉRENCES

- Heidarzadeh, Morteza, Amir Zarebkohan, Reza Rahbarghazi, et Emel Sokullu. 2023. « Protein corona and exosomes: new challenges and prospects ». *Cell Communication and Signaling* 21(1):64. doi: 10.1186/s12964-023-01089-1.
- Hemonnot, Anne-Laure, Jennifer Hua, Lauriane Ulmann, et Hélène Hirbec. 2019. « Microglia in Alzheimer Disease: Well-Known Targets and New Opportunities ». *Frontiers in Aging Neuroscience* 11. doi: 10.3389/fnagi.2019.00233.
- Heon-Roberts, Rachel, Annie L. A. Nguyen, et Alexey V. Pshezhetsky. 2020. « Molecular Bases of Neurodegeneration and Cognitive Decline, the Major Burden of Sanfilippo Disease ». *Journal of Clinical Medicine* 9(2):344. doi: 10.3390/jcm9020344.
- Héron, Bénédicte, Yann Mikaeloff, Roseline Froissart, Guillaume Caridade, Irène Maire, Catherine Caillaud, Thierry Levade, Brigitte Chabrol, François Feillet, Hélène Ogier, Vassili Valayannopoulos, Helen Michelakakis, Dimitrios Zafeiriou, Lucy Lavery, Ed Wraith, Olivier Danos, Jean-Michel Heard, et Marc Tardieu. 2011. « Incidence and Natural History of Mucopolysaccharidosis Type III in France and Comparison with United Kingdom and Greece ». *American Journal of Medical Genetics Part A* 155(1):58-68. doi: 10.1002/ajmg.a.33779.
- Hers, H. G. 1963. « α -Glucosidase deficiency in generalized glycogen-storage disease (Pompe's disease) ». *Biochemical Journal* 86(1):11-16.
- Hers, H. G. 1965. « Inborn Lysosomal Diseases ». *Gastroenterology* 48(5):625-33. doi: 10.1016/S0016-5085(65)80041-5.
- Hocquemiller, Michaël, Sandrine Vitry, Stéphanie Bigou, Julie Bruyère, Jérôme Ausseil, et Jean Michel Heard. 2010. « GAP43 Overexpression and Enhanced Neurite Outgrowth in Mucopolysaccharidosis Type IIIB Cortical Neuron Cultures: GAP43 and Enhanced Neurite Overgrowth in MPSIIIB ». *Journal of Neuroscience Research* 88(1):202-13. doi: 10.1002/jnr.22190.
- Holley, Rebecca J., Stuart M. Ellison, Daniel Fil, Claire O'Leary, John McDermott, Nishanthi Senthivel, Alexander W. W. Langford-Smith, Fiona L. Wilkinson, Zelpha D'Souza, Helen Parker, Aiyin Liao, Samuel Rowston, Hélène F. E. Gleitz, Shih-Hsin Kan, Patricia I. Dickson, et Brian W. Bigger. 2018. « Macrophage enzyme and reduced inflammation drive brain correction of mucopolysaccharidosis IIIB by stem cell gene therapy ». *Brain* 141(1):99-116. doi: 10.1093/brain/awx311.
- Hong, Wanjin. 2019. « SNXs Take Center Stage in Endosomal Sorting ». *Nature Cell Biology* 21(10):1175-77. doi: 10.1038/s41556-019-0401-7.
- van Horsen, Jack, Pieter Wesseling, Lambert PWJ van den Heuvel, Robert MW de Waal, et Marcel M. Verbeek. 2003. « Heparan sulphate proteoglycans in Alzheimer's disease and amyloid-related disorders ». *The Lancet Neurology* 2(8):482-92. doi: 10.1016/S1474-4422(03)00484-8.
- Huizing, Marjan, Amanda Helip-Wooley, Wendy Westbroek, Meral Gunay-Aygun, et William A. Gahl. 2008. « Disorders of Lysosome-Related Organelle Biogenesis: Clinical and Molecular Genetics ». *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 9(1):359-86. doi: 10.1146/annurev.genom.9.081307.164303.

RÉFÉRENCES

- Huotari, Jatta, et Ari Helenius. 2011. « Endosome maturation ». *The EMBO Journal* 30(17):3481-3500. doi: 10.1038/emboj.2011.286.
- Hurley, James H. 2015. « ESCRTs Are Everywhere ». *The EMBO Journal* 34(19):2398-2407. doi: 10.15252/embj.201592484.
- Hurwitz, Stephanie N., Li Sun, Kalonji Y. Cole, Charles R. Ford, James M. Olcese, et David G. Meckes. 2018. « An Optimized Method for Enrichment of Whole Brain-Derived Extracellular Vesicles Reveals Insight into Neurodegenerative Processes in a Mouse Model of Alzheimer's Disease ». *Journal of Neuroscience Methods* 307:210-20. doi: 10.1016/j.jneumeth.2018.05.022.
- Iavello, Alessandra, Valeska S. L. Frech, Chiara Gai, Maria Chiara Deregibus, Peter J. Quesenberry, et Giovanni Camussi. 2016. « Role of Alix in miRNA Packaging during Extracellular Vesicle Biogenesis ». *International Journal of Molecular Medicine* 37(4):958-66. doi: 10.3892/ijmm.2016.2488.
- Johnstone, R. M., M. Adam, J. R. Hammond, L. Orr, et C. Turbide. 1987. « Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). » *Journal of Biological Chemistry* 262(19):9412-20. doi: 10.1016/S0021-9258(18)48095-7.
- Johnstone, Rose M. 2005. « Revisiting the road to the discovery of exosomes ». *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 34(3):214-19. doi: 10.1016/j.bcmed.2005.03.002.
- Kalra, Hina, Gregor P. C. Drummen, et Suresh Mathivanan. 2016. « Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing ». *International Journal of Molecular Sciences* 17(2):170. doi: 10.3390/ijms17020170.
- Katzmann, David J., Markus Babst, et Scott D. Emr. 2001. « Ubiquitin-Dependent Sorting into the Multivesicular Body Pathway Requires the Function of a Conserved Endosomal Protein Sorting Complex, ESCRT-I ». *Cell* 106(2):145-55. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00434-2.
- Keren-Shaul, Hadas, Amit Spinrad, Assaf Weiner, Orit Matcovitch-Natan, Raz Dvir-Szternfeld, Tyler K. Ulland, Eyal David, Kuti Baruch, David Lara-Astaiso, Beata Toth, Shalev Itzkovitz, Marco Colonna, Michal Schwartz, et Ido Amit. 2017. « A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease ». *Cell* 169(7):1276-1290.e17. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.018.
- Khan, Shaukat A., Hira Peracha, Diana Ballhausen, Alfred Wiesbauer, Marianne Rohrbach, Matthias Gautschi, Robert W. Mason, Roberto Giugliani, Yasuyuki Suzuki, Kenji E. Orii, Tadao Orii, et Shunji Tomatsu. 2017. « Epidemiology of Mucopolysaccharidoses ». *Molecular Genetics and Metabolism* 121(3):227-40. doi: 10.1016/j.ymgme.2017.05.016.
- Kingma, Sandra D. K., Olaf A. Bodamer, et Frits A. Wijburg. 2015. « Epidemiology and Diagnosis of Lysosomal Storage Disorders; Challenges of Screening ». *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 29(2):145-57. doi: 10.1016/j.beem.2014.08.004.
- Kobayashi, Hiroshi. 2019. « Recent Trends in Mucopolysaccharidosis Research ». *Journal of Human Genetics* 64(2):127-37. doi: 10.1038/s10038-018-0534-8.

RÉFÉRENCES

- Kong, Weijing, Yanqing Yao, Jing Zhang, Cheng Lu, Yingxue Ding, et Yan Meng. 2020. « Update of Treatment for Mucopolysaccharidosis Type III (Sanfilippo Syndrome) ». *European Journal of Pharmacology* 888:173562. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173562.
- Kowalewski, Björn, William C. Lamanna, Roger Lawrence, Markus Damme, Stijn Stroobants, Michael Padva, Ina Kalus, Marc-André Frese, Torben Lübke, Renate Lüllmann-Rauch, Rudi D'Hooge, Jeffrey D. Esko, et Thomas Dierks. 2012. « Arylsulfatase G inactivation causes loss of heparan sulfate 3-O-sulfatase activity and mucopolysaccharidosis in mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(26):10310-15. doi: 10.1073/pnas.1202071109.
- Krämer-Albers, Eva-Maria, et Andrew F. Hill. 2016. « Extracellular Vesicles: Interneural Shuttles of Complex Messages ». *Current Opinion in Neurobiology* 39:101-7. doi: 10.1016/j.conb.2016.04.016.
- Lachenal, Gaele, Karin Pernet-Gallay, Mathilde Chivet, Fiona J. Hemming, Agnès Belly, Gilles Bodon, Béatrice Blot, Georg Haase, Yves Goldberg, et Rémy Sadoul. 2011. « Release of Exosomes from Differentiated Neurons and Its Regulation by Synaptic Glutamatergic Activity ». *Molecular and Cellular Neurosciences* 46(2):409-18. doi: 10.1016/j.mcn.2010.11.004.
- Larios, Jorge, Vincent Mercier, Aurélien Roux, et Jean Gruenberg. 2020. « ALIX- and ESCRT-III-Dependent Sorting of Tetraspanins to Exosomes ». *Journal of Cell Biology* 219(3). doi: 10.1083/jcb.201904113.
- Lawrence, Roger, Jillian R. Brown, Fred Lorey, Patricia I. Dickson, Brett E. Crawford, et Jeffrey D. Esko. 2014. « Glycan-based biomarkers for mucopolysaccharidoses ». *Molecular Genetics and Metabolism* 111(2):73-83. doi: 10.1016/j.ymgme.2013.07.016.
- Leal, Andrés Felipe, Eliana Benincore-Flórez, Estera Rintz, Angélica María Herreño-Pachón, Betül Celik, Yasuhiko Ago, Carlos Javier Alméciga-Díaz, et Shunji Tomatsu. 2023. « Mucopolysaccharidoses: Cellular Consequences of Glycosaminoglycans Accumulation and Potential Targets ». *International Journal of Molecular Sciences* 24(1):477. doi: 10.3390/ijms24010477.
- Lee, Annie, Yusuke Hirabayashi, Seok-Kyu Kwon, Tommy L. Lewis, et Franck Polleux. 2018. « Emerging roles of mitochondria in synaptic transmission and neurodegeneration ». *Current Opinion in Physiology* 3:82-93. doi: 10.1016/j.cophys.2018.03.009.
- Lemaire, Quentin, Antonella Raffo-Romero, Tanina Arab, Christelle Van Camp, Francesco Drago, Stefano Forte, Jean-Pascal Gimeno, Séverine Begard, Morvane Colin, Jacopo Vizioli, Pierre-Eric Sautière, Michel Salzet, et Christophe Lefebvre. 2019. « Isolation of Microglia-Derived Extracellular Vesicles: Towards miRNA Signatures and Neuroprotection ». *Journal of Nanobiotechnology* 17(1):119. doi: 10.1186/s12951-019-0551-6.
- Leng, Fangda, et Paul Edison. 2021. « Neuroinflammation and Microglial Activation in Alzheimer Disease: Where Do We Go from Here? ». *Nature Reviews Neurology* 17(3):157-72. doi: 10.1038/s41582-020-00435-y.
- Leow-Dyke, Sophie, Charlotte Allen, Adam Denes, Olov Nilsson, Samaneh Maysami, Andrew G. Bowie, Nancy J. Rothwell, et Emmanuel Pinteaux. 2012. « Neuronal toll-like receptor 4 signaling induces brain endothelial activation and neutrophil transmigration in vitro ». *Journal of Neuroinflammation* 9(1):230. doi: 10.1186/1742-2094-9-230.

RÉFÉRENCES

- Li, Hong Hua, Hui-Zhi Zhao, Elizabeth F. Neufeld, Yan Cai, et Fernando Gómez-Pinilla. 2002. « Attenuated Plasticity in Neurons and Astrocytes in the Mouse Model of Sanfilippo Syndrome Type B ». *Journal of Neuroscience Research* 69(1):30-38. doi: 10.1002/jnr.10278.
- Li, Jiabin, Xinyu Shui, Ruizheng Sun, Lily Wan, Boxin Zhang, Bo Xiao, et Zhaohui Luo. 2021. « Microglial Phenotypic Transition: Signaling Pathways and Influencing Modulators Involved in Regulation in Central Nervous System Diseases ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 15.
- Li, X. H., N. S. Fu, et Z. M. Xing. 2019. « MiR-100 Suppresses Inflammatory Activation of Microglia and Neuronal Apoptosis Following Spinal Cord Injury via TLR4/NF- κ B Pathway ». *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 23(20):8713-20. doi: 10.26355/eurrev_201910_19265.
- Li, Yongfang, Ze Liu, Yaying Song, Jia-ji Pan, Yixu Jiang, Xiaojing Shi, Chang Liu, Yuanyuan Ma, Longlong Luo, Muyassar Mamtilahun, Zhiyu Shi, Haroon Khan, Qing Xie, Yongting Wang, Yaohui Tang, Zhijun Zhang, et Guo-Yuan Yang. 2022. « M2 Microglia-Derived Extracellular Vesicles Promote White Matter Repair and Functional Recovery via miR-23a-5p after Cerebral Ischemia in Mice ». *Theranostics* 12(7):3553-73. doi: 10.7150/thno.68895.
- Li, Zhengzhe, Xiaoling Wang, Xiaoxing Wang, Xiaomei Yi, Yin Kwan Wong, Jiyang Wu, Fangfang Xie, Die Hu, Qi Wang, Jigang Wang, et Tianyu Zhong. 2023. « Research progress on the role of extracellular vesicles in neurodegenerative diseases ». *Translational Neurodegeneration* 12(1):43. doi: 10.1186/s40035-023-00375-9.
- Linnerbauer, Mathias, Michael A. Wheeler, et Francisco J. Quintana. 2020. « Astrocyte Crosstalk in CNS Inflammation ». *Neuron* 108(4):608-22. doi: 10.1016/j.neuron.2020.08.012.
- Long, Katherine R., et Wieland B. Huttner. 2019. « How the extracellular matrix shapes neural development ». *Open Biology* 9(1):180216. doi: 10.1098/rsob.180216.
- Lötvall, Jan, Andrew F. Hill, Fred Hochberg, Edit I. Buzás, Dolores Di Vizio, Christopher Gardiner, Yong Song Gho, Igor V. Kurochkin, Suresh Mathivanan, Peter Quesenberry, Susmita Sahoo, Hidetoshi Tahara, Marca H. Wauben, Kenneth W. Witwer, et Clotilde Théry. 2014. « Minimal Experimental Requirements for Definition of Extracellular Vesicles and Their Functions: A Position Statement from the International Society for Extracellular Vesicles ». *Journal of Extracellular Vesicles* 3:26913. doi: 10.3402/jev.v3.26913.
- Ma, Liang, Ying Li, Junya Peng, Danni Wu, Xiaoxin Zhao, Yitong Cui, Lilian Chen, Xiaojun Yan, Yanan Du, et Li Yu. 2015. « Discovery of the Migrasome, an Organelle Mediating Release of Cytoplasmic Contents during Cell Migration ». *Cell Research* 25(1):24-38. doi: 10.1038/cr.2014.135.
- Mah, Dylan, Jing Zhao, Xinyue Liu, Fuming Zhang, Jian Liu, Lianchun Wang, Robert Linhardt, et Chunyu Wang. 2021. « The Sulfation Code of Tauopathies: Heparan Sulfate Proteoglycans in the Prion Like Spread of Tau Pathology ». *Frontiers in Molecular Biosciences* 8.
- Mahmoud, Shaimaa, Marjan Gharagozloo, Camille Simard, et Denis Gris. 2019. « Astrocytes Maintain Glutamate Homeostasis in the CNS by Controlling the Balance between Glutamate Uptake and Release ». *Cells* 8(2):184. doi: 10.3390/cells8020184.
- Mallach, Anna, Johan Gobom, Charles Arber, Thomas M. Piers, John Hardy, Selina Wray, Henrik Zetterberg, et Jennifer Pocock. 2021. « Differential Stimulation of Pluripotent Stem

RÉFÉRENCES

Cell-Derived Human Microglia Leads to Exosomal Proteomic Changes Affecting Neurons ». *Cells* 10(11):2866. doi: 10.3390/cells10112866.

Mandolfo, Oriana, Helen Parker, et Brian Bigger. 2022. « Innate Immunity in Mucopolysaccharide Diseases ». *International Journal of Molecular Sciences* 23(4):1999. doi: 10.3390/ijms23041999.

Martins, Carla, Helena Hůlková, Larbi Dridi, Virginie Dormoy-Raclet, Lubov Grigoryeva, Yoo Choi, Alexander Langford-Smith, Fiona L. Wilkinson, Kazuhiro Ohmi, Graziella DiCristo, Edith Hamel, Jérôme Ausseil, David Cheillan, Alain Moreau, Eva Svobodová, Zuzana Hájková, Markéta Tesařová, Hana Hansíková, Brian W. Bigger, Martin Hřebíček, et Alexey V. Pshezhetsky. 2015. « Neuroinflammation, Mitochondrial Defects and Neurodegeneration in Mucopolysaccharidosis III Type C Mouse Model ». *Brain* 138(2):336-55. doi: 10.1093/brain/awu355.

Mathieu, Mathilde, Lorena Martin-Jaular, Grégory Lavieu, et Clotilde Théry. 2019. « Specificities of Secretion and Uptake of Exosomes and Other Extracellular Vesicles for Cell-to-Cell Communication ». *Nature Cell Biology* 21(1):9-17. doi: 10.1038/s41556-018-0250-9.

Matos, Liliana, Isaac Canals, Larbi Dridi, Yoo Choi, Maria João Prata, Peter Jordan, Lourdes R. Desviat, Belén Pérez, Alexey V. Pshezhetsky, Daniel Grinberg, Sandra Alves, et Lluïsa Vilageliu. 2014. « Therapeutic strategies based on modified U1 snRNAs and chaperones for Sanfilippo C splicing mutations ». *Orphanet Journal of Rare Diseases* 9(1):180. doi: 10.1186/s13023-014-0180-y.

McGlynn, Robert, Kostantin Dobrenis, et Steven U. Walkley. 2004. « Differential Subcellular Localization of Cholesterol, Gangliosides, and Glycosaminoglycans in Murine Models of Mucopolysaccharide Storage Disorders ». *Journal of Comparative Neurology* 480(4):415-26. doi: 10.1002/cne.20355.

Medina, Diego L., Alessandro Fraldi, Valentina Bouche, Fabio Annunziata, Gelsomina Mansueto, Carmine Spampinato, Claudia Puri, Antonella Pignata, Jose A. Martina, Marco Sardiello, Michela Palmieri, Roman Polishchuk, Rosa Puertollano, et Andrea Ballabio. 2011. « Transcriptional Activation of Lysosomal Exocytosis Promotes Cellular Clearance ». *Developmental Cell* 21(3):421-30. doi: 10.1016/j.devcel.2011.07.016.

Mejlvang, Jakob, Hallvard Olsvik, Steingrim Svenning, Jack-Ansgar Bruun, Yakubu Princely Abudu, Kenneth Bowitz Larsen, Andreas Brech, Tom E. Hansen, Hanne Brenne, Terkel Hansen, Harald Stenmark, et Terje Johansen. 2018. « Starvation induces rapid degradation of selective autophagy receptors by endosomal microautophagy ». *The Journal of Cell Biology* 217(10):3640-55. doi: 10.1083/jcb.201711002.

de Menezes, Erika G. Marques, Jocelyn S. Liu, Scott A. Bowler, Leila B. Giron, Michelle L. D'Antoni, Cecilia M. Shikuma, Mohamed Abdel-Mohsen, Lishomwa C. Ndhlovu, et Philip J. Norris. 2022. « Circulating brain-derived extracellular vesicles expressing neuroinflammatory markers are associated with HIV-related neurocognitive impairment ». *Frontiers in Immunology* 13:1033712. doi: 10.3389/fimmu.2022.1033712.

Menkovic, Iskren, Pamela Lavoie, Michel Boutin, et Christiane Auray-Blais. 2019. « Distribution of Heparan Sulfate and Dermatan Sulfate in Mucopolysaccharidosis Type II Mouse Tissues Pre- and Post-Enzyme-Replacement Therapy Determined by UPLC-MS/MS ».

RÉFÉRENCES

Bioanalysis 11(8):727-40. doi: 10.4155/bio-2018-0306.

Michaud, M., N. Belmatoug, F. Catros, S. Ancellin, G. Touati, T. Levade, et F. Gaches. 2020. « Mucopolysaccharidoses : quand y penser ? » *La Revue de Médecine Interne* 41(3):180-88. doi: 10.1016/j.revmed.2019.11.010.

Minakaki, Georgia, Stefanie Menges, Agnes Kittel, Evangelia Emmanouilidou, Iris Schaeffner, Katalin Barkovits, Anna Bergmann, Edward Rockenstein, Anthony Adame, Franz Marxreiter, Brit Mollenhauer, Douglas Galasko, Edit Irén Buzás, Ursula Schlötzer-Schrehardt, Katrin Marcus, Wei Xiang, Dieter Chichung Lie, Kostas Vekrellis, Eliezer Masliah, Jürgen Winkler, et Jochen Klucken. 2018. « Autophagy Inhibition Promotes SNCA/Alpha-Synuclein Release and Transfer via Extracellular Vesicles with a Hybrid Autophagosome-Exosome-like Phenotype ». *Autophagy* 14(1):98-119. doi: 10.1080/15548627.2017.1395992.

Moreno-Gonzalo, Olga, Irene Fernandez-Delgado, et Francisco Sanchez-Madrid. 2018. « Post-Translational Add-Ons Mark the Path in Exosomal Protein Sorting ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 75(1):1-19. doi: 10.1007/s00018-017-2690-y.

Muraoka, Satoshi, Annina M. DeLeo, Manveen K. Sethi, Kayo Yukawa-Takamatsu, Zijian Yang, Jina Ko, John D. Hogan, Zhi Ruan, Yang You, Yuzhi Wang, Maria Medalla, Seiko Ikezu, Mei Chen, Weiming Xia, Santhi Gorantla, Howard E. Gendelman, David Issadore, Joseph Zaia, et Tsuneya Ikezu. 2020. « Proteomic and Biological Profiling of Extracellular Vesicles from Alzheimer's Disease Human Brain Tissues ». *Alzheimer's & Dementia* 16(6):896-907. doi: 10.1002/alz.12089.

Muraoka, Satoshi, Mark P. Jedrychowski, Naotoshi Iwahara, Mohammad Abdullah, Kristen D. Onos, Kelly J. Keezer, Jianqiao Hu, Seiko Ikezu, Gareth R. Howell, Steven P. Gygi, et Tsuneya Ikezu. 2021. « Enrichment of Neurodegenerative Microglia Signature in Brain-Derived Extracellular Vesicles Isolated from Alzheimer's Disease Mouse Models ». *Journal of Proteome Research* 20(3):1733-43. doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00934.

Muschol, Nicole, Roberto Giugliani, Simon A. Jones, Joseph Muenzer, Nicholas J. C. Smith, Chester B. Whitley, Megan Donnell, Elise Drake, Kristina Elvidge, Lisa Melton, Cara O'Neill, et MPS III Guideline Development Group. 2022. « Sanfilippo syndrome: consensus guidelines for clinical care ». *Orphanet Journal of Rare Diseases* 17(1):391. doi: 10.1186/s13023-022-02484-6.

Muzio, Luca, Alice Viotti, et Gianvito Martino. 2021. « Microglia in Neuroinflammation and Neurodegeneration: From Understanding to Therapy ». *Frontiers in Neuroscience* 15:742065. doi: 10.3389/fnins.2021.742065.

van Niel, Guillaume, David R. F. Carter, Aled Clayton, Daniel W. Lambert, Graça Raposo, et Pieter Vader. 2022. « Challenges and Directions in Studying Cell–Cell Communication by Extracellular Vesicles ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 23(5):369-82. doi: 10.1038/s41580-022-00460-3.

van Niel, Guillaume, Gisela D'Angelo, et Graça Raposo. 2018. « Shedding Light on the Cell Biology of Extracellular Vesicles ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19(4):213-28. doi: 10.1038/nrm.2017.125.

Nunez, Eladio A., Jeffrey Wallis, et Michael D. Gershon. 1974. « Secretory Processes in Follicular Cells of the Bat Thyroid. III. The Occurrence of Extracellular Vesicles and Colloid

RÉFÉRENCES

Droplets during Arousal from Hibernation ». *American Journal of Anatomy* 141(2):179-201. doi: 10.1002/aja.1001410203.

O'Callaghan, Paul, Xiao Zhang, et Jin-Ping Li. 2018. « Heparan Sulfate Proteoglycans as Relays of Neuroinflammation ». *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 66(4):305-19. doi: 10.1369/0022155417742147.

Ohmi, Kazuhiro, David S. Greenberg, Kavitha S. Rajavel, Sergey Ryazantsev, Hong Hua Li, et Elizabeth F. Neufeld. 2003. « Activated microglia in cortex of mouse models of mucopolysaccharidoses I and IIIB ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(4):1902-7. doi: 10.1073/pnas.252784899.

Ohmi, Kazuhiro, Lili C. Kudo, Sergey Ryazantsev, Hui-Zhi Zhao, Stanislav L. Karsten, et Elizabeth F. Neufeld. 2009. « Sanfilippo syndrome type B, a lysosomal storage disease, is also a tauopathy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(20):8332-37. doi: 10.1073/pnas.0903223106.

Palmieri, Michela, Soren Impey, Hyojin Kang, Alberto Di Ronza, Carl Pelz, Marco Sardiello, et Andrea Ballabio. 2011. « Characterization of the CLEAR Network Reveals an Integrated Control of Cellular Clearance Pathways ». *Human Molecular Genetics* 20(19):3852-66. doi: 10.1093/hmg/ddr306.

Pan, Xuefang, Camila De Britto Pará De Aragão, Juan P. Velasco-Martin, David A. Priestman, Harry Y. Wu, Kohta Takahashi, Kazunori Yamaguchi, Luisella Sturiale, Domenico Garozzo, Frances M. Platt, Nathalie Lamarche-Vane, Carlos R. Morales, Taeko Miyagi, et Alexey V. Pshezhetsky. 2017. « Neuraminidases 3 and 4 Regulate Neuronal Function by Catabolizing Brain Gangliosides ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 31(8):3467-83. doi: 10.1096/fj.201601299R.

Pan, Xuefang, Mahsa Taherzadeh, Poulomee Bose, Rachel Heon-Roberts, Annie L. A. Nguyen, TianMeng Xu, Camila Pará, Yojiro Yamanaka, David A. Priestman, Frances M. Platt, Shaikat Khan, Nidhi Fnu, Shunji Tomatsu, Carlos R. Morales, et Alexey V. Pshezhetsky. 2022. « Glucosamine amends CNS pathology in mucopolysaccharidosis IIIC mouse expressing misfolded HGSNAT ». *Journal of Experimental Medicine* 219(8):e20211860. doi: 10.1084/jem.20211860.

Paolicelli, Rosa C., Amanda Sierra, Beth Stevens, Marie-Eve Tremblay, Adriano Aguzzi, Bahareh Ajami, Ido Amit, Etienne Audinat, Ingo Bechmann, Mariko Bennett, Frederick Bennett, Alain Bessis, Knut Biber, Staci Bilbo, Mathew Blurton-Jones, Erik Boddeke, Dora Brites, Bert Brône, Guy C. Brown, Oleg Butovsky, Monica J. Carson, Bernardo Castellano, Marco Colonna, Sally A. Cowley, Colm Cunningham, Dimitrios Davalos, Philip L. De Jager, Bart de Strooper, Adam Denes, Bart J. L. Eggen, Ukpong Eyo, Elena Galea, Sonia Garel, Florent Ginhoux, Christopher K. Glass, Ozgun Gokce, Diego Gomez-Nicola, Berta González, Siamon Gordon, Manuel B. Graeber, Andrew D. Greenhalgh, Pierre Gressens, Melanie Greter, David H. Gutmann, Christian Haass, Michael T. Heneka, Frank L. Heppner, Soyon Hong, David A. Hume, Steffen Jung, Helmut Kettenmann, Jonathan Kipnis, Ryuta Koyama, Greg Lemke, Marina Lynch, Ania Majewska, Marzia Malcangio, Tarja Malm, Renzo Mancuso, Takahiro Masuda, Michela Matteoli, Barry W. McColl, Veronique E. Miron, Anna Victoria Molofsky, Michelle Monje, Eva Mrcsko, Agnes Nadjar, Jonas J. Neher, Urte Neniskyte, Harald Neumann, Mami Noda, Bo Peng, Francesca Peri, V. Hugh Perry, Phillip G. Popovich, Clare Pridans, Josef Priller, Marco Prinz, Davide Ragozzino, Richard M. Ransohoff, Michael

RÉFÉRENCES

- W. Salter, Anne Schaefer, Dorothy P. Schafer, Michal Schwartz, Mikael Simons, Cody J. Smith, Wolfgang J. Streit, Tuan Leng Tay, Li-Huei Tsai, Alexei Verkhratsky, Rommy von Bernhardt, Hiroaki Wake, Valérie Wittamer, Susanne A. Wolf, Long-Jun Wu, et Tony Wyss-Coray. 2022. « Microglia States and Nomenclature: A Field at Its Crossroads ». *Neuron* 110(21):3458-83. doi: 10.1016/j.neuron.2022.10.020.
- Pará, Camila, Poulomee Bose, Luigi Bruno, Erika Freemantle, Mahsa Taherzadeh, Xuefang Pan, Chanshuai Han, Peter S. McPherson, Jean-Claude Lacaille, Éric Bonneil, Pierre Thibault, Claire O’Leary, Brian Bigger, Carlos Ramon Morales, Graziella Di Cristo, et Alexey V. Pshezhetsky. 2021. « Early Defects in Mucopolysaccharidosis Type IIIC Disrupt Excitatory Synaptic Transmission ». *JCI Insight*. doi: 10.1172/jci.insight.142073.
- Pará, Camila, Poulomee Bose, et Alexey V. Pshezhetsky. 2020. « Neuropathophysiology of Lysosomal Storage Diseases: Synaptic Dysfunction as a Starting Point for Disease Progression ». *Journal of Clinical Medicine* 9(3):616. doi: 10.3390/jcm9030616.
- Parenti, Giancarlo, Generoso Andria, et Andrea Ballabio. 2015. « Lysosomal Storage Diseases: From Pathophysiology to Therapy ». *Annual Review of Medicine* 66(1):471-86. doi: 10.1146/annurev-med-122313-085916.
- Parenti, Giancarlo, Diego L. Medina, et Andrea Ballabio. 2021. « The rapidly evolving view of lysosomal storage diseases ». *EMBO Molecular Medicine* 13(2):e12836. doi: 10.15252/emmm.202012836.
- Parker, Helen, Stuart M. Ellison, Rebecca J. Holley, Claire O’Leary, Aiyin Liao, Jalal Asadi, Emily Glover, Arunabha Ghosh, Simon Jones, Fiona L. Wilkinson, David Brough, Emmanuel Pinteaux, Hervé Boutin, et Brian W. Bigger. 2020. « Haematopoietic Stem Cell Gene Therapy with IL-1Ra Rescues Cognitive Loss in Mucopolysaccharidosis IIIA ». *EMBO Molecular Medicine* 12(3):e11185. doi: 10.15252/emmm.201911185.
- Patani, Rickie, Giles E. Hardingham, et Shane A. Liddelow. 2023. « Functional Roles of Reactive Astrocytes in Neuroinflammation and Neurodegeneration ». *Nature Reviews Neurology* 19(7):395-409. doi: 10.1038/s41582-023-00822-1.
- Perera, Rushika M., et Roberto Zoncu. 2016. « The Lysosome as a Regulatory Hub ». *Annual review of cell and developmental biology* 32:223-53. doi: 10.1146/annurev-cellbio-111315-125125.
- Petrova, Ralitsa, Abhijeet R. Patil, Vivian Trinh, Kathryn E. McElroy, Minoti Bhakta, Jason Tien, David S. Wilson, Liling Warren, et Jennifer R. Stratton. 2023. « Disease Pathology Signatures in a Mouse Model of Mucopolysaccharidosis Type IIIB ». *Scientific Reports* 13(1):16699. doi: 10.1038/s41598-023-42431-4.
- Piraud, M., S. Boyer, M. Mathieu, et I. Maire. 1993. « Diagnosis of Mucopolysaccharidoses in a Clinically Selected Population by Urinary Glycosaminoglycan Analysis: A Study of 2,000 Urine Samples ». 221:11. doi: [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(93\)90031-X](https://doi.org/10.1016/0009-8981(93)90031-X).
- Pistono, Cristiana, Nea Bister, Iveta Stanová, et Tarja Malm. 2021. « Glia-Derived Extracellular Vesicles: Role in Central Nervous System Communication in Health and Disease ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8. doi: 10.3389/fcell.2020.623771.
- Platt, Frances M., Alessandra d’Azzo, Beverly L. Davidson, Elizabeth F. Neufeld, et Cynthia

RÉFÉRENCES

- J. Tiffit. 2018. « Lysosomal Storage Diseases ». *Nature Reviews Disease Primers* 4(1):27. doi: 10.1038/s41572-018-0025-4.
- Platt, Frances M., Barry Boland, et Aarnoud C. van der Spoel. 2012. « Lysosomal storage disorders: The cellular impact of lysosomal dysfunction ». *Journal of Cell Biology* 199(5):723-34. doi: 10.1083/jcb.201208152.
- Poulain, Fabienne E., et H. Joseph Yost. 2015. « Heparan sulfate proteoglycans: a sugar code for vertebrate development? » *Development* 142(20):3456-67. doi: 10.1242/dev.098178.
- Prada, Ilaria, Martina Gabrielli, Elena Turola, Alessia Iorio, Giulia D'Arrigo, Roberta Parolisi, Mariacristina De Luca, Marco Pacifici, Mattia Bastoni, Marta Lombardi, Giuseppe Legname, Dan Cojoc, Annalisa Buffo, Roberto Furlan, Francesca Peruzzi, et Claudia Verderio. 2018. « Glia-to-Neuron Transfer of miRNAs via Extracellular Vesicles: A New Mechanism Underlying Inflammation-Induced Synaptic Alterations ». *Acta Neuropathologica* 135(4):529-50. doi: 10.1007/s00401-017-1803-x.
- Prydz, Kristian, et Knut Tomas Dalen. 2000. « Synthesis and sorting of proteoglycans ». *Journal of Cell Science* 113(2):193-205. doi: 10.1242/jcs.113.2.193.
- Pshezhetsky, Alexey V. 2015. « Crosstalk between 2 organelles: Lysosomal storage of heparan sulfate causes mitochondrial defects and neuronal death in mucopolysaccharidosis III type C ». *Rare Diseases* 3(1):e1049793. doi: 10.1080/21675511.2015.1049793.
- Pshezhetsky, Alexey V. 2016. « Lysosomal storage of heparan sulfate causes mitochondrial defects, altered autophagy, and neuronal death in the mouse model of mucopolysaccharidosis III type C ». *Autophagy* 12(6):1059-60. doi: 10.1080/15548627.2015.1046671.
- Puhm, Florian, Taras Afonyushkin, Ulrike Resch, Georg Obermayer, Manfred Rohde, Thomas Penz, Michael Schuster, Gabriel Wagner, Andre F. Rendeiro, Imene Melki, Christoph Kaun, Johann Wojta, Christoph Bock, Bernd Jilma, Nigel Mackman, Eric Boilard, et Christoph J. Binder. 2019. « Mitochondria Are a Subset of Extracellular Vesicles Released by Activated Monocytes and Induce Type I IFN and TNF Responses in Endothelial Cells ». *Circulation Research* 125(1):43-52. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.314601.
- Puy, Vincent, Walaa Darwiche, Stéphanie Trudel, Cathy Gomila, Christelle Lony, Laurent Puy, Thibaud Lefebvre, Sandrine Vitry, Agnès Boullier, Zoubida Karim, et Jérôme Ausseil. 2018. « Predominant Role of Microglia in Brain Iron Retention in Sanfilippo Syndrome, a Pediatric Neurodegenerative Disease ». *Glia* 66(8):1709-23. doi: 10.1002/glia.23335.
- Rabelink, Ton J., Bernard M. van den Berg, Marjolein Garsen, Ganqi Wang, Michael Elkin, et Johan van der Vlag. 2017. « Heparanase: Roles in Cell Survival, Extracellular Matrix Remodelling and the Development of Kidney Disease ». *Nature Reviews Nephrology* 13(4):201-12. doi: 10.1038/nrneph.2017.6.
- Raposo, Graça, et Willem Stoorvogel. 2013. « Extracellular Vesicles: Exosomes, Microvesicles, and Friends ». *Journal of Cell Biology* 200(4):373-83. doi: 10.1083/jcb.201211138.
- Record, Michel, Sandrine Silvente-Poirot, Marc Poirot, et Michael J. O. Wakelam. 2018. « Extracellular vesicles: lipids as key components of their biogenesis and functions ». *Journal of Lipid Research* 59(8):1316-24. doi: 10.1194/jlr.E086173.

RÉFÉRENCES

- Reddy, Anita, Elisabet V. Caler, et Norma W. Andrews. 2001. « Plasma Membrane Repair Is Mediated by Ca²⁺-Regulated Exocytosis of Lysosomes ». *Cell* 106(2):157-69. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00421-4.
- Rilla, Kirsi. 2021. « Diverse Plasma Membrane Protrusions Act as Platforms for Extracellular Vesicle Shedding ». *Journal of Extracellular Vesicles* 10(11):e12148. doi: 10.1002/jev2.12148.
- Roucourt, Bart, Sofie Meeussen, Jie Bao, Pascale Zimmermann, et Guido David. 2015. « Heparanase Activates the Syndecan-Syntenin-ALIX Exosome Pathway ». *Cell Research* 25(4):412-28. doi: 10.1038/cr.2015.29.
- Roy, Elise, Julie Bruyère, Patricia Flamant, Stéphanie Bigou, Jérôme Ausseil, Sandrine Vitry, et Jean Michel Heard. 2012. « GM130 Gain-of-Function Induces Cell Pathology in a Model of Lysosomal Storage Disease ». *Human Molecular Genetics* 21(7):1481-95. doi: 10.1093/hmg/ddr584.
- Ruan, Zhi, Jean-Christophe Delpech, Srinidhi Venkatesan Kalavai, Alicia A. Van Enoo, Jianqiao Hu, Seiko Ikezu, et Tsuneya Ikezu. 2020. « P2RX7 Inhibitor Suppresses Exosome Secretion and Disease Phenotype in P301S Tau Transgenic Mice ». *Molecular Neurodegeneration* 15(1):47. doi: 10.1186/s13024-020-00396-2.
- Ruan, Zhi, Dhruva Pathak, Srinidhi Venkatesan Kalavai, Asuka Yoshii-Kitahara, Satoshi Muraoka, Nemil Bhatt, Kayo Takamatsu-Yukawa, Jianqiao Hu, Yuzhi Wang, Samuel Hersh, Maria Ericsson, Santhi Gorantla, Howard E. Gendelman, Rakez Kaye, Seiko Ikezu, Jennifer I. Luebke, et Tsuneya Ikezu. 2021. « Alzheimer's Disease Brain-Derived Extracellular Vesicles Spread Tau Pathology in Interneurons ». *Brain* 144(1):288-309. doi: 10.1093/brain/awaa376.
- Ryazantsev, Sergey, Wei-Hong Yu, Hui-Zhi Zhao, Elizabeth F. Neufeld, et Kazuhiro Ohmi. 2007. « Lysosomal Accumulation of SCMAS (Subunit c of Mitochondrial ATP Synthase) in Neurons of the Mouse Model of Mucopolysaccharidosis III B ». *Molecular genetics and metabolism* 90(4):393-401. doi: 10.1016/j.ymgme.2006.11.006.
- Saftig, Paul, et Judith Klumperman. 2009. « Lysosome Biogenesis and Lysosomal Membrane Proteins: Trafficking Meets Function ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10(9):623-35. doi: 10.1038/nrm2745.
- Saint-Pol, Julien, Fabien Gosselet, Sophie Duban-Deweert, Gwënaël Pottiez, et Yann Karamanos. 2020. « Targeting and Crossing the Blood-Brain Barrier with Extracellular Vesicles ». *Cells* 9(4):851. doi: 10.3390/cells9040851.
- Saman, Sudad, WonHee Kim, Mario Raya, Yvonne Visnick, Suhad Miro, Sarmad Saman, Bruce Jackson, Ann C. McKee, Victor E. Alvarez, Norman C. Y. Lee, et Garth F. Hall. 2012. « Exosome-Associated Tau Is Secreted in Tauopathy Models and Is Selectively Phosphorylated in Cerebrospinal Fluid in Early Alzheimer Disease ». *Journal of Biological Chemistry* 287(6):3842-49. doi: 10.1074/jbc.M111.277061.
- Sardar Sinha, Maitrayee, Anna Ansell-Schultz, Livia Civitelli, Camilla Hildesjö, Max Larsson, Lars Lannfelt, Martin Ingelsson, et Martin Hallbeck. 2018. « Alzheimer's Disease Pathology Propagation by Exosomes Containing Toxic Amyloid-Beta Oligomers ». *Acta Neuropathologica* 136(1):41-56. doi: 10.1007/s00401-018-1868-1.
- Sarrazin, Stéphane, William C. Lamanna, et Jeffrey D. Esko. 2011. « Heparan Sulfate

RÉFÉRENCES

- Proteoglycans ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3(7):a004952. doi: 10.1101/cshperspect.a004952.
- Satarker, Sairaj, Sree Lalitha Bojja, Prasada Chowdari Gurram, Jayesh Mudgal, Devinder Arora, et Madhavan Nampoothiri. 2022. « Astrocytic Glutamatergic Transmission and Its Implications in Neurodegenerative Disorders ». *Cells* 11(7):1139. doi: 10.3390/cells11071139.
- Sawamoto, Kazuki, Molly Stapleton, Carlos J. Alméciga-Díaz, Angela J. Espejo-Mojica, Juan Camilo Losada, Diego A. Suarez, et Shunji Tomatsu. 2019. « Therapeutic Options for Mucopolysaccharidoses: Current and Emerging Treatments ». *Drugs* 79(10):1103-34. doi: 10.1007/s40265-019-01147-4.
- Scarpa, Maurizio, Charles Marques Lourenço, et Hernán Amartino. 2017. « Epilepsy in Mucopolysaccharidosis Disorders ». *Molecular Genetics and Metabolism* 122:55-61. doi: 10.1016/j.ymgme.2017.10.006.
- Schulze, Heike, Thomas Kolter, et Konrad Sandhoff. 2009. « Principles of lysosomal membrane degradation: Cellular topology and biochemistry of lysosomal lipid degradation ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1793(4):674-83. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.09.020.
- Seager, Richard, Laura Lee, Jeremy M. Henley, et Kevin A. Wilkinson. 2020. « Mechanisms and Roles of Mitochondrial Localisation and Dynamics in Neuronal Function ». *Neuronal Signaling* 4(2):NS20200008. doi: 10.1042/NS20200008.
- Seker Yilmaz, Berna, James Davison, Simon A. Jones, et Julien Baruteau. 2021. « Novel therapies for mucopolysaccharidosis type III ». *Journal of Inherited Metabolic Disease* 44(1):129-47. doi: 10.1002/jimd.12316.
- Settembre, Carmine, Alessandro Fraldi, Luca Jahreiss, Carmine Spampinato, Consuelo Venturi, Diego Medina, Raquel de Pablo, Carlo Tacchetti, David C. Rubinsztein, et Andrea Ballabio. 2008. « A Block of Autophagy in Lysosomal Storage Disorders ». *Human Molecular Genetics* 17(1):119-29. doi: 10.1093/hmg/ddm289.
- Settembre, Carmine, Alessandro Fraldi, Diego L. Medina, et Andrea Ballabio. 2013. « Signals from the Lysosome: A Control Centre for Cellular Clearance and Energy Metabolism ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14(5):283-96. doi: 10.1038/nrm3565.
- Settembre, Carmine, et Diego L. Medina. 2015. « Chapter 3 - TFEB and the CLEAR network ». P. 45-62 in *Methods in Cell Biology*. Vol. 126, *Lysosomes and Lysosomal Diseases*, édité par F. Platt et N. Platt. Academic Press.
- Settembre, Carmine, Roberto Zoncu, Diego L. Medina, Francesco Vetrini, Serkan Erdin, SerpilUckac Erdin, Tuong Huynh, Mathieu Ferron, Gerard Karsenty, Michel C. Vellard, Valeria Facchinetti, David M. Sabatini, et Andrea Ballabio. 2012. « A Lysosome-to-Nucleus Signalling Mechanism Senses and Regulates the Lysosome via mTOR and TFEB ». *The EMBO Journal* 31(5):1095-1108. doi: 10.1038/emboj.2012.32.
- Shi, Min, Changqin Liu, Travis J. Cook, Kristin M. Bullock, Yanchun Zhao, Carmen Gingham, Yanfei Li, Patrick Aro, Romel Dator, Chunmei He, Michael J. Hipp, Cyrus P. Zabetian, Elaine R. Peskind, Shu-Ching Hu, Joseph F. Quinn, Douglas R. Galasko, William A. Banks, et Jing Zhang. 2014. « Plasma Exosomal α -Synuclein Is Likely CNS-Derived and Increased in

RÉFÉRENCES

Parkinson's Disease ». *Acta Neuropathologica* 128(5):639-50. doi: 10.1007/s00401-014-1314-y.

Shurer, Carolyn R., Joe Chin-Hun Kuo, LaDeidra Monét Roberts, Jay G. Gandhi, Marshall J. Colville, Thais A. Enoki, Hao Pan, Jin Su, Jade M. Noble, Michael J. Hollander, John P. O'Donnell, Rose Yin, Kayvon Pedram, Leonhard Möckl, Lena F. Kourkoutis, W. E. Moerner, Carolyn R. Bertozzi, Gerald W. Feigenson, Heidi L. Reesink, et Matthew J. Paszek. 2019. « Physical Principles of Membrane Shape Regulation by the Glycocalyx ». *Cell* 177(7):1757-1770.e21. doi: 10.1016/j.cell.2019.04.017.

Siddiqui, Noah, Kaori Oshima, et Joseph A. Hippensteel. 2022. « Proteoglycans and glycosaminoglycans in central nervous system injury ». *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 323(1):C46-55. doi: 10.1152/ajpcell.00053.2022.

Sierra, Amanda, Rosa C. Paolicelli, et Helmut Kettenmann. 2019. « Cien Años de Microglía: Milestones in a Century of Microglial Research ». *Trends in Neurosciences* 42(11):778-92. doi: 10.1016/j.tins.2019.09.004.

Sigdel, Smara, Sabrina Swenson, et Jinju Wang. 2023. « Extracellular Vesicles in Neurodegenerative Diseases: An Update ». *International Journal of Molecular Sciences* 24(17):13161. doi: 10.3390/ijms241713161.

Simonaro, Calogera M., Yi Ge, Efrat Eliyahu, Xingxuan He, Karl J. Jepsen, et Edward H. Schuchman. 2010. « Involvement of the Toll-like Receptor 4 Pathway and Use of TNF- α Antagonists for Treatment of the Mucopolysaccharidoses ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(1):222-27. doi: 10.1073/pnas.0912937107.

Sipione, Simonetta, John Monyror, Danny Galleguillos, Noam Steinberg, et Vaibhavi Kadam. 2020. « Gangliosides in the Brain: Physiology, Pathophysiology and Therapeutic Applications ». *Frontiers in Neuroscience* 14:572965. doi: 10.3389/fnins.2020.572965.

Snow, Alan David, Joel A. Cummings, et Thomas Lake. 2021. « The Unifying Hypothesis of Alzheimer's Disease: Heparan Sulfate Proteoglycans/Glycosaminoglycans Are Key as First Hypothesized Over 30 Years Ago ». *Frontiers in Aging Neuroscience* 13:710683. doi: 10.3389/fnagi.2021.710683.

Sofroniew, Michael V. 2015. « Astrocyte Barriers to Neurotoxic Inflammation ». *Nature Reviews Neuroscience* 16(5):249-63. doi: 10.1038/nrn3898.

Soles, Alyssa, Adem Selimovic, Kaelin Sbrocco, Ferris Ghannoum, Katherine Hamel, Emmanuel Labrada Moncada, Stephen Gilliat, et Marija Cvetanovic. 2023. « Extracellular Matrix Regulation in Physiology and in Brain Disease ». *International Journal of Molecular Sciences* 24(8):7049. doi: 10.3390/ijms24087049.

Son, Jin H., Jung Hee Shim, Kyung-Hee Kim, Ji-Young Ha, et Ji Young Han. 2012. « Neuronal Autophagy and Neurodegenerative Diseases ». *Experimental & Molecular Medicine* 44(2):89-98. doi: 10.3858/emm.2012.44.2.031.

Spahiu, Lidvana, Emir Behluli, Borut Peterlin, Hilada Nefic, Rifat Hadziselimovic, Thomas Liehr, et Gazmend Temaj. 2021. « Mucopolysaccharidosis III: Molecular basis and treatment ». *Pediatric Endocrinology, Diabetes, and Metabolism* 27(3):199-208. doi: 10.5114/pedm.2021.109270.

RÉFÉRENCES

- Stahl, Philip D., et Graca Raposo. 2019. « Extracellular Vesicles: Exosomes and Microvesicles, Integrators of Homeostasis ». *Physiology* 34(3):169-77. doi: 10.1152/physiol.00045.2018.
- Story, Brett D., Matthew E. Miller, Allison M. Bradbury, Emily D. Million, Dongsheng Duan, Toloo Taghian, Dominik Faissler, Deborah Fernau, Sidney J. Beecy, et Heather L. Gray-Edwards. 2020. « Canine Models of Inherited Musculoskeletal and Neurodegenerative Diseases ». *Frontiers in Veterinary Science* 7:80. doi: 10.3389/fvets.2020.00080.
- Su, Huaqi, Yepy H. Rustam, Colin L. Masters, Enes Makalic, Catriona A. McLean, Andrew F. Hill, Kevin J. Barnham, Gavin E. Reid, et Laura J. Vella. 2021. « Characterization of Brain-Derived Extracellular Vesicle Lipids in Alzheimer's Disease ». *Journal of Extracellular Vesicles* 10(7):e12089. doi: 10.1002/jev2.12089.
- Swanson, Karen V., Meng Deng, et Jenny P. Y. Ting. 2019. « The NLRP3 Inflammasome: Molecular Activation and Regulation to Therapeutics ». *Nature Reviews Immunology* 19(8):477-89. doi: 10.1038/s41577-019-0165-0.
- Tancini, Brunella, Sandra Buratta, Krizia Sagini, Eva Costanzi, Federica Delo, Lorena Urbanelli, et Carla Emiliani. 2019. « Insight into the Role of Extracellular Vesicles in Lysosomal Storage Disorders ». *Genes* 10(7):510. doi: 10.3390/genes10070510.
- Tardieu, Marc, Michel Zérah, Marie-Lise Gougeon, Jérôme Ausseil, Stéphanie de Bournonville, Béatrice Husson, Dimitrios Zafeiriou, Giancarlo Parenti, Philippe Bourget, Béatrice Poirier, Valérie Furlan, Cécile Artaud, Thomas Baugnon, Thomas Roujeau, Ronald G. Crystal, Christian Meyer, Kumaran Deiva, et Jean-Michel Heard. 2017. « Intracerebral Gene Therapy in Children with Mucopolysaccharidosis Type IIIB Syndrome: An Uncontrolled Phase 1/2 Clinical Trial ». *The Lancet Neurology* 16(9):712-20. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30169-2.
- Théry, Clotilde, Kenneth W. Witwer, Elena Aikawa, Maria Jose Alcaraz, Johnathon D. Anderson, Ramarosan Andriantsitohaina, Anna Antoniou, Tanina Arab, Fabienne Archer, Georgia K. Atkin-Smith, D. Craig Ayre, Jean-Marie Bach, Daniel Bachurski, Hossein Baharvand, Leonora Balaj, Shawn Baldacchino, Natalie N. Bauer, Amy A. Baxter, Mary Bebawy, Carla Beckham, Apolonija Bedina Zavec, Abderrahim Benmoussa, Anna C. Berardi, Paolo Bergese, Ewa Bielska, Cherie Blenkiron, Sylwia Bobis-Wozowicz, Eric Boilard, Wilfrid Boireau, Antonella Bongiovanni, Francesc E. Borràs, Steffi Bosch, Chantal M. Boulanger, Xandra Breakefield, Andrew M. Breglio, Meadhbh Á. Brennan, David R. Brigstock, Alain Brisson, Marike LD Broekman, Jacqueline F. Bromberg, Paulina Bryl-Górecka, Shilpa Buch, Amy H. Buck, Dylan Burger, Sara Busatto, Dominik Buschmann, Benedetta Bussolati, Edit I. Buzás, James Bryan Byrd, Giovanni Camussi, David RF Carter, Sarah Caruso, Lawrence W. Chamley, Yu-Ting Chang, Chihchen Chen, Shuai Chen, Lesley Cheng, Andrew R. Chin, Aled Clayton, Stefano P. Clerici, Alex Cocks, Emanuele Cocucci, Robert J. Coffey, Anabela Cordeiro-da-Silva, Yvonne Couch, Frank AW Coumans, Beth Coyle, Rossella Crescitelli, Miria Ferreira Criado, Crislyn D'Souza-Schorey, Saumya Das, Amrita Datta Chaudhuri, Paola de Candia, Eliezer F. De Santana, Olivier De Wever, Hernando A. del Portillo, Tanguy Demaret, Sarah Deville, Andrew Devitt, Bert Dhondt, Dolores Di Vizio, Lothar C. Dieterich, Vincenza Dolo, Ana Paula Dominguez Rubio, Massimo Dominici, Mauricio R. Dourado, Tom AP Driedonks, Filipe V. Duarte, Heather M. Duncan, Ramon M. Eichenberger, Karin Ekström, Samir EL Andaloussi, Celine Elie-Caille, Uta Erdbrügger, Juan M. Falcón-Pérez, Farah Fatima, Jason E. Fish, Miguel Flores-Bellver, Andrés Försönits, Annie Frelet-Barrand, Fabia Fricke, Gregor Fuhrmann, Susanne Gabrielsson, Ana Gámez-Valero, Chris Gardiner, Kathrin Gärtner,

RÉFÉRENCES

Raphael Gaudin, Yong Song Gho, Bernd Giebel, Caroline Gilbert, Mario Gimona, Ilaria Giusti, Deborah CI Goberdhan, André Görgens, Sharon M. Gorski, David W. Greening, Julia Christina Gross, Alice Gualerzi, Gopal N. Gupta, Dakota Gustafson, Aase Handberg, Reka A. Haraszti, Paul Harrison, Hargita Hegyesi, An Hendrix, Andrew F. Hill, Fred H. Hochberg, Karl F. Hoffmann, Beth Holder, Harry Holthofer, Baharak Hosseinkhani, Guoku Hu, Yiyao Huang, Veronica Huber, Stuart Hunt, Ahmed Gamal-Eldin Ibrahim, Tsuneya Ikezu, Jameel M. Inal, Mustafa Isin, Alena Ivanova, Hannah K. Jackson, Soren Jacobsen, Steven M. Jay, Muthuvel Jayachandran, Guido Jenster, Lanzhou Jiang, Suzanne M. Johnson, Jennifer C. Jones, Ambrose Jong, Tijana Jovanovic-Talisman, Stephanie Jung, Raghu Kalluri, Shin-ichi Kano, Sukhbir Kaur, Yumi Kawamura, Evan T. Keller, Delaram Khamari, Elena Khomyakova, Anastasia Khvorova, Peter Kierulf, Kwang Pyo Kim, Thomas Kislinger, Mikael Klingeborn, David J. Klinke, Miroslaw Kornek, Maja M. Kosanović, Árpád Ferenc Kovács, Eva-Maria Krämer-Albers, Susanne Krasemann, Mirja Krause, Igor V. Kurochkin, Gina D. Kusuma, Sören Kuypers, Saara Laitinen, Scott M. Langevin, Lucia R. Languino, Joanne Lannigan, Cecilia Lässer, Louise C. Laurent, Gregory Lavieu, Elisa Lázaro-Ibáñez, Soazig Le Lay, Myung-Shin Lee, Yi Xin Fiona Lee, Debora S. Lemos, Metka Lenassi, Aleksandra Leszczynska, Isaac TS Li, Ke Liao, Sten F. Libregts, Erzsebet Ligeti, Rebecca Lim, Sai Kiang Lim, Aija Linē, Karen Linnemannstöns, Alicia Llorente, Catherine A. Lombard, Magdalena J. Lorenowicz, Ákos M. Lörincz, Jan Lötvall, Jason Lovett, Michelle C. Lowry, Xavier Loyer, Quan Lu, Barbara Lukomska, Taral R. Lunavat, Sybren LN Maas, Harmeet Malhi, Antonio Marcilla, Jacopo Mariani, Javier Mariscal, Elena S. Martens-Uzunova, Lorena Martin-Jaular, M. Carmen Martinez, Vilma Regina Martins, Mathilde Mathieu, Suresh Mathivanan, Marco Maugeri, Lynda K. McGinnis, Mark J. McVey, David G. Meckes, Katie L. Meehan, Inge Mertens, Valentina R. Minciocchi, Andreas Möller, Malene Møller Jørgensen, Aizea Morales-Kastresana, Jess Morhayim, François Mullier, Maurizio Muraca, Luca Musante, Veronika Mussack, Dillon C. Muth, Kathryn H. Myburgh, Tanbir Najrana, Muhammad Nawaz, Irina Nazarenko, Peter Nejsum, Christian Neri, Tommaso Neri, Rienk Nieuwland, Leonardo Nimrichter, John P. Nolan, Esther NM Nolte-'t Hoen, Nicole Noren Hooten, Lorraine O'Driscoll, Tina O'Grady, Ana O'Loghlen, Takahiro Ochiya, Martin Olivier, Alberto Ortiz, Luis A. Ortiz, Xabier Osteikoetxea, Ole Østergaard, Matias Ostrowski, Jaesung Park, D. Michiel Pegtel, Hector Peinado, Francesca Perut, Michael W. Pfaffl, Donald G. Phinney, Bartijn CH Pieters, Ryan C. Pink, David S. Pisetsky, Elke Pogge von Strandmann, Iva Polakovicova, Ivan KH Poon, Bonita H. Powell, Ilaria Prada, Lynn Pulliam, Peter Quesenberry, Annalisa Radeghieri, Robert L. Raffai, Stefania Raimondo, Janusz Rak, Marcel I. Ramirez, Graça Raposo, Morsi S. Rayyan, Neta Regev-Rudzki, Franz L. Ricklefs, Paul D. Robbins, David D. Roberts, Silvia C. Rodrigues, Eva Rohde, Sophie Rome, Kasper MA Rouschop, Aurelia Rughetti, Ashley E. Russell, Paula Saá, Susmita Sahoo, Edison Salas-Huenuleo, Catherine Sánchez, Julie A. Saugstad, Meike J. Saul, Raymond M. Schiffelers, Raphael Schneider, Tine Hiorth Schøyen, Aaron Scott, Eriomina Shahaj, Shivani Sharma, Olga Shatnyeva, Faezeh Shekari, Ganesh Vilas Shelke, Ashok K. Shetty, Kiyotaka Shiba, Pia R. M. Siljander, Andreia M. Silva, Agata Skowronek, Orman L. Snyder, Rodrigo Pedro Soares, Barbara W. Sódar, Carolina Soekmadji, Javier Sotillo, Philip D. Stahl, Willem Stoorvogel, Shannon L. Stott, Erwin F. Strasser, Simon Swift, Hidetoshi Tahara, Muneesh Tewari, Kate Timms, Swasti Tiwari, Rochelle Tixeira, Mercedes Tkach, Wei Seong Toh, Richard Tomasini, Ana Claudia Torrecilhas, Juan Pablo Tosar, Vasilis Toxavidis, Lorena Urbanelli, Pieter Vader, Bas WM van Balkom, Susanne G. van der Grein, Jan Van Deun, Martijn JC van Herwijnen, Kendall Van Keuren-Jensen, Guillaume van Niel, Martin E. van Royen, Andre J. van Wijnen, M. Helena Vasconcelos, Ivan J. Vechetti, Tiago D. Veit, Laura J. Vella, Émilie Velot, Frederik J. Verweij, Beate Vestad, Jose L. Viñas, Tamás Visnovitz, Krisztina V. Vukman, Jessica Wahlgren, Dionysios C. Watson, Marca HM Wauben, Alissa Weaver, Jason P. Webber,

RÉFÉRENCES

Viktoría Weber, Ann M. Wehman, Daniel J. Weiss, Joshua A. Welsh, Sebastian Wendt, Asa M. Wheelock, Zoltán Wiener, Leonie Witte, Joy Wolfram, Angeliki Xagorari, Patricia Xander, Jing Xu, Xiaomei Yan, María Yáñez-Mó, Hang Yin, Yuana Yuana, Valentina Zappulli, Jana Zarubova, Vytautas Žėkas, Jian-ye Zhang, Zezhou Zhao, Lei Zheng, Alexander R. Zheutlin, Antje M. Zickler, Pascale Zimmermann, Angela M. Zivkovic, Davide Zocco, et Ewa K. Zuba-Surma. 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. doi: 10.1080/20013078.2018.1535750.

Thion, Morgane S., Florent Ginhoux, et Sonia Garel. 2018. « Microglia and early brain development: An intimate journey ». *Science* 362(6411):185-89. doi: 10.1126/science.aat0474.

Thompson, Camilla A., Anurag Purushothaman, Vishnu C. Ramani, Israel Vlodavsky, et Ralph D. Sanderson. 2013. « Heparanase Regulates Secretion, Composition, and Function of Tumor Cell-Derived Exosomes *♦ ». *Journal of Biological Chemistry* 288(14):10093-99. doi: 10.1074/jbc.C112.444562.

Todd, Alison C., et Giles E. Hardingham. 2020. « The Regulation of Astrocytic Glutamate Transporters in Health and Neurodegenerative Diseases ». *International Journal of Molecular Sciences* 21(24):9607. doi: 10.3390/ijms21249607.

Todkar, Kiran, Hema S. Ilamathi, et Marc Germain. 2017. « Mitochondria and Lysosomes: Discovering Bonds ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 5:106. doi: 10.3389/fcell.2017.00106.

Tóth, Eszter Á., Lilla Turiák, Tamás Visnovitz, Csaba Cserép, Anett Mázló, Barbara W. Sódar, András I. Försönits, Gábor Petővári, Anna Sebestyén, Zsolt Komlósi, László Drahos, Ágnes Kittel, György Nagy, Attila Bácsi, Ádám Dénes, Yong Song Gho, Katalin É. Szabó-Taylor, et Edit I. Buzás. 2021. « Formation of a protein corona on the surface of extracellular vesicles in blood plasma ». *Journal of Extracellular Vesicles* 10(11):e12140. doi: 10.1002/jev2.12140.

Tóthová, Zuzana, Martina Šemeláková, Zuzana Solárová, Jana Tomc, Nataša Debeljak, et Peter Solár. 2021. « The Role of PI3K/AKT and MAPK Signaling Pathways in Erythropoietin Signalization ». *International Journal of Molecular Sciences* 22(14):7682. doi: 10.3390/ijms22147682.

Trudel, Stéphanie, Eric Trécherel, Cathy Gomila, Maxime Peltier, Michaël Aubignat, Brigitte Gubler, Patrice Morlière, Jean-Michel Heard, et Jérôme Ausseil. 2015. « Oxidative Stress Is Independent of Inflammation in the Neurodegenerative Sanfilippo Syndrome Type B ». *Journal of Neuroscience Research* 93(3):424-32. doi: 10.1002/jnr.23497.

Valstar, Marlies J., Aida M. Bertoli-Avella, Marja W. Wessels, George J. G. Ruijter, Bianca de Graaf, Renske Olmer, Peter Elfferich, Sanne Neijs, Roxana Kariminejad, Fatih Suheyl Ezgü, Aysegül Tokatli, Barbara Czartoryska, Ad N. Bosschaart, Feikje van den Bos-Terpstra, Hugues Puissant, Friederike Bürger, Heymut Omran, D. Eckert, Mirella Filocamo, Emil Simeonov, Patrick J. Willems, Ron A. Wevers, Martinus F. Niermeijer, Dicky J. J. Halley, Ben J. H. M. Poorthuis, et Otto P. van Diggelen. 2010. « Mucopolysaccharidosis Type IIID: 12 New Patients and 15 Novel Mutationsb ». *Human Mutation* 31(5):E1348-60. doi: 10.1002/humu.21234.

Viana, Gustavo M., David A. Priestman, Frances M. Platt, Shaukat Khan, Shunji Tomatsu, et

RÉFÉRENCES

- Alexey V. Pshezhetsky. 2020. « Brain Pathology in Mucopolysaccharidoses (MPS) Patients with Neurological Forms ». *Journal of Clinical Medicine* 9(2):396. doi: 10.3390/jcm9020396.
- Villarroya-Beltri, Carolina, Cristina Gutiérrez-Vázquez, Fátima Sánchez-Cabo, Daniel Pérez-Hernández, Jesús Vázquez, Noa Martín-Cofreces, Dannys Jorge Martínez-Herrera, Alberto Pascual-Montano, María Mittelbrunn, et Francisco Sánchez-Madrid. 2013. « Sumoylated hnRNPA2B1 Controls the Sorting of miRNAs into Exosomes through Binding to Specific Motifs ». *Nature Communications* 4(1):2980. doi: 10.1038/ncomms3980.
- Vitner, Einat B., Frances M. Platt, et Anthony H. Futerman. 2010. « Common and Uncommon Pathogenic Cascades in Lysosomal Storage Diseases ». *The Journal of Biological Chemistry* 285(27):20423-27. doi: 10.1074/jbc.R110.134452.
- Vitry, Sandrine, Jérôme Ausseil, Michael Hocquemiller, Stéphanie Bigou, Renata Dos Santos Coura, et Jean Michel Heard. 2009. « Enhanced Degradation of Synaptophysin by the Proteasome in Mucopolysaccharidosis Type IIIB ». *Molecular and Cellular Neurosciences* 41(1):8-18. doi: 10.1016/j.mcn.2009.01.001.
- Vitry, Sandrine, Julie Bruyère, Michaël Hocquemiller, Stéphanie Bigou, Jérôme Ausseil, Marie-Anne Colle, Marie-Christine Prévost, et Jean Michel Heard. 2010. « Storage Vesicles in Neurons Are Related to Golgi Complex Alterations in Mucopolysaccharidosis IIIB ». *The American Journal of Pathology* 177(6):2984-99. doi: 10.2353/ajpath.2010.100447.
- Vynios, D. H., N. K. Karamanos, et C. P. Tsiganos. 2002. « Advances in Analysis of Glycosaminoglycans: Its Application for the Assessment of Physiological and Pathological States of Connective Tissues ». *Journal of Chromatography B* 781(1-2):21-38. doi: 10.1016/S1570-0232(02)00498-1.
- Wang, Yipeng, Varun Balaji, Senthilvelrajan Kaniyappan, Lars Krüger, Stephan Irsen, Katharina Tepper, RamReddy Chandupatla, Walter Maetzler, Anja Schneider, Eckhard Mandelkow, et Eva-Maria Mandelkow. 2017. « The Release and Trans-Synaptic Transmission of Tau via Exosomes ». *Molecular Neurodegeneration* 12(1):5. doi: 10.1186/s13024-016-0143-y.
- Welsh, Joshua A., Deborah C. I. Goberdhan, Lorraine O'Driscoll, Edit I. Buzas, Cherie Blenkiron, Benedetta Bussolati, Houjian Cai, Dolores Di Vizio, Tom A. P. Driedonks, Uta Erdbrügger, Juan M. Falcon-Perez, Qing-Ling Fu, Andrew F. Hill, Metka Lenassi, Sai Kiang Lim, Mÿ G. Mahoney, Sujata Mohanty, Andreas Möller, Rienk Nieuwland, Takahiro Ochiya, Susmita Sahoo, Ana C. Torrecilhas, Lei Zheng, Andries Zijlstra, Sarah Abuelreich, Reem Bagabas, Paolo Bergese, Esther M. Bridges, Marco Brucale, Dylan Burger, Randy P. Carney, Emanuele Cocucci, Federico Colombo, Rossella Crescitelli, Edveena Hanser, Adrian L. Harris, Norman J. Haughey, An Hendrix, Alexander R. Ivanov, Tijana Jovanovic-Talisman, Nicole A. Kruh-Garcia, Vroniqa Ku'ulei-Lyn Faustino, Diego Kyburz, Cecilia Lässer, Kathleen M. Lennon, Jan Lötval, Adam L. Maddox, Elena S. Martens-Uzunova, Rachel R. Mizenko, Lauren A. Newman, Andrea Ridolfi, Eva Rohde, Tatu Rojalin, Andrew Rowland, Andras Saftics, Ursula S. Sandau, Julie A. Saugstad, Faezeh Shekari, Simon Swift, Dmitry Ter-Ovanesyan, Juan P. Tosar, Zivile Useckaite, Francesco Valle, Zoltan Varga, Edwin van der Pol, Martijn J. C. van Herwijnen, Marca H. M. Wauben, Ann M. Wehman, Sarah Williams, Andrea Zendrini, Alan J. Zimmerman, MISEV Consortium, Clotilde Théry, et Kenneth W. Witwer. 2024. « Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches ». *Journal of Extracellular Vesicles* 13(2):e12404. doi:

RÉFÉRENCES

10.1002/jev2.12404.

Wilkinson, Fiona L., Rebecca J. Holley, Kia J. Langford-Smith, Soumya Badrinath, Aiyin Liao, Alex Langford-Smith, Jonathan D. Cooper, Simon A. Jones, J. Ed Wraith, Rob F. Wynn, Catherine L. R. Merry, et Brian W. Bigger. 2012. « Neuropathology in Mouse Models of Mucopolysaccharidosis Type I, IIIA and IIIB » édité par E. J. Kremer. *PLoS ONE* 7(4):e35787. doi: 10.1371/journal.pone.0035787.

Winchester, Bryan G. 2001. « Lysosomal Membrane Proteins ». *European Journal of Paediatric Neurology* 5:11-19. doi: 10.1053/ejpn.2000.0428.

Winner, Leanne K., Mary-Louise Rogers, Marten F. Snel, et Kim M. Hemsley. 2023. « Biomarkers for Predicting Disease Course in Sanfilippo Syndrome: An Urgent Unmet Need in Childhood-Onset Dementia ». *Journal of Neurochemistry* 166(3):481-96. doi: 10.1111/jnc.15891.

Wolf, P. 1967. « The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma ». *British Journal of Haematology* 13(3):269-88. doi: 10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x.

Woodburn, Samuel C., Justin L. Bollinger, et Eric S. Wohleb. 2021. « The semantics of microglia activation: neuroinflammation, homeostasis, and stress ». *Journal of Neuroinflammation* 18(1):258. doi: 10.1186/s12974-021-02309-6.

Xia, Xiaohuan, Yi Wang, et Jialin C. Zheng. 2022. « Extracellular vesicles, from the pathogenesis to the therapy of neurodegenerative diseases ». *Translational Neurodegeneration* 11(1):53. doi: 10.1186/s40035-022-00330-0.

Yanagishita, M., et V. C. Hascall. 1992. « Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans. » *Journal of Biological Chemistry* 267(14):9451-54. doi: 10.1016/S0021-9258(19)50108-9.

Yang, Chonglin, et Xiaochen Wang. 2021. « Lysosome biogenesis: Regulation and functions ». *Journal of Cell Biology* 220(6):e202102001. doi: 10.1083/jcb.202102001.

You, Yang, Kathleen Borgmann, Venkata Viswanadh Edara, Satomi Stacy, Anuja Ghorpade, et Tsuneya Ikezu. 2020. « Activated Human Astrocyte-derived Extracellular Vesicles Modulate Neuronal Uptake, Differentiation and Firing ». *Journal of Extracellular Vesicles* 9(1):1706801. doi: 10.1080/20013078.2019.1706801.

Zaninello, Marta, et Camilla Bean. 2023. « Highly Specialized Mechanisms for Mitochondrial Transport in Neurons: From Intracellular Mobility to Intercellular Transfer of Mitochondria ». *Biomolecules* 13(6):938. doi: 10.3390/biom13060938.

Zelei, Tamás, Kata Csetneki, Zoltán Vokó, et Csaba Siffel. 2018. « Epidemiology of Sanfilippo syndrome: results of a systematic literature review ». *Orphanet Journal of Rare Diseases* 13:53. doi: 10.1186/s13023-018-0796-4.

Zhang, Xiaoxia, Chengdong Huo, Yating Liu, Ruiliang Su, Yang Zhao, et Yumin Li. 2022. « Mechanism and Disease Association With a Ubiquitin Conjugating E2 Enzyme: UBE2L3 ». *Frontiers in Immunology* 13:793610. doi: 10.3389/fimmu.2022.793610.

Zhang, Xu, Fengshan Wang, et Juzheng Sheng. 2016. « “Coding” and “Decoding”: Hypothesis for the Regulatory Mechanism Involved in Heparan Sulfate Biosynthesis ». *Carbohydrate*

RÉFÉRENCES

Research 428:1-7. doi: 10.1016/j.carres.2016.04.002.

Zhao, Shu, Shiyang Sheng, Yi Wang, Lu Ding, Xiaonan Xu, Xiaohuan Xia, et Jialin C. Zheng. 2021. « Astrocyte-Derived Extracellular Vesicles: A Double-Edged Sword in Central Nervous System Disorders ». *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 125:148-59. doi: 10.1016/j.neubiorev.2021.02.027.

ANNEXES

ANNEXES

ANNEXES

1 ANNEXE 1 : ARTICLE “EXTRACELLULAR VESICLES FROM LPS-TREATED MACROPHAGES AGGRAVATE SMOOTH MUSCLE CELL CALCIFICATION BY PROPAGATING INFLAMMATION AND OXIDATIVE STRESS”

Au cours de ma première année de thèse j’ai eu la chance de pouvoir apporter mes connaissances en matière de caractérisation des EVs au Dr. Linda Yaker qui achevait sa thèse co-dirigée par Pr. Jérôme Ausseil. J’ai réalisé les dernières manipulations de NTA et de TEM nécessaires à la soumission de son article scientifique dont je suis co-auteur. Cet article est intitulé « *Extracellular vesicles from LPS-treated macrophages aggravate smooth muscle cell calcification by propagating inflammation and oxidative stress* » et fut accepté puis publié en Mars 2022 dans le journal *Frontiers in Cell and Developmental Biology*.



Extracellular Vesicles From LPS-Treated Macrophages Aggravate Smooth Muscle Cell Calcification by Propagating Inflammation and Oxidative Stress

Linda Yaker¹, Abdellah Tebani^{2,3}, Céline Lesueur², Chloé Dias⁴, Vincent Jung⁵, Soumeiya Bekri^{2,3}, Ida Chiara Guerrero⁵, Saïd Kamel^{1,6}, Jérôme Ausseil^{4,7†} and Agnès Boullier^{1,6*†}

OPEN ACCESS

Edited by:

Youhua Tan,
 Hong Kong Polytechnic University,
 Hong Kong SAR, China

Reviewed by:

Yvonne Döring,
 Universitätsspital Bern Departement
 Herz und Gefäße Universitätsklinik für
 Angiologie, Switzerland
 Ulrike Resch,
 Medical University of Vienna, Austria

*Correspondence:

Agnès Boullier
 Boullier.agnes@chu-amiens.fr

[†]These authors have contributed
 equally to this work and share last
 authorship

Specialty section:

This article was submitted to
 Molecular and Cellular Pathology,
 a section of the journal
 Frontiers in Cell and Developmental
 Biology

Received: 27 November 2021

Accepted: 09 February 2022

Published: 09 March 2022

Citation:

Yaker L, Tebani A, Lesueur C, Dias C,
 Jung V, Bekri S, Guerrero IC, Kamel S,
 Ausseil J and Boullier A (2022)
 Extracellular Vesicles From LPS-
 Treated Macrophages Aggravate
 Smooth Muscle Cell Calcification by
 Propagating Inflammation and
 Oxidative Stress.
 Front. Cell Dev. Biol. 10:823450.
 doi: 10.3389/fcell.2022.823450

¹MP3CV-UR7517, CURS-University of Picardie Jules Verne, Amiens, France, ²INSERM U1245, CHU Rouen, Normandie University, UNIROUEN, Rouen, France, ³Department of Metabolic Biochemistry, Rouen University Hospital, Rouen, France, ⁴Infinity, INSERM UMR1291, CNRS UMR5051, University of Toulouse III, Toulouse, France, ⁵INSERM US24/CNRS UAR3633, Proteomic Platform Necker, University of Paris—Federative Research Structure Necker, Paris, France, ⁶Laboratory of Biochemistry, CHU Amiens-Picardie, Amiens, France, ⁷Service de Biochimie, Institut Fédératif de Biologie, CHU Toulouse, Toulouse, France

Background: Vascular calcification (VC) is a cardiovascular complication associated with a high mortality rate among patients with diseases such as atherosclerosis and chronic kidney disease. During VC, vascular smooth muscle cells (VSMCs) undergo an osteogenic switch and secrete a heterogeneous population of extracellular vesicles (EVs). Recent studies have shown involvement of EVs in the inflammation and oxidative stress observed in VC. We aimed to decipher the role and mechanism of action of macrophage-derived EVs in the propagation of inflammation and oxidative stress on VSMCs during VC.

Methods: The macrophage murine cell line RAW 264.7 treated with lipopolysaccharide (LPS-EK) was used as a cellular model for inflammatory and oxidative stress. EVs secreted by these macrophages were collected by ultracentrifugation and characterized by transmission electron microscopy, cryo-electron microscopy, nanoparticle tracking analysis, and the analysis of acetylcholinesterase activity, as well as that of CD9 and CD81 protein expression by western blotting. These EVs were added to a murine VSMC cell line (MOVAS-1) under calcifying conditions (4 mM Pi—7 or 14 days) and calcification assessed by the o-cresolphthalein calcium assay. EV protein content was analyzed in a proteomic study and EV cytokine content assessed using an MSD multiplex immunoassay.

Results: LPS-EK significantly decreased macrophage EV biogenesis. A 24-h treatment of VSMCs with these EVs induced both inflammatory and oxidative responses. LPS-EK-treated macrophage-derived EVs were enriched for pro-inflammatory cytokines and CAD, PAI-1, and Saa3 proteins, three molecules involved in inflammation, oxidative stress, and VC. Under calcifying conditions, these EVs significantly increase the calcification of VSMCs by increasing osteogenic markers and decreasing contractile marker expression.

Conclusion: Our results show that EVs derived from LPS-EK-treated-macrophages are able to induce pro-inflammatory and pro-oxidative responses in surrounding cells, such as VSMCs, thus aggravating the VC process.

Keywords: extracellular vesicles, vascular calcification, inflammation, oxidative stress, macrophages

1 INTRODUCTION

Vascular calcification (VC) is a cardiovascular complication found among patients with diseases such as diabetes, atherosclerosis, and chronic kidney disease (CKD) (Lee et al., 2020). VC is an active process (Demer and Tintut, 2008; Voelkl et al., 2019), characterized by an imbalance of calcium/phosphate homeostasis and hydroxyapatite mineral deposition, both in the intimal and medial layers of the artery (Demer and Tintut, 2008; Drüeke and Massy, 2011; Lee et al., 2020). Vascular smooth muscle cells (VSMCs), which represent the most abundant cell type in vessels, play a pivotal role in the initiation and development of VC (Jaminon et al., 2019). VSMCs undergo a phenotypic switch, with modification of osteogenic, contractile, and synthetic marker expression (Durham et al., 2018). Other cell types may be involved in the induction of the VC process, such as macrophages (Li Y. et al., 2020) and endothelial cells. Indeed, macrophages play an important role in the progression of VC by secreting inflammatory factors and inducing oxidative stress (Hénaut et al., 2019). As a consequence, macrophage-induced inflammation can reduce the production of VC inhibitors, such as fetuin-A (Moe and Chen, 2005), a protein that can bind excess mineral and increase their plasma solubility (Komaba and Fukagawa, 2009). Furthermore, an increase in reactive oxygen species (ROS) production is involved in VSMC osteochondrogenic trans-differentiation during the VC process (Tóth et al., 2020; Hu et al., 2021). Recent studies have highlighted the role of extracellular vesicles (EVs) in VC (Hodroge et al., 2017; Mansour et al., 2020; Yaker et al., 2020; Qin et al., 2021). These membrane-bound vesicles, secreted by prokaryotic and eukaryotic cells (Woith et al., 2019), can be of various origins, depending on their mode of biogenesis. For example, exosomes (50–150 nm) originate from endosomes and microvesicles (50–500 nm) generated by budding of the plasma membrane and apoptotic bodies (van Niel et al., 2018). Several studies have showed macrophage-derived EVs to promote VC (New et al., 2013; Chen et al., 2016; Kawakami et al., 2020). Analysis of their content identified a subset of molecules involved in inflammation and oxidative stress, such as pro-inflammatory cytokines (Fitzgerald et al., 2018; Aiello et al., 2020) and oxidant machinery proteins (Bodega et al., 2019). New et al. showed that macrophages can release calcifying EVs enriched for S100A9, a calcium-binding protein involved in mineralization (New et al., 2013). Furthermore, Kawakami et al. recently showed that calcifying EVs released by macrophages contribute to the formation of microcalcification (Kawakami et al., 2020). In addition, Chen et al. demonstrated that the cytokine HMGB1 can induce the secretion of macrophage-derived EVs involved in ectopic mineralization (Chen et al., 2016). Here, we aimed to investigate the role of macrophage-derived EVs in the

propagation of inflammation and oxidative stress during the VC process.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Cell Culture, Molecular, and Biochemical Reagents

Fetal bovine serum (FBS) and glutamine were purchased from Eurobio® (Les Ulis, France). Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* K12 (LPS-EK) was obtained from InvivoGen® (San Diego, California, United States) and inorganic phosphate (Pi) from Merck® (Darmstadt, Germany). Exosome-free FBS, TRIzol™ Reagent, RNase/DNase-free water, High-Capacity RNA-to-cDNA™ kits, BCA™ Protein Assay kits, and dihydroethidium (DHE) were purchased from Thermo Fisher Scientific® (Waltham, Massachusetts, United States). Takyon™ was obtained from Eurogentec® (Liège, Belgium). 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) was purchased from Molecular Probes® (Eugene, Oregon, United States). All other molecular and biochemical reagents were obtained from Sigma-Aldrich® (Saint-Louis, Missouri, United States).

2.2 Culture and Treatment of Cells

2.2.1 Murine Macrophage Culture

Murine macrophages (RAW 264.7 ATCC® TIB-71™, Manassas, Virginia, United States) were maintained in DMEM 6546 medium supplemented with 10% FBS, 4 mM glutamine, 100 UI/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. We first assessed RAW cell viability in the presence of 0.1 and 1 µg/ml LPS-EK, concentrations that are generally used to activated RAW macrophages (Pi et al., 2014). A 24-h treatment with LPS-EK induced 25% cell cytotoxicity (data not shown). RAW cells are known to be particularly sensitive to LPS, which could explain the cell growth inhibition observed in our experiment (Raschke et al., 1978). We then tested the treatment of RAW cells for only 6 h with LPS-EK and detected no cell cytotoxicity (**Supplementary Figure S1**). We thus used these experimental conditions for all further experiments.

2.2.1 Murine Aortic Vascular Smooth Muscle Cell Culture

Murine aortic VSMCs (MOVAS-1 ATCC® CRL-2797™, Manassas, Virginia, United States) were maintained in DMEM 6546 medium supplemented with 10% FBS, 4 mM glutamine, 100 UI/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 200 µg/ml geneticin® (G418) at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. To induce VSMC calcification, cells were treated in DMEM 6546 containing 1% FBS with 4 mM Pi for 14 days. The

media was changed twice a week. For each experiment, VSMCs were treated with macrophage-derived EVs isolated from the same volume of cell-culture medium.

2.3 Extracellular Vesicle Preparation and Characterization

2.3.1 Isolation of Extracellular Vesicles

Macrophages were seeded in 10-cm petri plates at a density of 30,000 cells/cm² and cultured in DMEM 6546 medium supplemented with 10% FBS. After 48 h, cells were washed with PBS then treated with various concentrations of LPS-EK in DMEM 6546 medium supplemented with 10% exosome-free FBS for 6 h. Cell debris was removed from cell-culture supernatants by centrifugation at 800 × g for 5 min at 4°C.

EVs were isolated from cell-culture supernatants of untreated (EV-CT) or LPS-EK treated (EV-LPS) macrophages by sequential centrifugation, as described previously by Chen et al. (2008). Briefly, supernatants were first ultracentrifuged at 100,000 × g for 50 min at 4°C. The pellet was then resuspended in cold Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS) and centrifuged at 100,000 × g for another 50 min at 4°C. The final pellet was resuspended in D-PBS or RIPA buffer and the protein concentration determined using the BCA™ Protein Assay kit. EV samples were stored at -80°C for future analysis.

2.3.2 Characterization of Extracellular Vesicles

2.3.2.1 Transmission Electron Microscopy

EVs were isolated as described previously and resuspended in 50 µL Tris base buffer (100 mM, pH 7.4). EV samples were prepared for TEM using the conventional negative staining procedure. Briefly, 10 µL EV samples were absorbed for 2 min on formvar-carbon-coated copper grids preliminarily ionized using the PELCO easiGlow™ Glow Discharge Cleaning System (Ted Pella Inc., Redding, California, United States). Preparations were then blotted and negatively stained with 1% uranyl acetate for 1 min. Grids were examined using an 80 kV JEM-1400 electron microscope (JEOL Inc., Peabody, Massachusetts, United States) and images acquired with a digital camera (Gatan Orius, Gatan Inc., Pleasanton, California, United States).

2.3.2.2 Cryo-Electron Microscopy

To analyze the morphology of EVs by cryo-EM, 3 µL of EV sample was first deposited onto a glow-discharged 200-mesh lacey carbon grid. Prior to freezing, the grid was loaded into the thermostatic chamber of a Leica EM-GP automatic plunge Freezer, set to 20°C and 95% humidity. Excess solution was blotted from the grid for 1–2 s with a Whatman n°1 filter paper and the grid immediately flash frozen in liquid ethane cooled to -185°C. Specimens were then transferred into a Gatan 626 cryo-holder. Cryo EM was carried out using a Jeol 2,100 microscope equipped with a LaB6 cathode operating at 200 kV under low-dose conditions. Images were acquired using SerialEM software (Mastrorarde, 2005), with the defocus ranging from 600 to 1,000 nm, using a Gatan US4000 CCD camera. This device was placed at the end of a GIF quantum energy filter (Gatan Inc. Berwyn, Pennsylvania, United States)

operating in zero-energy-loss mode, with a slit width of 25 eV. Images were recorded at a magnification corresponding to a calibrated pixel size of 0.87 Å.

2.3.2.3 Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

EVs were resuspended in 50 µL D-PBS. Particle-size distribution and concentration were analyzed using a NanoSight LM10-HS instrument (Malvern Instruments Ltd., Malvern, United Kingdom) according to the manufacturer's instructions. Briefly, EV samples were diluted 100-fold in D-PBS and the diluted preparation injected into the chamber. Samples were analyzed at room temperature for 60 s. Three replicates were performed for each sample. Data were acquired and analyzed using NTA 2.2 Build 127 software (Malvern Instruments Ltd., Malvern, United Kingdom).

2.3.2.4 Specific Extracellular Vesicle Markers

EVs were characterized by analyzing tetraspanin (CD81, CD9) and β-actin protein expression by western blotting as recommended by the International Society for Extracellular Vesicles (ISEV) (Théry et al., 2018).

2.3.2.5 Measurement of Acetylcholinesterase Activity

Acetylcholinesterase activity was measured using a colorimetric assay as previously described by Ellman et al. (1961). Briefly, 200 µL D-PBS containing 1 mM acetylcholine and 0.1 mM 5, 5'-Dithiobis 2-nitrobenzoic acid (DNTB) was added to 100 µL EV sample. After a 15 min incubation at room temperature, the absorbance was read at 450 nm using an Envision microplate reader. Data are expressed as the percentage difference in absorbance compared to the control (assay diluent D-PBS).

2.4 Biochemical Assays

2.4.1 Cell Viability Assay

Cell viability was assessed using the WST-1 assay. Cells were seeded in 96-well plates at a density of 7,500 cells/well. After 48 h, cells were treated with LPS-EK or macrophage-derived EVs for 6 or 24 h, respectively. Ten percent dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as a positive control for viability loss. The medium was then changed and the cells incubated in 100 µL DMEM 6546 medium containing 10 µL WST-1 reagent for 1 h at 37°C. Absorbance was measured at 450 nm using an Envision microplate reader (Perkin Elmer®, Waltham, Massachusetts, United States).

2.4.2 Calcification Assay

VSMC calcification was assessed by measuring the intracellular calcium concentration using the o-cresolphthalein assay as previously described (Ray Sarkar and Chauhan, 1967). The total cell protein concentration was assessed by the method of Peterson (Peterson, 1977) and used to normalize the intracellular calcium concentration.

2.4.3 Measurement of Oxidative Stress (ROS, O₂•⁻, and NO Production)

The three fluorescent probes DCFH-DA, DHE, and DAF were used to measure ROS, O₂•⁻, and NO production, respectively. Macrophages were seeded in white 96-well plates at a density of

7,500 cells/well. After 48 h, cells were washed twice with D-PBS and incubated at 37°C with 10 µM DCFH-DA for 30 min and then 10 µM DHE or 0.1 µM DAF for 1 h. Next, cells were washed twice with D-PBS and treated with LPS-EK or macrophage-derived EVs. Hydrogen peroxide (H₂O₂) at 50 and 500 µM was used as a positive control of ROS production. For certain experiments, the antioxidants N-acetyl-L-cysteine (NAC, 10 mM) and α-tocopherol (vitamin E, 10 µg/ml) were added to each well 1 h prior to treatment. For NO production, the iNOS substrate L-arginine was added to each well at 50 µM. All solutions were prepared in Krebs-Ringer-phosphate buffer (KRP). Fluorescence was measured using an Envision microplate reader (λ_{Ex} 492 nm, λ_{Em} 535 nm for DCFH-DA and DAF; λ_{Ex} 492 nm, λ_{Em} 615 nm for DHE).

2.4.4 Western Blot Analysis

After treatment, cells were washed twice with cold D-PBS and lysed with RIPA buffer, sonicated, and centrifuged (16,000 × g, 5 min, 4°C). Supernatants were collected in a new tube and the protein concentration determined using the BCA™ Protein Assay kit according to the manufacturer's instructions. Proteins were precipitated with methanol/chloroform (1/0.25; v/v) and centrifuged for 5 min at 16,000 × g at room temperature. The pellet was then resuspended in 4X Laemmli buffer and heated to 99°C for 5 min. Fifty µg of each protein sample was separated on a 12% SDS-PAGE gel and transferred onto a nitrocellulose membrane. After blocking, membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibodies: rabbit anti-CD9 polyclonal antibody (1/1,000, GeneTex® GTX55564), goat anti-CD81 polyclonal antibody (1/1,000, Santa Cruz Biotechnology, Inc.® sc-31234), mouse monoclonal anti-β-actin antibody (1/5,000, Sigma-Aldrich® A1978, clone AC-15), rabbit anti-SMPD3 (1/10,000, Sigma-Aldrich® SAB2102245), or rabbit anti-p62/SQSTM1 (1/1,000, Sigma-Aldrich® P0067). After several washes, membranes were incubated with goat anti-rabbit IgG-HRP (1/5,000, Santa Cruz Biotechnology, Inc.® sc-2004), goat anti-mouse IgG-HRP (1/5,000, Santa Cruz Biotechnology, Inc.®, sc-2005), or rabbit anti-goat IgG (H + L)-HRP (1/5,000, Southern Biotech®, 6,160-05) for 1 h at room temperature. Then, proteins were visualized using ECL™ Western Blot Detection Reagents and a ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad®, Hercules, California, United States). β-actin protein levels were quantified to normalize protein levels.

2.5 RNA Extraction and Quantitative Real-Time PCR

After treatment, cells were washed twice with D-PBS. RNA extraction was then performed using a mixture of TRIzol™ and chloroform (1/0.2; v/v). After a 15-min centrifugation (12,000 × g, 4°C), RNA was collected and precipitated with isopropanol. The RNA pellet was then washed twice with 70% ethanol and resuspended in 40 µL RNase/DNase-free water. The RNA concentration was determined using a NanoVue™ Plus device (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, Massachusetts, United States). cDNA was synthesized using a High-Capacity RNA-to-cDNA™ kit according to

the manufacturer's instructions. Quantitative real-time PCR was carried out using Takyon™ and specific primers (Supplementary Table S1). A CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad®, Hercules, California, United States) was used with the following steps: 95°C for 15 s, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 1 min and 72°C for 30 s. β-actin was used as a housekeeping gene to normalize gene expression.

2.6 MSD Multiplex Immunoassay

Proinflammatory cytokine protein levels were measured in macrophages and EVs derived from macrophages using a proinflammatory panel multiplex kit (V-PLEX® K15048D, Meso Scale Diagnostics®, Rockville, Maryland, United States) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 50 µL/well of sample or calibrators was added to a 96-well plate pre-coated with capture antibodies. After a 2-h incubation with shaking at room temperature and three washes (D-PBS with 0.05% Tween 20), 25 µL 1X detection antibody solution was added to each well. After another 2-h incubation under the same conditions and three washes, 150 µL 2X Read Buffer T was added to each well. The plate was then analyzed using the MSD instrument (Meso Scale Diagnostics®, Rockville, Maryland, United States).

2.7 Mass Spectrometry Proteomic Analysis

2.7.1 Proteomic Digestion for Mass Spectrometry

An S-Trap™ microspin column digestion was performed on 10 µg of macrophage-derived EVs according to the manufacturer's instructions (Protifi, Hutington, United States). Briefly, samples were reduced with 20 mM tris (2-carboxyethyl) phosphine and then alkylated with 50 mM chloroacetamide for 15 min at room temperature. Aqueous phosphoric acid was then added to a final concentration of 1.2%, followed by the addition of S-Trap binding buffer (90% aqueous methanol, 100 mM tetraethylammonium bromide, pH 7.1). The mixtures were then loaded onto S-Trap columns. Two extra washing steps were performed to eliminate SDS. Samples were then digested with 1 µg trypsin (Promega, Madison, Wisconsin, United States) at 47°C for 1 h. After elution, peptides were vacuum dried and resuspended in 45 µL 2% acetonitrile/0.1% formic acid mixture in HPLC-grade water prior to MS analysis. A volume of 1 µL of the peptide suspension was injected into a nanoelute high-performance liquid chromatography (HPLC) system coupled to a timsTOF Pro mass spectrometer (Bruker Daltonics, Germany). HPLC separation was performed using a mixture of 0.1% formic acid in water, 2% acetonitrile (Solvent A), and 0.1% formic acid in acetonitrile (Solvent B) at 250 nL/min using a packed emitter column (C18, 25 cm × 75 µm 1.6 µm) (Ion Optics, Australia) with a gradient elution (2–11% solvent B over 19 min, 11–16% over 7 min, 16–25% over 4 min, 25–80% over 3 min, and, finally, 80% for 7 min to wash the column). Mass-spectrometric data were acquired using the parallel accumulation serial fragmentation (PASEF) acquisition method. The measurements were carried out over an m/z range from 100 to 1700 Th, with ion mobility from 0.8 to 1.3 V s/cm² (1/k0). The total cycle time was set to 1.2 s and the number of PASEF MS/MS scans was set to 10. A total of 2,762 proteins was identified in at least 60% of all samples.

The mass spectrometry proteomics data have been deposited in the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE (Perez-Riverol et al., 2019) partner repository with the dataset identifier PXD029441 and 10.6019/PXD029441.

2.7.2 Data Analysis

The data were analyzed using MaxQuant version 1.6.14.0 (Max-Planck, Munich, Germany) and searched using the Andromeda search engine against the UniProtKB/Swiss-Prot *Mus musculus* database (release 02-04-2020, 17040 entries). Mass deviations of 3 and 20 ppm were used to search parent mass and fragment ions, respectively. The minimum peptide length was set to seven amino acids and strict specificity for trypsin cleavage was required, allowing up to two missed cleavage sites. Carbamidomethylation (Cys) was set as a fixed modification, whereas oxidation (Met) and N-term acetylation were set as variable modifications. The false discovery rate (FDR) for both proteins and peptides was set to 1%. Scores were calculated in MaxQuant as previously described (Cox and Mann, 2008). The reverse and common contaminant hits were removed from the MaxQuant output. Proteins were quantified according to the MaxQuant label-free algorithm using LFQ intensities; protein quantification was obtained using at least two peptides per protein. Matches between runs were allowed. Statistical and bioinformatic analysis, including heatmaps, profile plots, and clustering, were performed using Perseus software (version 1.6.14.0) freely available at www.perseus-framework.org (Tyanova et al., 2016). For statistical comparisons, we set up five groups, each containing up to five biological replicates. We then filtered the data to keep only proteins with at least four valid values in at least one group. Next, the data were imputed to fill missing data points by creating a Gaussian distribution of random numbers with a standard deviation of 33% relative to the standard deviation of the measured values and a 1.8 standard deviation downshift of the mean to simulate the distribution of low-signal values. We performed an ANOVA test, FDR < 0.05, S0 = 0.5. Hierarchical clustering of proteins that survived the test was performed using Perseus on log-transformed LFQ intensities after z-score normalization of the data using Euclidean distances.

2.8 Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism (version 7.0, San Diego, California, United States). Wilcoxon-Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were performed with a significance threshold of 0.05. Data are expressed as the mean \pm standard error of mean (SEM) from at least three independent experiments.

Principal Component Analysis has been performed on log transformed and scaled values from targeted MSD multiplex immunoassay using the R package pcaMethods.

3 RESULTS

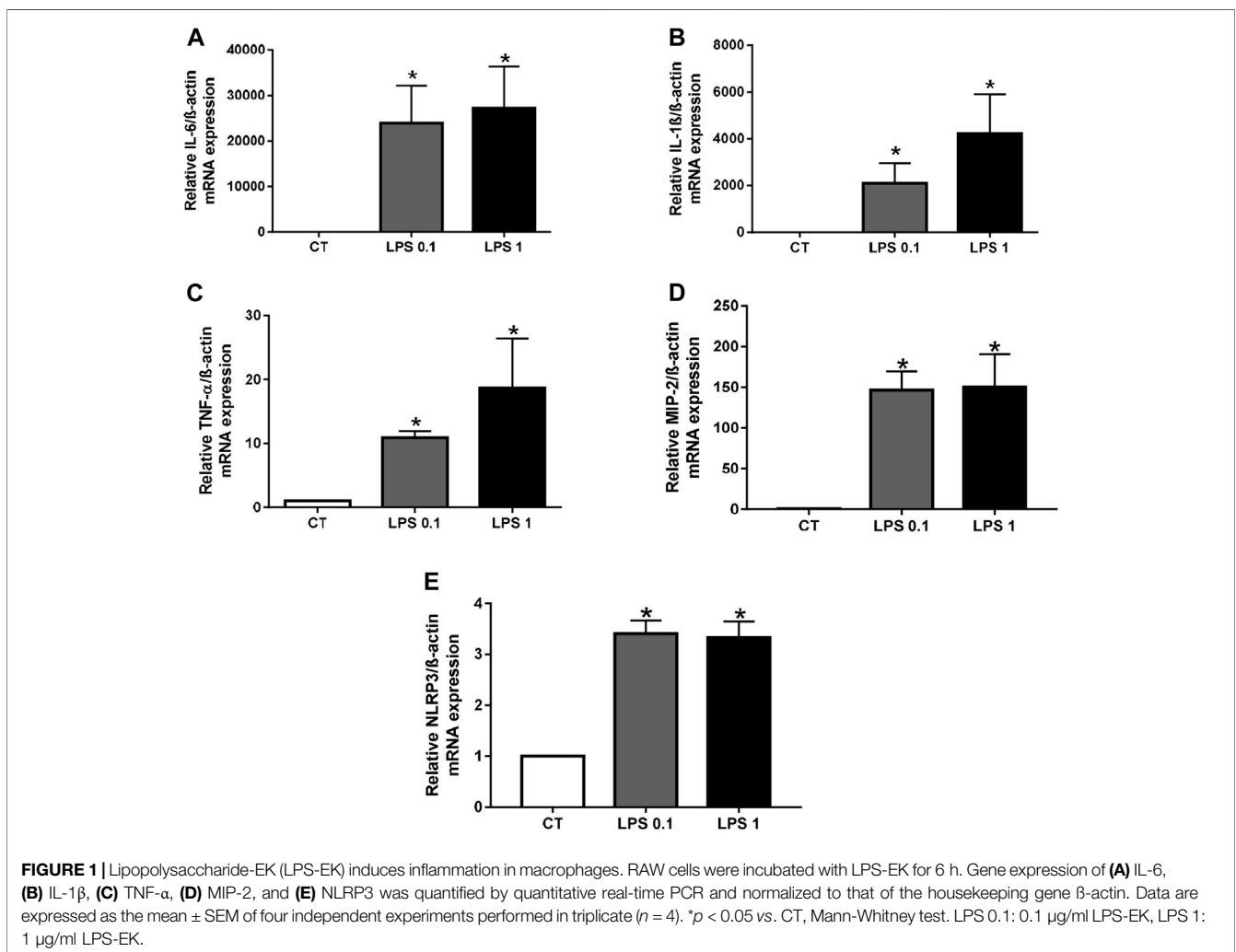
3.1 Effects of LPS-EK on Macrophages

3.1.1 Lipopolysaccharide From *Escherichia coli* K12 Induces Inflammation in Macrophages

In setting up our cellular model of inflammation, we first verified the effect of LPS-EK on inflammation in RAW macrophages by measuring the mRNA levels of various pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-1 β , TNF- α , and MIP-2), as well as that of the NLRP3 inflammasome marker, before and after treatment. The mRNA levels of these markers were all significantly higher after LPS-EK treatment than those of unstimulated macrophages (CT) ($*p < 0.05$ vs. CT, **Figure 1**). We also analyzed the levels of 10 proinflammatory cytokines in LPS-EK-treated or untreated macrophages using an MSD multiplex kit. Macrophages treated with LPS-EK showed significantly higher levels of these proinflammatory cytokines than untreated control cells ($*p < 0.05$ vs. CT, **Supplementary Figure S2**). These results show that LPS-EK induces an inflammatory response in our cellular model.

3.1.2 Lipopolysaccharide From *Escherichia coli* K12 Induces Oxidative Stress in Macrophages

As oxidative stress is also involved in the calcification process, we next determined the effect of LPS on reactive oxygen species (ROS) production using the fluorescent probe DCFH-DA. ROS production by cells treated with LPS-EK was significantly higher than that of untreated cells ($*p < 0.05$ vs. CT) (**Figure 2A**). In addition, mRNA levels of two components of the antioxidant system, Keap1 and Nrf2, were lower after LPS-EK treatment, which could partially explain the increase in oxidative stress ($*p < 0.05$ vs. CT, **Figures 2E,F**). Among the various ROS, superoxide anions ($O_2^{\bullet-}$) play an important role in oxidative stress. We therefore investigated the effect of LPS-EK on $O_2^{\bullet-}$ production using the fluorescent probe DHE. Surprisingly, $O_2^{\bullet-}$ production was significantly lower in LPS-EK treated cells than in untreated cells ($*p < 0.05$ vs. CT, **Figure 2B**). We investigated this seeming discrepancy by measuring the mRNA levels for both Nox-2, the enzyme that synthesizes $O_2^{\bullet-}$, and superoxide dismutase (SOD-2), which is responsible for $O_2^{\bullet-}$ degradation. We observed significantly higher Nox-2 and lower SOD-2 mRNA levels in LPS-EK stimulated macrophages than in untreated macrophages ($*p < 0.05$ vs. CT, **Figures 2C,D**). Our results thus show that LPS-EK decreases superoxide anion production by decreasing Nox-2 expression and increasing SOD-2 expression. Superoxide anions can rapidly react with nitric oxide (NO) to form peroxynitrite (ONOO $^-$). Thus, we next investigated the effect of LPS-EK on NO production using the fluorescent probe DAF. NO production was significantly lower after LPS-EK treatment than in untreated cells ($p < 0.05$ vs. CT, **Figure 2G**), despite significantly higher levels of iNOS ($*p < 0.05$ vs. CT, **Figure 2H**). These results suggest that both decreases in NO and $O_2^{\bullet-}$ production may be partially explained by the formation of peroxynitrite.



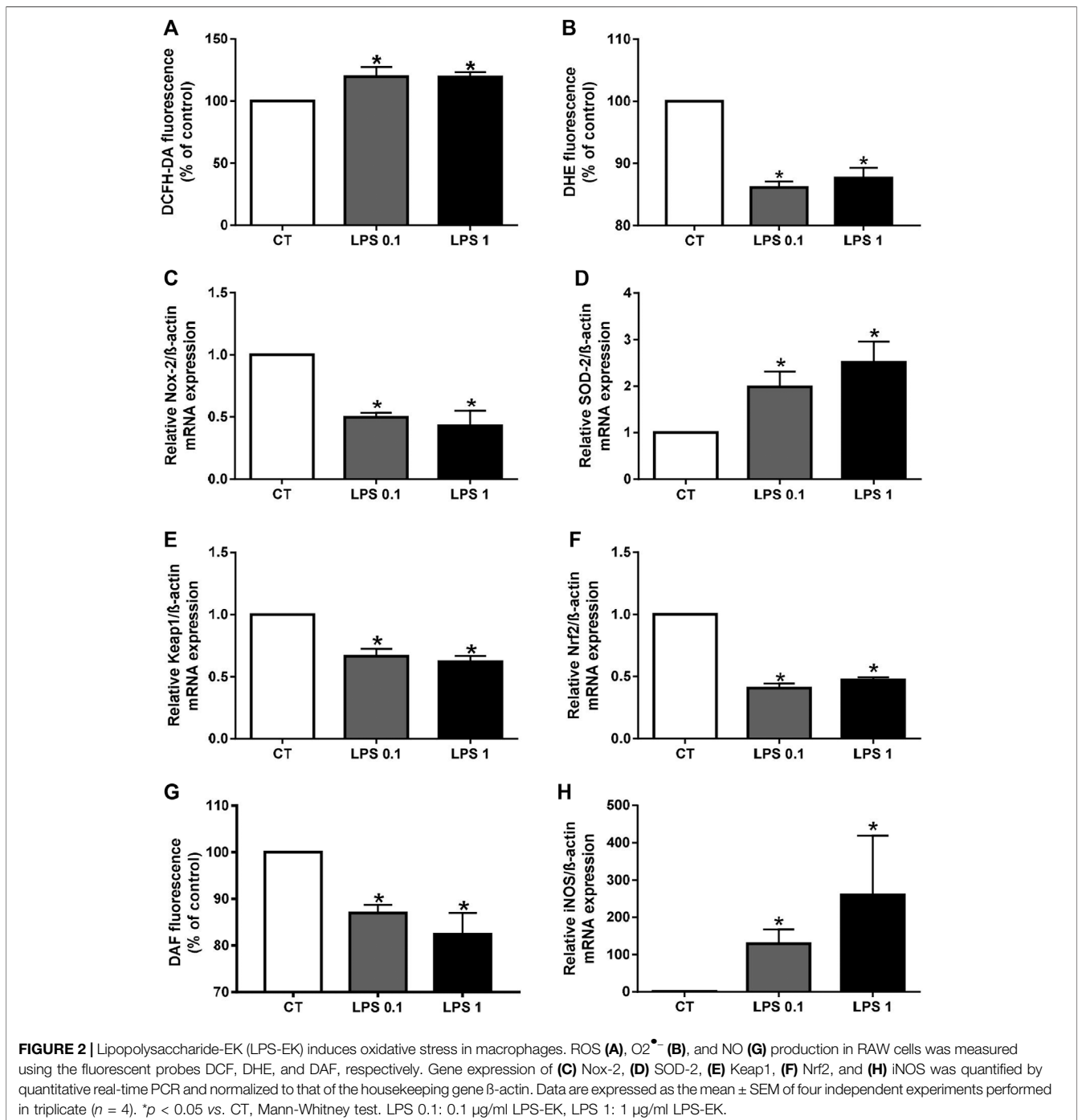
3.1.3 Lipopolysaccharide From *Escherichia coli* K12 Decreases Extracellular Vesicle Biogenesis in Macrophages

The aim of this study was to determine whether EVs can propagate inflammation and oxidative stress to recipient cells. Thus, we first studied EV biogenesis in RAW cells after LPS-EK treatment by analyzing the mRNA levels of various EV biogenesis markers (phospho-1, TNAP, and SMPD3) in LPS-EK-treated macrophages. The mRNA levels of these markers were all significantly lower in LPS-EK-treated cells than in unstimulated macrophages (* $p < 0.05$ vs. CT, **Figures 3A–C**), suggesting a decrease in EV biogenesis. SMPD3 protein levels were also significantly lower after 1 μ g/ml LPS-EK treatment than in untreated macrophages (* $p < 0.05$ vs. CT, **Figure 3D**).

3.1.4 Lipopolysaccharide From *Escherichia coli* K12 Decreases Autophagy in Macrophages

Recent studies have highlighted novel functions of autophagy in the biogenesis and secretion of EVs (Yang et al., 2021).

Indeed, it has been shown that not only exosome biogenesis and autophagy share molecular machinery but also that substantial crosstalk exists between these two processes. We therefore analyzed the effect of LPS-EK on autophagy markers, such as ULK1, Beclin-1, Atg5, LC3a, and LC3b. The mRNA levels of all these markers were significantly lower after LPS-EK treatment than in unstimulated macrophages (* $p < 0.05$ vs. CT, **Figures 4A–E**), suggesting a decrease in the autophagy process. p62, also known as sequestome-1 (SQSTM), is an autophagy cargo receptor (Lamark et al., 2009) that can be used as a sensor of autophagic flux. Indeed, p62 accumulates when autophagy is inhibited and decreased levels of p62 can be observed when autophagy is induced. After LPS-EK treatment, p62 mRNA levels were higher than in unstimulated macrophages (* $p < 0.05$ vs. CT, **Figure 4F**), confirming inhibition of the autophagic flux. p62 protein levels were not modified after LPS-EK treatment relative to untreated cells (**Figure 4G**). Overall, our results show that LPS-EK not only induces inflammation and oxidative stress



in RAW cells but also decreases autophagy and EV biogenesis.

3.2 Effects of EV-LPS on Smooth Muscle Cells

3.2.1 Characterization of Macrophage-Derived EVs

We characterized macrophage-derived EVs by their morphology, size, and concentration (Figure 5) using transmission electron

microscopy (TEM) (Figure 5A), cryo-electron microscopy (cryo-EM) (Figure 5B), and nanoparticle-tracking analyses (NTA) (Figure 5C). The particle size for exosomes is between 50 and 150 nm and between 50 and 500 nm for microvesicles (van Niel et al., 2018). The average particle size detected by NTA was 139 nm for EVs isolated from untreated macrophages (EV-CT) and 130 nm for EVs isolated from LPS-EK-treated macrophages (EV-LPS) (Figure 5C). Thus, our EV samples were likely enriched for both exosomes and microvesicles. Furthermore,

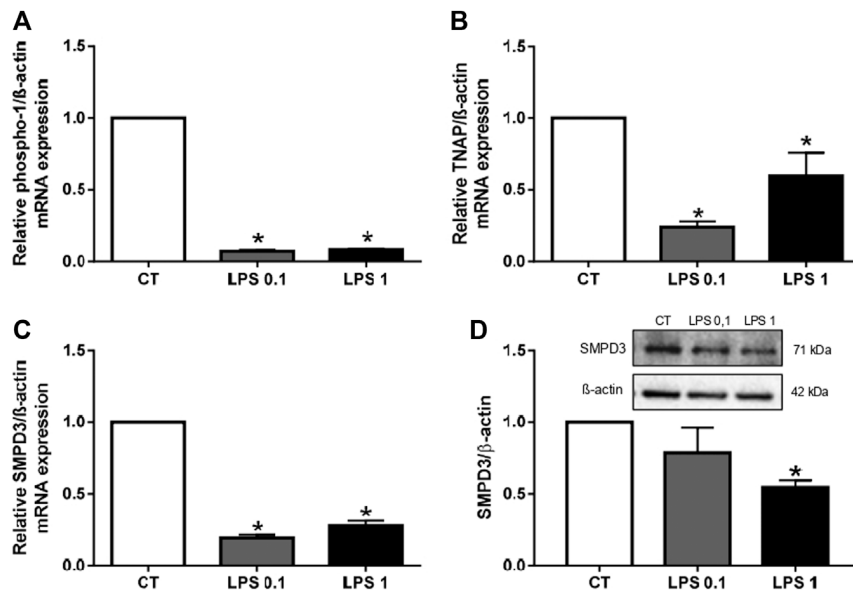


FIGURE 3 | Lipopolysaccharide-EK (LPS-EK) decreases EV biogenesis in macrophages. RAW cells were incubated with LPS-EK for 6 h. Gene expression of EV of the biogenesis markers **(A)** phospho-1, **(B)** TNAP, and **(C)** SMPD3 was then quantified by RT-qPCR and normalized to that of the housekeeping gene β -actin. **(D)** SMPD3 protein expression was studied by western blotting and normalized to that of the housekeeping gene β -actin. Data are expressed as the mean \pm SEM of four independent experiments performed in triplicate ($n = 4$). * $p < 0.05$ vs. CT, Mann-Whitney test. LPS 0.1: 0.1 μ g/ml LPS-EK, LPS 1: 1 μ g/ml LPS-EK.

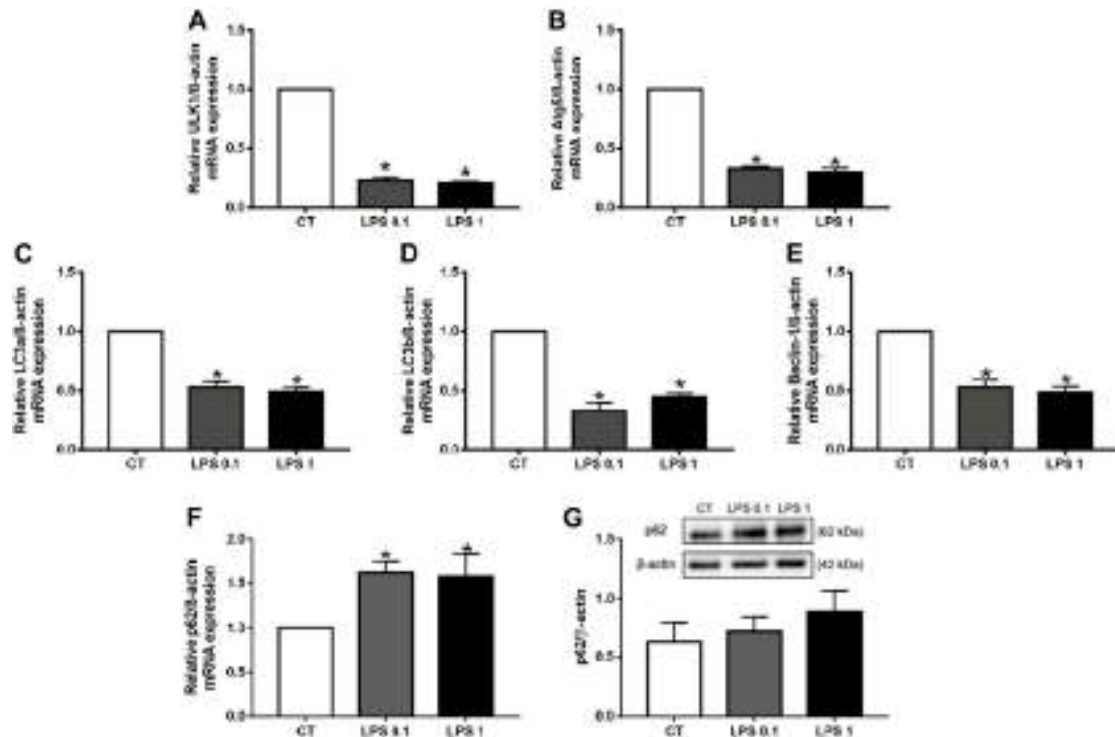
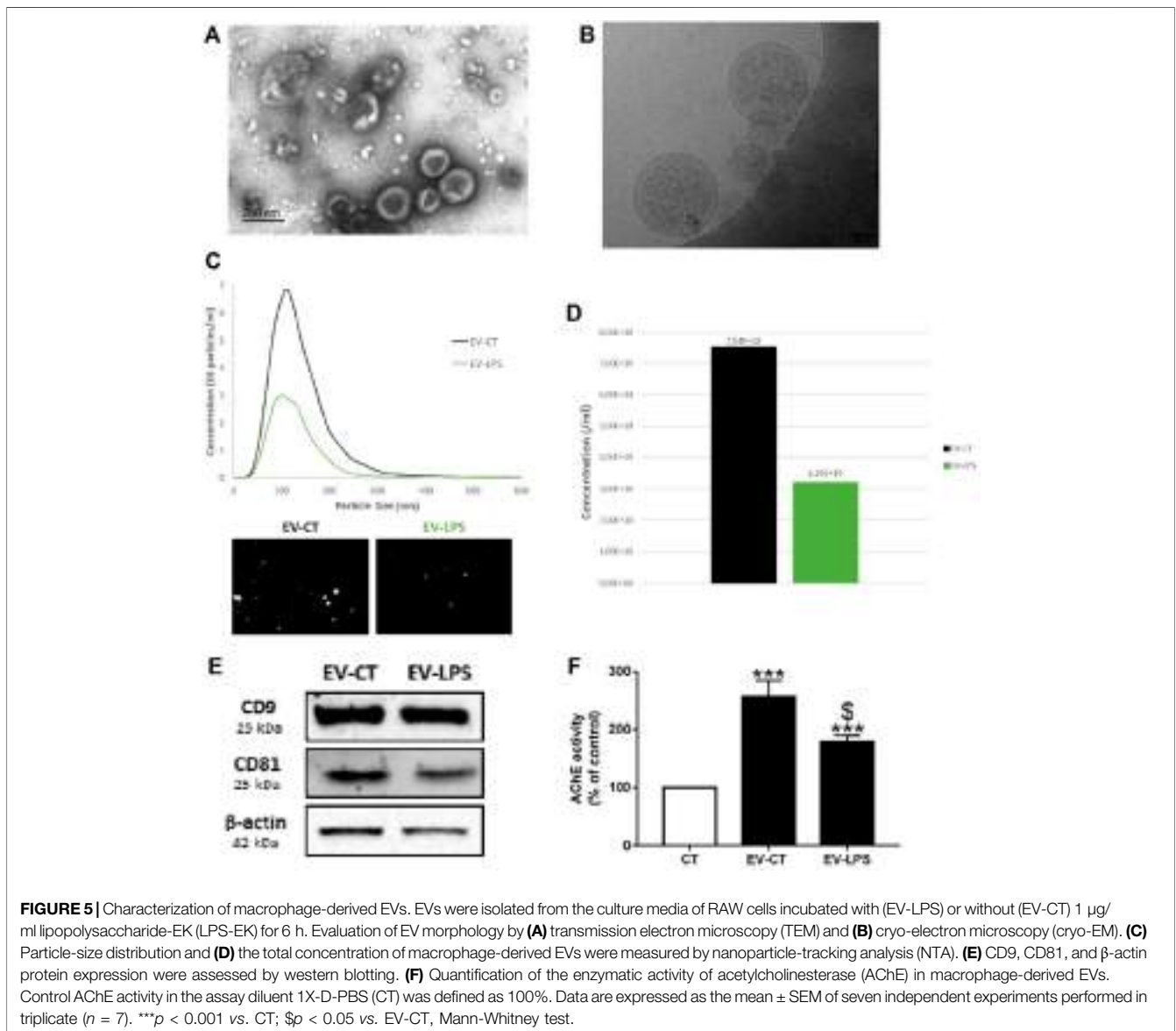


FIGURE 4 | Lipopolysaccharide-EK (LPS-EK) decreases autophagy in macrophages. RAW cells were incubated with LPS-EK for 6 h. Gene expression of the autophagy markers **(A)** ULK1, **(B)** Atg5, **(C)** LC3a, **(D)** LC3b, **(E)** Beclin-1, and **(F)** p62 was then quantified by RT-qPCR and normalized to that of the housekeeping gene β -actin. **(G)** p62 protein expression was studied by western blotting and normalized to that of the housekeeping gene β -actin. Data are expressed as the mean \pm SEM of four independent experiments performed in triplicate ($n = 4$). * $p < 0.05$ vs. CT, Mann-Whitney test. LPS 0.1: 0.1 μ g/ml LPS-EK, LPS 1: 1 μ g/ml LPS-EK.

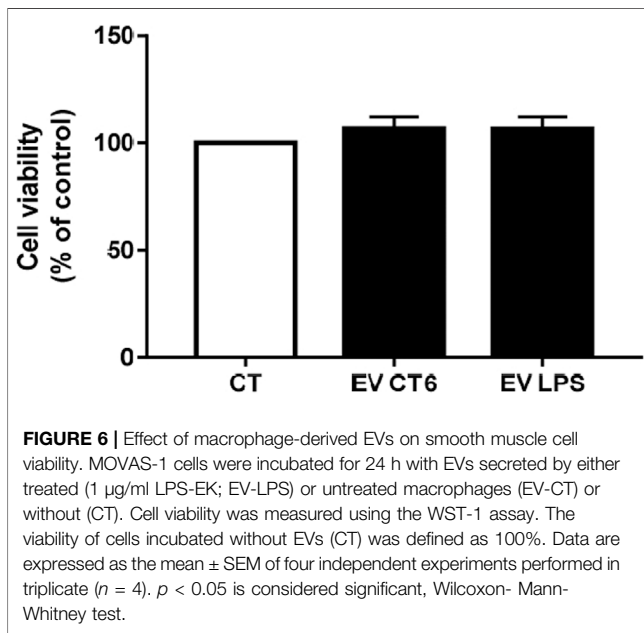


we verified EV membrane integrity by cryo-EM (Figure 5B). Indeed, we could observe a discernible lipid bilayer and internal vesicular structures (Figure 5B). The diameter of EVs can vary, as well as the content. The International Society for Extracellular Vesicles (ISEV) has published recommendations for EV characterization (Théry et al., 2018). Indeed, two categories of markers must be analyzed in sample preparations to confirm the presence of EVs: transmembrane proteins, such as tetraspanins, and cytosolic proteins recovered in EVs (Théry et al., 2018). Thus, we performed western blotting to determine the presence of EV-specific tetraspanin (CD9, CD81) and β -actin and detected all of these EV markers in our EV samples (Figure 5E). Acetylcholinesterase (AChE) is expressed in macrophages (Fujii et al., 2017) and can also be found in macrophage-derived EVs. According to the ISEV, AChE activity can also be used to characterize EVs (Figure 5F). Overall, these results confirm the

presence of EVs in both preparations. LPS-EK treatment of macrophages resulted in a lower number of EVs than in control untreated cells (Figure 5D). Indeed, we detected 7.54×10^{10} particles in the EV-CT sample, whereas the EV-LPS preparation contained 3.20×10^{10} particles. Furthermore, we observed significantly less AChE in the EV-LPS preparation than in the EV-CT preparation. Both results could be explained by the lower amount of secreted EVs due to decreased EV biogenesis after LPS-EK treatment ($\$p < 0.05$ vs. EV-CT, Figure 5F). Importantly, the EVs were isolated from the same volume of cell-culture media.

3.2.2 Effect of Macrophage-Derived EVs on MOVAS Cell Viability

We next studied the effects of macrophage-derived EVs on the smooth muscle cell line MOVAS-1. Cell viability was first assessed after 24 h of treatment with macrophage-derived EVs. EVs secreted



by macrophages did not affect smooth muscle cell viability relative to untreated cells (CT), regardless of the treatment (Figure 6).

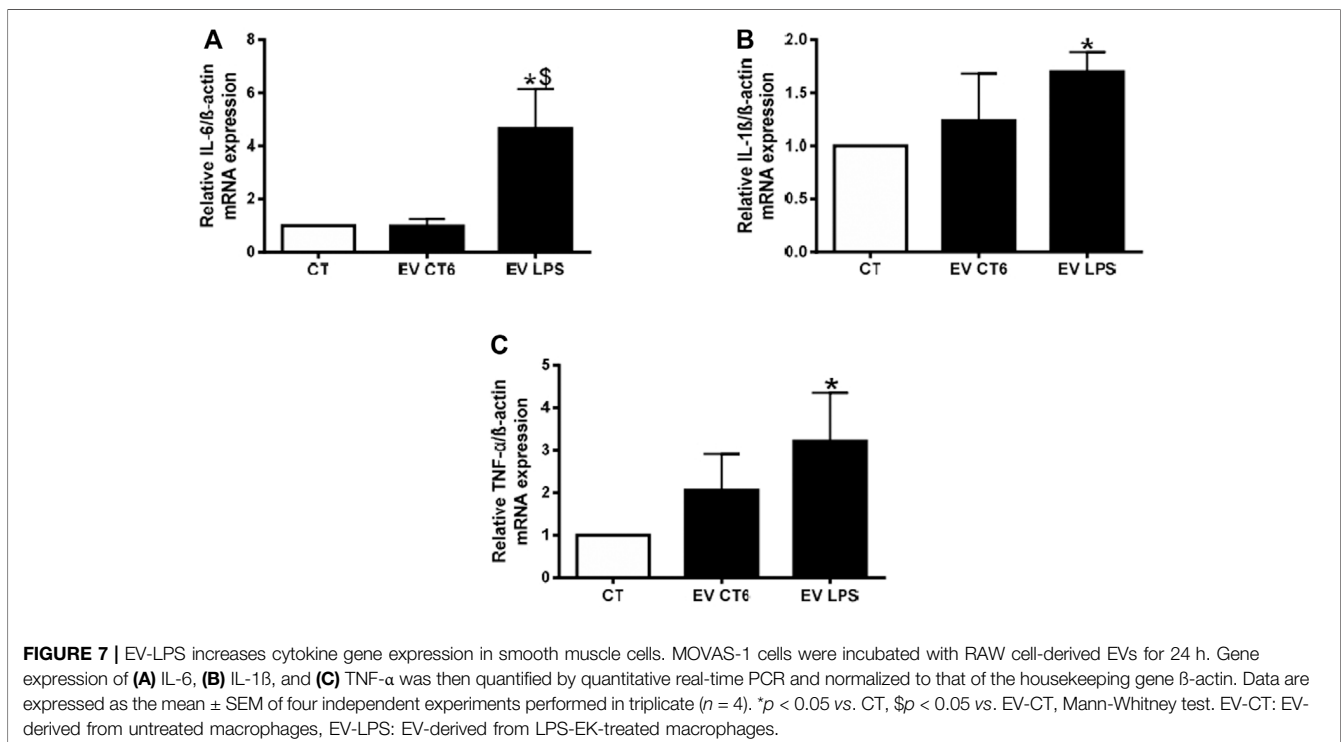
3.2.3 EV-LPS Induce Inflammation in Smooth Muscle Cells

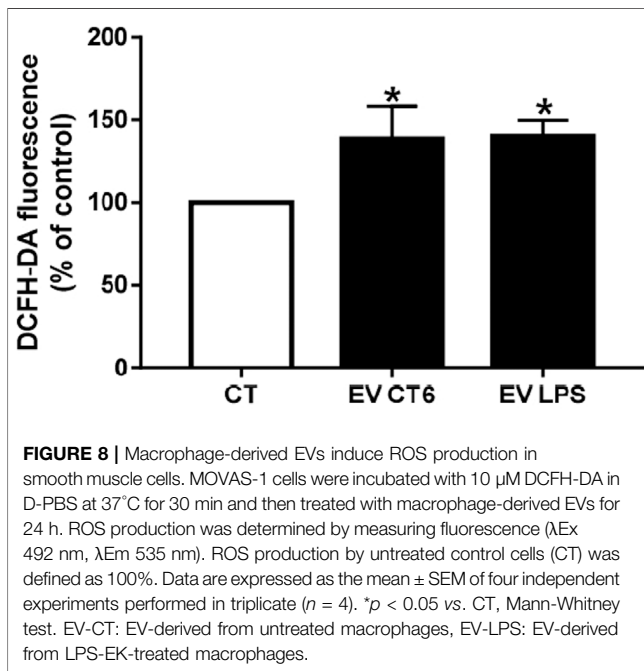
Our objective was to study the propagation of inflammation from macrophages to smooth muscle cells. Thus, we measured the mRNA levels of proinflammatory cytokines (IL-6, IL-1 β , and

TNF- α) in MOVAS cells treated with macrophage-derived EVs. We observed significantly higher proinflammatory cytokine mRNA levels after 24 h of treatment of smooth muscle cells with EV-LPS than in untreated cells (CT) ($*p < 0.05$ vs. CT, Figure 7). There was no effect of EVs derived from control cells (EV-CT) on cytokine levels. A comparison of the effects of the two populations of EVs showed only the increase in IL-6 mRNA levels to be significant ($\$ p < 0.05$ vs. EV-CT, Figure 7A). These results show that EV-LPS are able to induce inflammation mainly via an increase in IL-6 expression.

3.2.4 EV-LPS Induces Oxidative Stress in Smooth Muscle Cells

We investigated the effect of macrophage-derived EVs on oxidative stress in smooth muscle cells by measuring intracellular ROS production. Both EV preparations (EV-CT and EV-LPS) significantly increased ROS production over that of untreated smooth muscle cells ($*p < 0.05$ vs. CT, Figure 8). This result suggests that the effect of macrophage-derived EVs on oxidative stress in smooth muscle cells is independent of macrophage treatment. We next measured mRNA levels of antioxidant enzymes (SOD-1, SOD-2) and nuclear receptors (Nrf2, and Keap1) involved in the antioxidant response. Surprisingly, the mRNA levels of all markers were significantly higher in cells incubated with EV-LPS than in untreated cells (CT) ($*p < 0.05$ vs. CT, Figure 9). Only SOD-2 mRNA levels were higher in MOVAS cells treated with EV-LPS than those treated with EV-CT ($\$ p < 0.05$ vs. EV-CT, Figure 9B). Overall, these results suggest that EV-LPS can affect the oxidative stress response of smooth muscle cells.





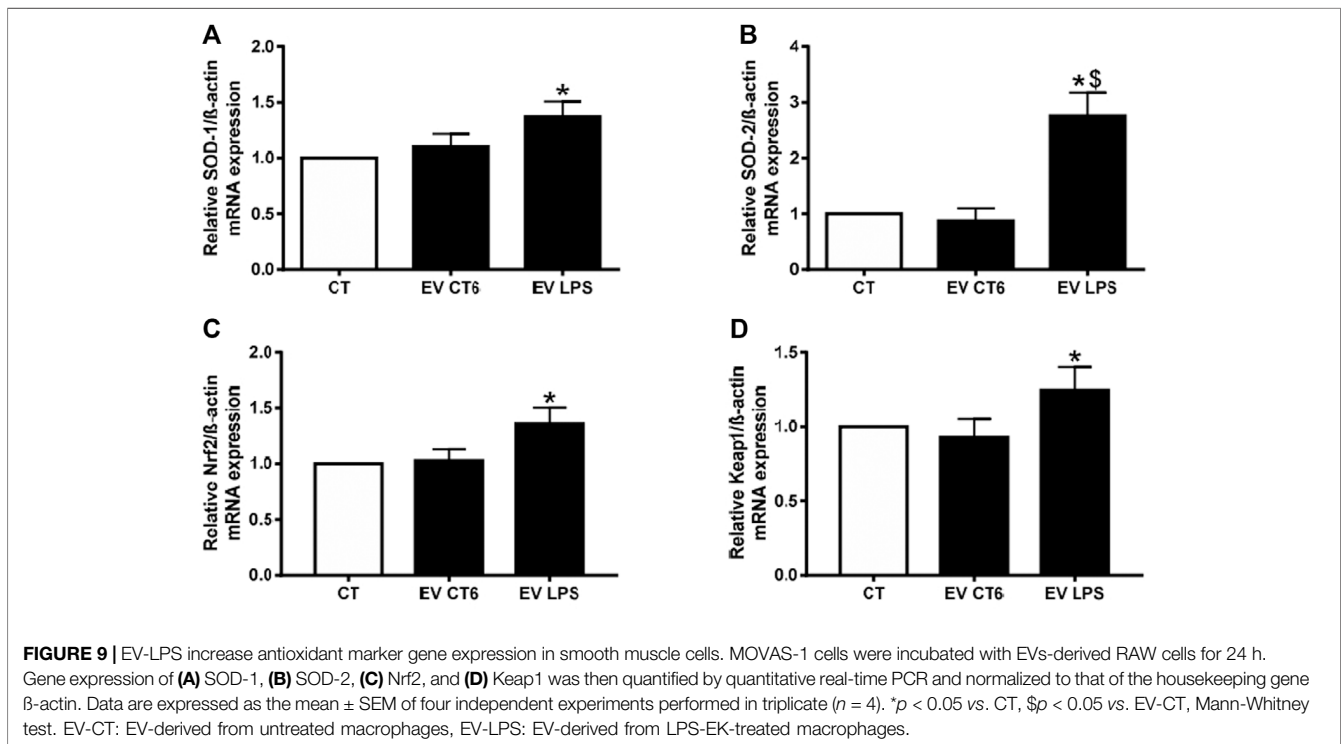
3.2.5 Analysis of the Content of EV-LPS

Inflammation is known to play an important role in vascular calcification. We thus first analyzed the inflammatory content of EVs by measuring the expression of 10 proinflammatory

cytokines in EV-LPS and EV-CT using an MSD multiplex kit. Proinflammatory cytokine levels were, indeed, significantly higher in EV-LPS than EV-CT6 (* $p < 0.05$ vs. CT, **Supplementary Figure S3**). We further analyzed the data using an unsupervised analysis approach to visualize any samples that clustered based on their inflammatory profile. The principal component analysis score plot showed a clear separation between the inflammatory profiles of EV-CT6 and EV-LPS (**Figure 10**). These results show that there is a specific inflammatory profile that distinguishes between these two conditions. We then analyzed the EV protein content by mass spectrometry and detected several EV-specific proteins in our samples, confirming the presence of EVs in our preparations (**Supplementary Table S2**). Furthermore, the level of three proteins in EV LPS were higher than in EV CT6: cis-aconitate decarboxylase (CAD), encoded by the *immunoresponse gene 1* (*Irg1*); plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), encoded by the *Serpine1* gene; and serum amyloid A-3 protein (Saa3), encoded by the *Saa3* gene ($p < 0.01$ vs. EV CT6, **Figure 11**).

3.2.6 EV-LPS Increase Pi-Induced Calcification by Inducing the Osteogenic Switch of Smooth Muscle Cells

Oxidative stress and inflammation are two processes known to play an important role in vascular calcification. Our results show that EV-derived macrophages can induce both oxidative stress and inflammation. Thus, we next determined the effect of these EVs on Pi-induced calcification in smooth muscle cells. MOVAS cells were simultaneously treated with 4 mM Pi and macrophage-derived EVs for 14 days (**Figure 12A**) or macrophage-derived



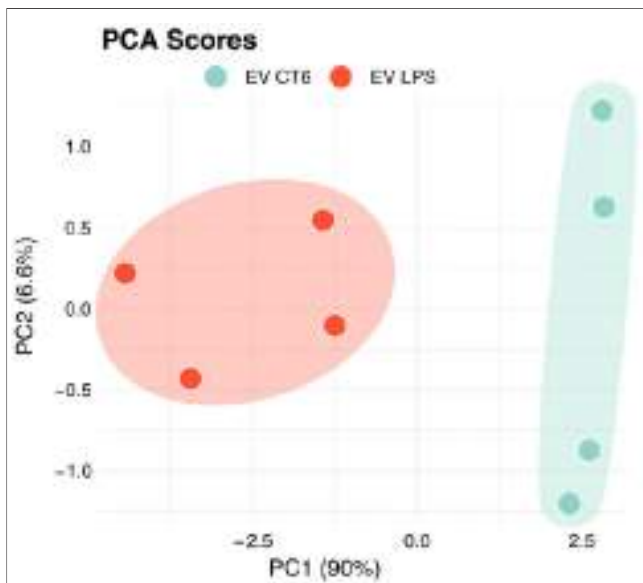


FIGURE 10 | Principal component analysis score plot of EV-CT6 and EV-LPS. EVs were isolated from the culture media of RAW cells incubated with (EV-LPS) or without (EV-CT6) LPS-EK. Proinflammatory cytokine protein levels (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF- α , IFN- γ , and KC-GRO) were measured in EVs derived from the macrophages using an MSD multiplex immunoassay. PCA analysis score plot is performed using four independent experiments ($n = 4$).

EVs for the last 7 days only (**Figure 12B**) of the induction of calcification. The intracellular calcium concentration in the smooth muscle cells was significantly higher after 14 days of treatment with Pi and EV-LPS than in cells treated with Pi and EV-CT ($p < 0.05$ vs. EV-CT, **Figure 12A**). Moreover, the intracellular calcium concentration was significantly higher after 7 days of treatment of Pi-treated smooth muscle cells with EV-LPS than Pi treatment alone ($*p < 0.05$ vs. 4 mM Pi, **Figure 12B**). These results suggest that EV-LPS can significantly induce calcification in MOVAS-1 cells. We can rule out that this effect was due to the presence of LPS-EK in EVs, as LPS-EK alone, with or without 4 mM Pi, had no effect on calcification (data not shown). We next measured the mRNA level of matrix gla protein (MGP), an inhibitor of vascular calcification. The level of MGP mRNA was significantly lower after 7 days of treatment of smooth muscle cells with 4 mM Pi and EV-LPS than in cells treated with Pi alone ($*p < 0.05$ vs. 4 mM Pi, **Figure 13**). The observed increase in calcification may therefore be partially due to a decrease in the level of calcification inhibitors, such as MGP.

Smooth muscle cells can adopt a contractile, synthetic, or osteochondrogenic phenotype, depending on their environment (Durham et al., 2018). During vascular calcification, smooth muscle cells undergo an osteogenic switch to become osteoblast-like cells (Durham et al., 2018). We investigated whether this phenotypic change occurred in our experiments by measuring the mRNA levels of several osteogenic markers, such as osterix (Osx) and osteocalcin (OCN), as well as alpha-smooth muscle actin

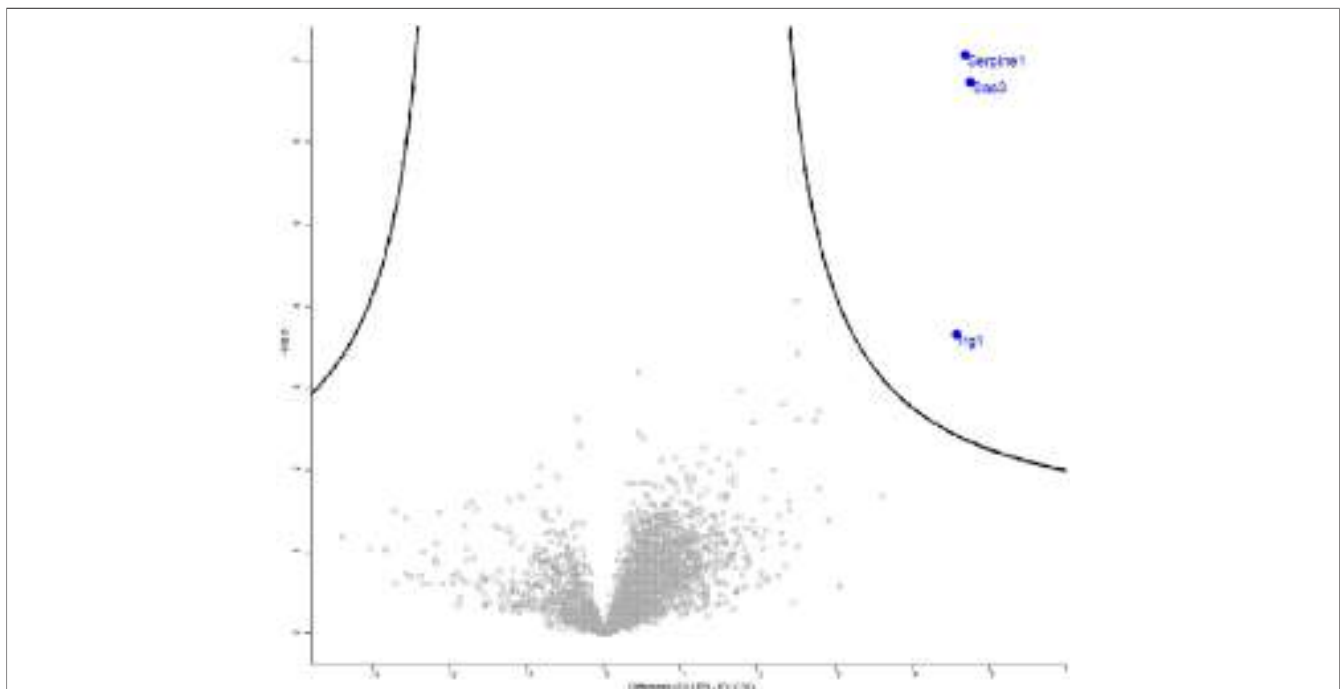
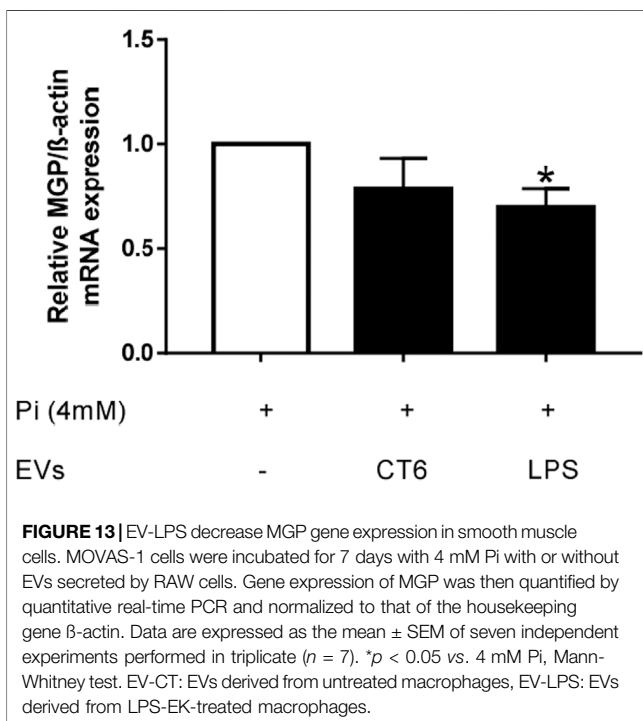
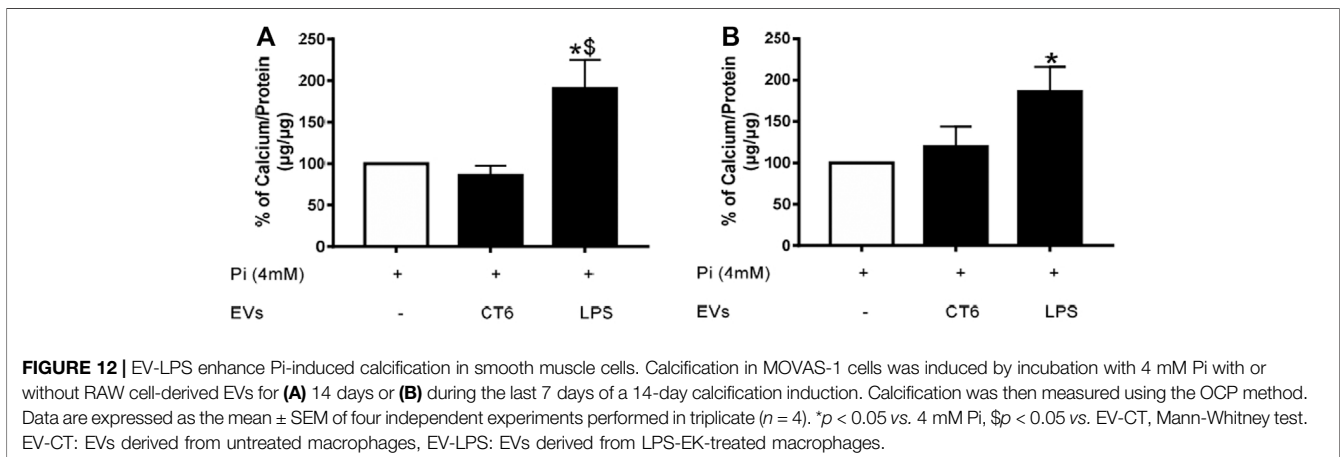


FIGURE 11 | Volcano plot representing the effects of lipopolysaccharide-EK (LPS-EK) on the protein content of macrophage-derived extracellular vesicles (EVs). EVs were isolated from the culture media of RAW cells incubated with (EV-LPS) or without (EV-CT6) lipopolysaccharide-EK (LPS-EK). High-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to mass spectrometry analysis was performed. An unpaired Student's t test was conducted and a p -value < 0.01 and a false discovery rate (FDR) $< 5\%$ were used. Five independent experiments were performed.

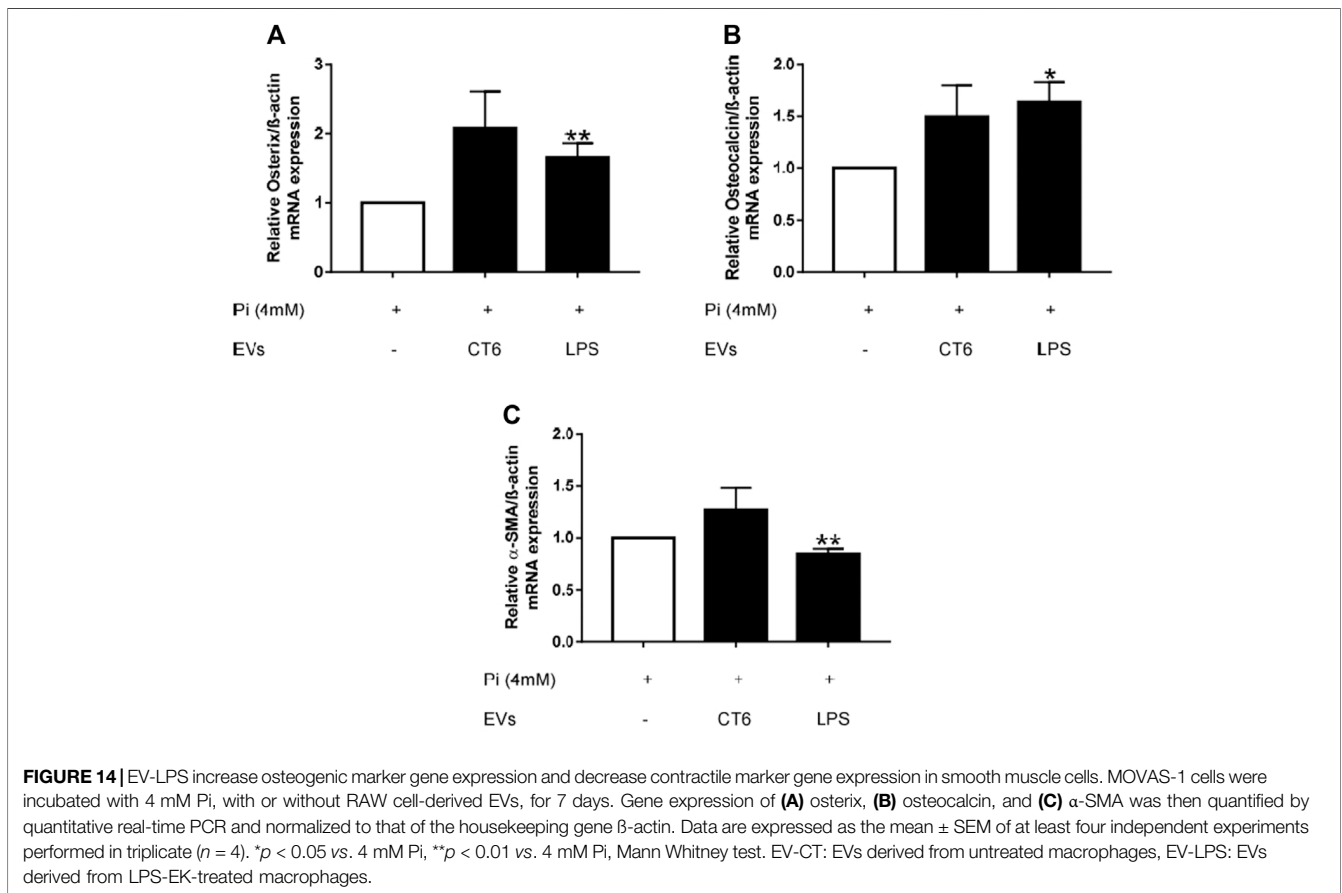


(α -SMA), a marker of the contractile phenotype. *Osx* and *OCN* mRNA levels were significantly higher in Pi-treated smooth muscle cells incubated with EV-LPS than Pi-treated smooth muscle cells, suggesting an osteogenic switch of the MOVAS-1 cells (* $p < 0.05$ vs. 4 mM Pi, ** $p < 0.01$ vs. 4 mM Pi, **Figures 14A,B**). We also observed higher *Osx* and *Ocn* mRNA levels after treatment of Pi-treated smooth muscle cells with EV-CT, but without reaching significance. This result can be explained by the higher amount of EVs in the EV-CT preparation. At the same time, α -SMA mRNA levels were significantly lower than in Pi-treated smooth muscle cells (** $p < 0.01$ vs. 4 mM Pi, **Figure 14C**). Overall, these results show that EV-LPS induce an osteogenic switch of smooth muscle cells, which could, in turn, promote calcification.

4 DISCUSSION

Vascular calcification (VC) is a complex process involving various molecular and cellular mechanisms, such as the VSMC osteogenic switch, loss of VC inhibitors, cell death, and dysregulation of Ca^{2+} /Pi homeostasis, as well as matrix degradation and modification (Lee et al., 2020). Macrophages are among the main sources of inflammation and oxidative stress (Castaneda et al., 2017) and associated with arterial calcification (Agharazii et al., 2015). Indeed, Aikawa et al. showed colocalization of calcification and macrophages in atherosclerotic plaques of apolipoprotein E-deficient mice by image analysis, suggesting a prominent role of these cells and inflammation in calcification (Aikawa et al., 2007). In addition, a number of studies have shown macrophage-derived EVs to be mediators of VC (New et al., 2013; Chen et al., 2016; Li Y. et al., 2020; Kawakami et al., 2020). In this context, we hypothesized that macrophage-derived EVs secreted under pro-inflammatory and pro-oxidative conditions may increase VSMC calcification by propagating inflammation and oxidative stress. We tested our hypothesis by treating a murine VSMC cell line with EVs derived from LPS treated-murine macrophages. We then analyzed the effect of macrophage-derived EVs on the calcium content and levels of inflammatory, oxidative stress, and osteogenic markers in VSMCs. Moreover, we analyzed the protein content of EVs secreted by such activated macrophages.

We show that LPS-EK induces an inflammatory response in macrophages, as demonstrated by the significant increase in mRNA levels of pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-1 β , and TNF- α). These results are in accordance with those in the literature, as activation of TLR4 by LPS triggers activation of the MyD88-dependent pathway, inducing pro-inflammatory cytokine gene transcription. NLRP3, an activator protein of the inflammasome has also been shown to be significantly upregulated after LPS treatment (He et al., 2016). Our results show that LPS-EK induces pro-inflammatory M1 polarization of RAW cells, in accordance with the results of a study of Li et al. performed in the U937 monocyte cell line (Li et al., 2017). LPS-EK also induced oxidative stress, as shown by the significant increase in ROS production, as previously reported. In parallel,



we showed a significant decrease in the expression of genes involved in the antioxidant system, such as Nrf2/Keap. Nrf2 is a transcriptional factor that induces the expression of antioxidant genes. Under basal conditions, Keap1 forms a complex with Nrf2 to induce its degradation by the proteasome. Under conditions of oxidative stress, modifications of the cysteine residues of Keap1 inhibit its interaction with Nrf2, allowing its nuclear translocation and protection of cells against oxidative stress. The observed decrease in Keap1 mRNA levels could be explained by the induction of protective mechanism activated by the cells to counteract ROS production. Surprisingly, despite an increase in ROS production, we showed a significant decrease in $O_2^{\bullet-}$ production, which can be explained by both a decrease in Nox-2 levels and an increase in its degradation by SOD-2. This discrepancy can be partially explained by the fact that $O_2^{\bullet-}$ can rapidly react with NO to form peroxynitrite ($ONOO^-$), which mediates oxidative responses. Indeed, under LPS treatment, we observed a decrease in NO production, despite an increase in iNOS, an enzyme that produces NO.

As already shown (Liu et al., 2017; Bell et al., 2019), LPS-EK inhibited EV biogenesis by decreasing the expression of several markers of EV biogenesis, such as sphingomyelin phosphodiesterase 3 (SMPD3), phospho-1, and tissue nonspecific phosphatase alkaline phosphatase (TNAP). These results were confirmed by NTA analysis, which showed a reduced number of secreted EVs after LPS treatment. A

similar result was reported by Bell *et al.* in AC16 human cardiomyocytes (Bell et al., 2019). In our cellular model, LPS-EK significantly decreased the expression of autophagic markers (Atg5, beclin1, ULK). Autophagy has already been shown to play an important role in EV biogenesis (Yang et al., 2021). This was confirmed by a significant increase in p62 expression after LPS treatment, as it has been shown that p62 protein accumulates upon inhibition of autophagy (Lamark et al., 2009). Interestingly, Liu et al. recently demonstrated a link between autophagy and macrophage polarization, showing that inhibition of autophagy induces the polarization of macrophages towards a pro-inflammatory M1 phenotype (Liu et al., 2015), a phenotype that we observed in our cells after treatment with LPS-EK. Moreover, Zhao *et al.* have shown that autophagy contributes to redox homeostasis, not only by clearing oxidized cellular components, but also by promoting antioxidant defenses *via* the p62/Keap1/Nrf2 pathway (Zhao et al., 2019). Therefore, a deficiency in autophagy, as observed in our cellular model, would decrease antioxidant defenses, which could also explain the observed increase in oxidative stress.

We investigated whether EVs secreted by LPS-treated cells play a role in VC by incubating VSMCs with EV-LPS. We show that EV-LPS induces inflammation and oxidative stress in VSMCs, with a significant increase in the expression of pro-inflammatory cytokines (IL6, IL1 β , TNF α). Assessment of the inflammatory profile of the secreted EVs showed that EV-LPS are

in fact enriched in these proinflammatory cytokines, consistent with the M1 polarization of RAW cells observed after treatment with LPS-EK. Cytokines are key players in cell-cell communication and play important roles in several biological processes, such as cell differentiation and inflammation. Various secretory pathways are responsible for their release, such as the classical ER/Golgi route and the unconventional pathway, also known as unconventional protein secretion (UPS). Recently, cytokines have been shown to be capable of reaching the extracellular milieu *via* a novel secretory pathway through EVs. Fitzgerald et al. thus showed that cytokine encapsulation into EVs is a general biological phenomenon observed *in vitro* and *in vivo* (Fitzgerald et al., 2018). Interestingly the profile of such encapsulated cytokines changes in response to various stimuli, suggesting that cytokine association with EVs is not specific to any particular cytokine, as all cytokines can be encapsulated. Tokarz et al. showed, for example, that the association of specific cytokines with EVs is strongly influenced by disease duration and treatment in diabetes (Tokarz et al., 2015). Such an association between cytokines and EVs appears to result from a specific physiological need, depending on whether the cytokines act near the EV-secreting cells or at a distance. Indeed, Fitzgerald et al. (2018) showed that tissue explants, in which cells are in proximity with each other, secrete more soluble cytokine than cells in suspension, in which cytokines are more highly associated with EVs to allow their interaction with recipient cells at a distance. It is therefore possible that pro-inflammatory cytokines from M1 macrophages are carried by EVs secreted by these cells to induce a pro-inflammatory microenvironment for recipient cells, such as VSMCs. Moreover, several studies have shown that inflammatory cytokines have biological effects in VSMCs (Nilsson, 1993). For example, Barillari *et al.* showed that IL-1 β , TNF- α , and IFN- γ released by activated immune cells enhance the expression of $\alpha 5\beta 1$ integrin, a fibronectin receptor, leading to an increase in VSMC proliferation and migration, two mechanisms required for the formation of atherosclerotic lesions (Barillari et al., 2001). Our results also show that EV-LPS induce oxidative stress, as demonstrated by increased ROS production and decreased expression of antioxidant enzyme genes. However, EVs from non-treated cells (EV-CT) were also able to induce oxidative stress. Nevertheless, it is worthwhile noting that we treated cells with equivalent volumes of EV preparations. As LPS-treated cells secreted fewer EVs than control cells, it is likely that using the same volumes to treat VSMCs resulted in treating them with a lower number of EV-LPS than EV-CT, thus underestimating the effects of EV-LPS on VSMCs. These results confirm our hypothesis that EVs secreted under pro-inflammatory and pro-oxidative conditions are able to propagate inflammation and oxidative stress to surrounding cells, such as VSMCs. Finally, EV-LPS enhanced Pi-induced calcification of VSMCs by inducing the VSMC osteogenic switch and decreasing expression of the calcification inhibitor, MGP. These effects were intrinsic to EVs, as LPS alone had no effect on calcification. Moreover, in a similar manner, the study of Li *et al.* showed that the conditioned medium of LPS-treated macrophages induces an

osteogenic switch of valve interstitial cells by increasing OPN, BMP-2, and ALP expression (Li et al., 2017). Furthermore, the aforementioned study showed that the increase in IL-6, IL-1 β , and TNF- α in the conditioned medium was associated with an increase in the production of MMPs, which contribute to extracellular matrix degradation, remodeling, and valve calcification (Li et al., 2017).

Proteomic analysis highlighted the upregulation of three proteins in EV-LPS relative to EV-CT: cis-aconitate decarboxylase (CAD), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), and serum amyloid A-3 protein (Saa3). CAD, a mitochondrial enzyme encoded by immunoresponsive gene 1 (Irg1) and involved in itaconate production, is known to be upregulated in macrophages under pro-inflammatory conditions (Basler et al., 2006; Németh et al., 2016; Tallam et al., 2016; Song et al., 2020). Itaconate has been shown to be an immunoregulatory and anti-oxidant molecule (Lampropoulou et al., 2016; Mills et al., 2018; Li R. et al., 2020; Song et al., 2020). Itaconate has also been shown to promote IL-1 β production and inflammatory apoptosis when administered at high doses to bone marrow-derived dendritic cells (Muri et al., 2020). In addition, the production of ROS can be mediated by Irg1 induction (Tan et al., 2016). In our study, EV-LPS were enriched in CAD. It is thus possible that this enzyme may induce the production of itaconate in VSMCs when transferred to the recipient cells via EVs, leading to inflammation and oxidative stress. PAI-1 is known to inhibit the action of plasminogen activators, such as tPA and uPA. First, several studies have already shown the upregulation of PAI-1 expression in LPS-treated cells (Wang et al., 2014; Ren et al., 2015) and an immunoregulatory role for PAI-1 through the TLR4 signaling pathway (Gupta et al., 2016). PAI-1 levels also increase under oxidative conditions (Vulin and Stanley, 2004). The higher amount of PAI-1 found in EV-LPS could be explained by macrophage activation. Numerous studies have shown PAI-1 to be associated with atherosclerotic lesions. Indeed, PAI-1 levels are high in atherosclerotic coronary arteries (Schneiderman et al., 1992; Lupu et al., 1993; Raghunath et al., 1995; Padró et al., 1997). PAI-1 expression was also found to be higher in CKD patients than healthy individuals (Ouyang et al., 2013). Furthermore, a number of studies have shown that PAI-1 is linked to VC. The upregulation of PAI-1 was, indeed, shown to be proportional to the calcium content in 65 calcified aortic valves (Kochtebane et al., 2014). Another study showed PAI-1 to positively correlate with vascular media thickness and calcification (Ouyang et al., 2013). PAI-1 transported by EV-LPS could thus participate in the aggravation of the VC process, as observed under our experimental conditions. Finally, Saa3, a member of apolipoproteins associated with high-density lipoprotein (HDL) in plasma, was only overexpressed in EV-LPS. As for CAD and PAI-1, Saa3 was upregulated after LPS treatment (Meek et al., 1992; Reigstad et al., 2009). Several studies have shown Saa proteins to have cytokine-like activity and to be able to activate several receptors, such as TLRs, and transcription factors, such as NF- κ B (Ye and Sun, 2015). In addition, a number of studies have highlighted the role of Saa proteins in calcification (Tanaka et al., 2011; Ebert et al., 2015; Zhang et al., 2017). Saa proteins induce the production of pro-inflammatory cytokines and the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells *via* the TLR4 receptor (Ebert et al., 2015). Zhang *et al.* also showed that Saa proteins can

induce the VSMC osteogenic switch through the p38 MAPK signaling pathway (Zhang et al., 2017). Furthermore, Saa proteins can increase calcium entry in human coronary artery smooth muscle cells (Tanaka et al., 2011). Thus, it is possible that Saa3 transported by EVs increases Pi entry into VSMCs and enhances the VSMC osteogenic switch.

In conclusion, we show a direct contribution of macrophages in the microcalcification process *via* EV secretion, an alternative pathway, in addition to the VSMC osteogenic switch. Indeed, EV-LPS, enriched for molecules involved in inflammation, oxidative stress, and VC mechanisms, were able to create an inflammatory microenvironment for surrounding cells, such as VSMCs, which in turn underwent an osteogenic switch, leading to increasing calcification. As atherosclerotic plaques containing microcalcifications are more susceptible to rupture and cardiovascular accidents, this study suggests that EVs could be used as non-invasive biomarkers to better stratify patients with a high risk of CV. Moreover, such EVs could therefore also be a therapeutic target to limit VC in patients.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data presented in the study are deposited in the PRIDE repository, accession number PXD029441 (<http://www.proteomexchange.org>).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AB and JA designed the experiments and performed the relevant literature research and data analysis. LY contributed

to experimentation and analysis of the results. CD and LY contributed to the structural analysis of EVs by NTA. VJ and IG performed the proteomic analysis. LY and CL contributed to the analysis of EV content by V-Plex. AT and SB provided important input to the data analysis on the V-Plex assay. LY, AB, and JA contributed to the writing of the manuscript. AB, SK, SB, AT, IG, and JA reviewed and edited the paper. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

LY was financially supported by the French Research Ministry. This work was financially supported by the Université de Picardie Jules Verne.

ACKNOWLEDGMENTS

This work benefited from the assistance of Stephanie Balor and Vanessa Soldan from the Multiscale Electron Imaging platform (METi) of the Centre de Biologie Intégrative (CBI), Toulouse, France.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2022.823450/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Agharazii, M., St-Louis, R., Gautier-Bastien, A., Ung, R.-V., Mokas, S., Larivière, R., et al. (2015). Inflammatory Cytokines and Reactive Oxygen Species as Mediators of Chronic Kidney Disease-Related Vascular Calcification. *Am. J. Hypertens.* 28, 746–755. doi:10.1093/ajh/hpu225
- Aiello, A., Giannesi, F., Percario, Z. A., and Affabris, E. (2020). An Emerging Interplay between Extracellular Vesicles and Cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* 51, 49–60. doi:10.1016/j.cytogfr.2019.12.003
- Aikawa, E., Nahrendorf, M., Figueiredo, J.-L., Swirski, F. K., Shtatland, T., Kohler, R. H., et al. (2007). Osteogenesis Associates with Inflammation in Early-Stage Atherosclerosis Evaluated by Molecular Imaging *In Vivo*. *Circulation* 116, 2841–2850. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.732867
- Barillari, G., Albonici, L., Incerpi, S., Bogetto, L., Pistrutto, G., Volpi, A., et al. (2001). Inflammatory Cytokines Stimulate Vascular Smooth Muscle Cells Locomotion and Growth by Enhancing $\alpha 5 \beta 1$ Integrin Expression and Function. *Atherosclerosis* 154, 377–385. doi:10.1016/s0021-9150(00)00506-2
- Basler, T., Jeckstadt, S., Valentin-Weigand, P., and Goethe, R. (2006). Mycobacterium Paratuberculosis, Mycobacterium Smegmatis, and Lipopolysaccharide Induce Different Transcriptional and post-transcriptional Regulation of the IRG1 Gene in Murine Macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 79, 628–638. doi:10.1189/jlb.0905520
- Bell, C. R., Jones, L. B., Crenshaw, B. J., Kumar, S., Rowe, G. C., Sims, B., et al. (2019). The Role of Lipopolysaccharide-Induced Extracellular Vesicles in Cardiac Cell Death. *Biology* 8, 69. doi:10.3390/biology8040069
- Bodega, G., Alique, M., Puebla, L., Carracedo, J., and Ramirez, R. M. (2019). Microvesicles: ROS Scavengers and ROS Producers. *J. Extracellular Vesicles* 8, 1626654. doi:10.1080/20013078.2019.1626654
- Castaneda, O. A., Lee, S.-C., Ho, C.-T., and Huang, T.-C. (2017). Macrophages in Oxidative Stress and Models to Evaluate the Antioxidant Function of Dietary Natural Compounds. *J. Food Drug Anal.* 25, 111–118. doi:10.1016/j.jfda.2016.11.006
- Chen, N. X., O'Neill, K. D., Chen, X., and Moe, S. M. (2008). Annexin-mediated Matrix Vesicle Calcification in Vascular Smooth Muscle Cells. *J. Bone Mineral Res.* 23, 1798–1805. doi:10.1359/jbmr.080604
- Chen, Q., Bei, J.-J., Liu, C., Feng, S.-B., Zhao, W.-B., Zhou, Z., et al. (2016). HMGB1 Induces Secretion of Matrix Vesicles by Macrophages to Enhance Ectopic Mineralization. *PLoS ONE* 11, e0156686. doi:10.1371/journal.pone.0156686
- Cox, J., and Mann, M. (2008). MaxQuant Enables High Peptide Identification Rates, Individualized p.p.b.-range Mass Accuracies and Proteome-wide Protein Quantification. *Nat. Biotechnol.* 26, 1367–1372. doi:10.1038/nbt.1511
- Demer, L. L., and Tintut, Y. (2008). Vascular Calcification. *Circulation* 117, 2938–2948. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.743161
- Drüeke, T. B., and Massy, Z. A. (2011). Medial or Intimal Calcification in CKD-Does it Matter? *Nat. Rev. Nephrol.* 7, 250–251. doi:10.1038/nrneph.2011.41
- Durham, A. L., Speer, M. Y., Scatena, M., Giachelli, C. M., and Shanahan, C. M. (2018). Role of Smooth Muscle Cells in Vascular Calcification: Implications in Atherosclerosis and Arterial Stiffness. *Cardiovasc. Res.* 114, 590–600. doi:10.1093/cvr/cvy010
- Ebert, R., Benisch, P., Krug, M., Zeck, S., Meißner-Weigl, J., Steinert, A., et al. (2015). Acute Phase Serum Amyloid A Induces Proinflammatory Cytokines and Mineralization via Toll-like Receptor 4 in Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cell Res.* 15, 231–239. doi:10.1016/j.scr.2015.06.008
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., and Featherstone, R. M. (1961). A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95. doi:10.1016/0006-2952(61)90145-9

- Fitzgerald, W., Freeman, M. L., Lederman, M. M., Vasilieva, E., Romero, R., and Margolis, L. (2018). A System of Cytokines Encapsulated in Extracellular Vesicles. *Sci. Rep.* 8, 8973. doi:10.1038/s41598-018-27190-x
- Fujii, T., Mashimo, M., Moriwaki, Y., Misawa, H., Ono, S., Horiguchi, K., et al. (2017). Physiological Functions of the Cholinergic System in Immune Cells. *J. Pharmacol. Sci.* 134, 1–21. doi:10.1016/j.jphs.2017.05.002
- Gupta, K. K., Xu, Z., Castellino, F. J., and Ploplis, V. A. (2016). Plasminogen Activator Inhibitor-1 Stimulates Macrophage Activation through Toll-like Receptor-4. *Biochem. Biophysical Res. Commun.* 477, 503–508. doi:10.1016/j.bbrc.2016.06.065
- He, Y., Hara, H., and Núñez, G. (2016). Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends Biochem. Sci.* 41, 1012–1021. doi:10.1016/j.tibs.2016.09.002
- Hénaut, L., Candellier, A., Boudot, C., Grissi, M., Mentaverri, R., Choukroun, G., et al. (2019). New Insights into the Roles of Monocytes/Macrophages in Cardiovascular Calcification Associated with Chronic Kidney Disease. *Toxins* 11, 529. doi:10.3390/toxins11090529
- Hodroge, A., Trécherel, E., Cornu, M., Darwiche, W., Mansour, A., Ait-Mohand, K., et al. (2017). Oligogalacturonic Acid Inhibits Vascular Calcification by Two Mechanisms. *Atvb* 37, 1391–1401. doi:10.1161/atvbaha.117.309513
- Hu, C.-T., Shao, Y.-D., Liu, Y.-Z., Xiao, X., Cheng, Z.-B., Qu, S.-L., et al. (2021). Oxidative Stress in Vascular Calcification. *Clinica Chim. Acta* 519, 101–110. doi:10.1016/j.cca.2021.04.012
- Jaminon, A., Reesink, K., Kroon, A., and Schurgers, L. (2019). The Role of Vascular Smooth Muscle Cells in Arterial Remodeling: Focus on Calcification-Related Processes. *Ijms* 20, 5694. doi:10.3390/ijms20225694
- Kawakami, R., Katsuki, S., Travers, R., Romero, D. C., Becker-Greene, D., Passos, L. S. A., et al. (2020). S100A9-RAGE Axis Accelerates Formation of Macrophage-Mediated Extracellular Vesicle Microcalcification in Diabetes Mellitus. *Atvb* 40, 1838–1853. doi:10.1161/ATVBaha.118.314087
- Kochtebane, N., Alzahrani, A. M. M., and Bartegi, A. (2014). Expression of uPA, tPA, and PAI-1 in Calcified Aortic Valves. *Biochem. Res. Int.* 2014, 1. doi:10.1155/2014/658643
- Komaba, H., and Fukagawa, M. (2009). Fetuin-mineral Complex: a New Potential Biomarker for Vascular Calcification? *Kidney Int.* 75, 874–876. doi:10.1038/ki.2009.52
- Lamark, T., Kirkin, V., Dikic, I., and Johansen, T. (2009). NBR1 and P62 as Cargo Receptors for Selective Autophagy of Ubiquitinated Targets. *Cell Cycle* 8, 1986–1990. doi:10.4161/cc.8.13.8892
- Lampropoulou, V., Sergushichev, A., Bambouskova, M., Nair, S., Vincent, E. E., Loginicheva, E., et al. (2016). Itaconate Links Inhibition of Succinate Dehydrogenase with Macrophage Metabolic Remodeling and Regulation of Inflammation. *Cel Metab.* 24, 158–166. doi:10.1016/j.cmet.2016.06.004
- Lee, S. J., Lee, I.-K., and Jeon, J.-H. (2020). Vascular Calcification-New Insights into its Mechanism. *Ijms* 21, 2685. doi:10.3390/ijms21082685
- Li, G., Qiao, W., Zhang, W., Li, F., Shi, J., and Dong, N. (2017). The Shift of Macrophages toward M1 Phenotype Promotes Aortic Valvular Calcification. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 153, 1318–1327. doi:10.1016/j.jtcvs.2017.01.052
- Li, R., Zhang, P., Wang, Y., and Tao, K. (2020a). Itaconate: A Metabolite Regulates Inflammation Response and Oxidative Stress. *Oxidative Med. Cell Longevity* 2020, 1. doi:10.1155/2020/5404780
- Li, Y., Sun, Z., Zhang, L., Yan, J., Shao, C., Jing, L., et al. (2020b). Role of Macrophages in the Progression and Regression of Vascular Calcification. *Front. Pharmacol.* 11. doi:10.3389/fphar.2020.00661
- Liu, F., Li, X., Yue, H., Ji, J., You, M., Ding, L., et al. (2017). TLR-induced SMPD3 Defects Enhance Inflammatory Response of B Cell and Macrophage in the Pathogenesis of SLE. *Scand. J. Immunol.* 86, 377–388. doi:10.1111/sji.12611
- Liu, K., Zhao, E., Ilyas, G., Lalazar, G., Lin, Y., Haseeb, M., et al. (2015). Impaired Macrophage Autophagy Increases the Immune Response in Obese Mice by Promoting Proinflammatory Macrophage Polarization. *Autophagy* 11, 271–284. doi:10.1080/15548627.2015.1009787
- Lupu, F., Bergonzelli, G. E., Heim, D. A., Cousin, E., Genton, C. Y., Bachmann, F., et al. (1993). Localization and Production of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Human Healthy and Atherosclerotic Arteries. *Arterioscler Thromb.* 13, 1090–1100. doi:10.1161/01.atv.13.7.1090
- Mansour, A., Darwiche, W., Yaker, L., Da Nascimento, S., Gomila, C., Rossi, C., et al. (2020). GFOGER Peptide Modifies the Protein Content of Extracellular Vesicles and Inhibits Vascular Calcification. *Front. Cel Dev. Biol.* 8, 589761. doi:10.3389/fcell.2020.589761
- Mastronarde, D. N. (2005). Automated Electron Microscope Tomography Using Robust Prediction of Specimen Movements. *J. Struct. Biol.* 152, 36–51. doi:10.1016/j.jsb.2005.07.007
- Meek, R. L., Eriksen, N., and Benditt, E. P. (1992). Murine Serum Amyloid A3 Is a High Density Apolipoprotein and Is Secreted by Macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 7949–7952. doi:10.1073/pnas.89.17.7949
- Mills, E. L., Ryan, D. G., Prag, H. A., Dikovskaya, D., Menon, D., Zaslona, Z., et al. (2018). Itaconate Is an Anti-inflammatory Metabolite that Activates Nrf2 via Alkylation of KEAP1. *Nature* 556, 113–117. doi:10.1038/nature25986
- Moe, S. M., and Chen, N. X. (2005). Inflammation and Vascular Calcification. *Blood Purif.* 23, 64–71. doi:10.1159/000082013
- Muri, J., Wolleb, H., Broz, P., Carreira, E. M., and Kopf, M. (2020). Electrophilic Nrf2 Activators and Itaconate Inhibit Inflammation at Low Dose and Promote IL-1 β Production and Inflammatory Apoptosis at High Dose. *Redox Biol.* 36, 101647. doi:10.1016/j.redox.2020.101647
- Németh, B., Doczi, J., Csete, D., Kacso, G., Ravasz, D., Adams, D., et al. (2016). Abolition of Mitochondrial Substrate-level Phosphorylation by Itaconic Acid Produced by LPS-induced Irg1 Expression in Cells of Murine Macrophage Lineage. *FASEB j.* 30, 286–300. doi:10.1096/fj.15-279398
- New, S. E. P., Goettsch, C., Aikawa, M., Marchini, J. F., Shibasaki, M., Yabusaki, K., et al. (2013). Macrophage-Derived Matrix Vesicles. *Circ. Res.* 113, 72–77. doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.301036
- Nilsson, J. (1993). Cytokines and Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* 27, 1184–1190. doi:10.1093/cvr/27.7.1184
- Ouyang, L., Peng, Y., Wu, G., Xu, X., and He, Z. (2013). Effect of Plasminogen Activator Inhibitor-1 and Endothelin-1 on the Atherosclerosis in the Maintenance Hemodialysis Patients. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 38, 458–467. doi:10.3969/j.issn.1672-7347.2013.05.004
- Padró, T., Steins, M., Li, C.-X., Mesters, R. M., Hammel, D., Scheld, H. H., et al. (1997). Comparative Analysis of Plasminogen Activator Inhibitor-1 Expression in Different Types of Atherosclerotic Lesions in Coronary Arteries from Human Heart Explants. *Cardiovasc. Res.* 36, 28–36. doi:10.1016/S0008-6363(97)00144-2
- Perez-Riverol, Y., Csordas, A., Bai, J., Bernal-Llinares, M., Hewapathirana, S., Kundu, D. J., et al. (2019). The PRIDE Database and Related Tools and Resources in 2019: Improving Support for Quantification Data. *Nucleic Acids Res.* 47 (D1), D442–D450. doi:10.1093/nar/gky1106
- Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83, 346–356. doi:10.1016/0003-2697(77)90043-4
- Pi, J., Li, T., Liu, J., Su, X., Wang, R., Yang, F., et al. (2014). Detection of Lipopolysaccharide Induced Inflammatory Responses in RAW264.7 Macrophages Using Atomic Force Microscope. *Micron* 65, 1–9. doi:10.1016/j.micron.2014.03.012
- Qin, Z., Liao, R., Xiong, Y., Jiang, L., Li, J., Wang, L., et al. (2021). A Narrative Review of Exosomes in Vascular Calcification. *Ann. Transl. Med.* 9, 579. doi:10.21037/atm-20-7355
- Raghunath, P. N., Tomaszewski, J. E., Brady, S. T., Caron, R. J., Okada, S. S., and Barnathan, E. S. (1995). Plasminogen Activator System in Human Coronary Atherosclerosis. *Atvb* 15, 1432–1443. doi:10.1161/01.atv.15.9.1432
- Raschke, W. C., Baird, S., Ralph, P., and Nakoinz, I. (1978). Functional Macrophage Cell Lines Transformed by Abelson Leukemia Virus. *Cell* 15, 261–267. doi:10.1016/0092-8674(78)90101-0
- Ray Sarkar, B. C., and Chauhan, U. P. S. (1967). A New Method for Determining Micro Quantities of Calcium in Biological Materials. *Anal. Biochem.* 20, 155–166. doi:10.1016/0003-2697(67)90273-4
- Reigstad, C. S., Lundén, G. Ö., Felin, J., and Bäckhed, F. (2009). Regulation of Serum Amyloid A3 (SAA3) in Mouse Colonic Epithelium and Adipose Tissue by the Intestinal Microbiota. *PLOS ONE* 4, e5842. doi:10.1371/journal.pone.0005842
- Ren, W., Wang, Z., Hua, F., and Zhu, L. (2015). Plasminogen Activator Inhibitor-1 Regulates LPS-Induced TLR4/MD-2 Pathway Activation and Inflammation in Alveolar Macrophages. *Inflammation* 38, 384–393. doi:10.1007/s10753-014-0042-8

- Schneiderman, J., Sawdey, M. S., Keeton, M. R., Bordin, G. M., Bernstein, E. F., Dilley, R. B., et al. (1992). Increased Type 1 Plasminogen Activator Inhibitor Gene Expression in Atherosclerotic Human Arteries. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 6998–7002. doi:10.1073/pnas.89.15.6998
- Song, H., Xu, T., Feng, X., Lai, Y., Yang, Y., Zheng, H., et al. (2020). Itaconate Prevents Abdominal Aortic Aneurysm Formation through Inhibiting Inflammation via Activation of Nrf2. *EBioMedicine* 57, 102832. doi:10.1016/j.ebiom.2020.102832
- Tallam, A., Perumal, T. M., Antony, P. M., Jäger, C., Fritz, J. V., Vallar, L., et al. (2016). Gene Regulatory Network Inference of Immunoresponse Gene 1 (IRG1) Identifies Interferon Regulatory Factor 1 (IRF1) as its Transcriptional Regulator in Mammalian Macrophages. *PLOS ONE* 11, e0149050. doi:10.1371/journal.pone.0149050
- Tan, H.-Y., Wang, N., Li, S., Hong, M., Wang, X., and Feng, Y. (2016). The Reactive Oxygen Species in Macrophage Polarization: Reflecting its Dual Role in Progression and Treatment of Human Diseases. *Oxidative Med. Cell Longevity* 2016, 1. doi:10.1155/2016/2795090
- Tanaka, T., Ikeda, K., Yamamoto, Y., Iida, H., Kikuchi, H., Morita, T., et al. (2011). Effects of Serum Amyloid A and Lysophosphatidylcholine on Intracellular Calcium Concentration in Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells. *Int. Heart J.* 52, 185–193. doi:10.1536/ihj.52.185
- Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., et al. (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. *J. Extracell. Vesicles* 7, 1535750. doi:10.1080/20013078.2018.1535750
- Tokarz, A., Szuścik, I., Kuśnierz-Cabala, B., Kapusta, M., Konkolewska, M., Żurkowski, A., et al. (2015). Extracellular Vesicles Participate in the Transport of Cytokines and Angiogenic Factors in Diabetic Patients with Ocular Complications. *Folia Med. Cracov* 55, 35–48.
- Tóth, A., Balogh, E., and Jeney, V. (2020). Regulation of Vascular Calcification by Reactive Oxygen Species. *Antioxidants* 9, 963. doi:10.3390/antiox9100963
- Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M. Y., Geiger, T., et al. (2016). The Perseus Computational Platform for Comprehensive Analysis of (Prote) omics Data. *Nat. Methods* 13, 731–740. doi:10.1038/nmeth.3901
- van Niel, G., D'Angelo, G., and Raposo, G. (2018). Shedding Light on the Cell Biology of Extracellular Vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 213–228. doi:10.1038/nrm.2017.125
- Voelkl, J., Lang, F., Eckardt, K.-U., Amann, K., Kuro-O, M., Pasch, A., et al. (2019). Signaling Pathways Involved in Vascular Smooth Muscle Cell Calcification during Hyperphosphatemia. *Cell. Mol. Life Sci.* 76, 2077–2091. doi:10.1007/s00018-019-03054-z
- Vulin, A. I., and Stanley, F. M. (2004). Oxidative Stress Activates the Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 (PAI-1) Promoter through an AP-1 Response Element and Cooperates with Insulin for Additive Effects on PAI-1 Transcription. *J. Biol. Chem.* 279, 25172–25178. doi:10.1074/jbc.M403184200
- Wang, Z.-H., Ren, W.-Y., Zhu, L., and Hu, L.-J. (2014). Plasminogen Activator Inhibitor-1 Regulates LPS Induced Inflammation in Rat Macrophages through Autophagy Activation. *Scientific World J.* 2014, 1. doi:10.1155/2014/189168
- Woith, E., Fuhrmann, G., and Melzig, M. F. (2019). Extracellular Vesicles-Connecting Kingdoms. *Ijms* 20, 5695. doi:10.3390/ijms20225695
- Yaker, L., Kamel, S., Ausseil, J., and Boullier, A. (2020). Effects of Chronic Kidney Disease and Uremic Toxins on Extracellular Vesicle Biology. *Toxins* 12, 811. doi:10.3390/toxins12120811
- Yang, X., Song, X., Li, Z., Liu, N., Yan, Y., and Liu, B. (202110562). Crosstalk between Extracellular Vesicles and Autophagy in Cardiovascular Pathophysiology. *Pharmacol. Res.* 172, 105628. doi:10.1016/j.phrs.2021.105628
- Ye, R. D., and Sun, L. (2015). Emerging Functions of Serum Amyloid A in Inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 98, 923–929. doi:10.1189/jlb.3VMR0315-080R
- Zhang, X., Chen, J., and Wang, S. (2017). Serum Amyloid A Induces a Vascular Smooth Muscle Cell Phenotype Switch through the P38 MAPK Signaling Pathway. *Biomed. Res. Int.* 2017, 1. doi:10.1155/2017/4941379
- Zhao, L., Li, H., Wang, Y., Zheng, A., Cao, L., and Liu, J. (2019). Autophagy Deficiency Leads to Impaired Antioxidant Defense via P62-Foxo1/3 Axis. *Oxidative Med. Cell Longevity* 2019, 1–15. doi:10.1155/2019/2526314

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors, and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Yaker, Tebani, Lesueur, Dias, Jung, Bekri, Guerrero, Kamel, Ausseil and Boullier. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

2 ANNEXE 2 : ABSTRACT “MICROGLIA-DERIVED EXTRACELLULAR VESICLES PROMOTE NEUROPATHOLOGY IN SANFILIPPO SYNDROME”

Durant ma troisième année de thèse, j'ai eu le privilège de présenter en Février 2023 les premiers résultats *in vitro* obtenus sur la caractérisation du contenu des EVs isolées à partir de la lignée cellulaire microgliale BV-2, au travers d'une communication orale et d'un poster lors du 19^{ème} WORLD (We're Organizing Research on Lysosomal Diseases) symposium annuel à Orlando, USA. Le résumé de cette présentation intitulée « *Microglia-derived extracellular vesicles promote neuropathology in Sanfilippo syndrome* » est paru dans le journal Molecular Genetics and Metabolism au même moment. Lors de cet événement, j'ai également été récompensée et j'ai reçu le WORLDSymposium 2023 Young Investigator Award. J'ai également eu l'occasion de présenter ces résultats lors du 1^{er} YGCCD (Young Glial Cell Club Day) auquel j'ai pu participer à l'organisation à Lyon, en Mai 2023.

IRYCIS, Madrid, Spain, ^bBiology, Faculty of Medicine, Marrakech, Morocco, ^cUniversité Cadi Ayyad, Marrakech, Morocco, ^dHematology, University Hospital La Paz, Madrid, Spain, ^eServicio de Hematología, Hospital Universitario Ramón y Cajal - IRYCIS, Madrid, Spain, ^fClinical Chemistry, Marrakesh School of Medicine, Marrakesh, Morocco

Metachromatic leukodystrophy (MLD) is a recessive disorder caused by mutations that inactivate both alleles of the *ARSA* gene, encoding the lysosomal enzyme arylsulfatase A. We analyzed five patients from two consanguineous Moroccan families with neurological symptoms and signs suggestive of MLD. Biochemical analysis of arylsulfatase A in urine showed pathologically reduced enzyme activity in the probands as compared with their unaffected siblings, as well as increased urinary excretion of sulfatides. Subsequent next-generation sequencing (NGS) panel-based genetic screening identified in the *ARSA* gene the known missense variant c.640G>A (p.Ala214Thr) and the previously unreported splicing variant c.854 + 1dupG, each segregating in one family as the cause of the reduced arylsulfatase A activity that we had detected. Furthermore, one of the patients harboured a single additional, known pathogenic variant in each of the *MANBA* (underlying beta-mannosidosis) and *GNPTAB* (underlying mucopolysaccharidosis II and III) genes. These additional pathogenic alleles may influence metabolic and clinical presentations. These are the first genetic variants underlying MLD reported in the Moroccan population.

doi:10.1016/j.ymgme.2022.107073

91 Development of high sustained IgG antibody titers against rhGAA in patients with infantile Pompe disease is associated with a shift toward Th2 immune activation

Ankit K. Desai^a, Trevor D. Burt^b, Brian Smith^c, John S. Yi^d, Amy S. Rosenberg^e, Priya S. Kishnani^f, ^aDivision of Medical Genetics, Department of Pediatrics, Duke University, Durham, NC, USA, ^bDivision of Neonatology and the Children's Health and Discovery Initiative, Department of Pediatrics, Duke University School of Medicine, Durham, NC, USA, ^cDivision of Neonatology, Duke University School of Medicine, Durham, NC, USA, ^dDivision of Surgical Sciences, Department of Surgery, Duke University School of Medicine, Durham, NC, USA, ^eEpiVax Inc., Providence, RI, USA, ^fDivision of Medical Genetics, Department of Pediatrics, Duke University Medical Center Durham, Durham, NC, USA

The efficacy of enzyme replacement therapy (ERT) with alglucosidase alfa is limited in some patients due to the development of high and sustained antibody titers (HSAT). The advent of immune tolerance induction (ITI) protocols at the time of ERT initiation prevents the development of HSAT and improves clinical outcomes in infantile Pompe disease (IPD). To determine whether patients with HSAT have unique immunological characteristics and to understand the immune kinetics associated with ITI, we carried out immunophenotyping of circulating cells by flow cytometry and multiplex cytokine array. Forty carefully phenotyped IPD patients were placed into three groups: (1) Treated with ERT alone and had low titers (LT; <12,800) ($n = 20$), (2) ERT + ITI and had LT ($n = 10$), and (3) IPD with HSAT ($\geq 12,800$) ($n = 10$). In patients with HSAT, we observed an increase in Th2 cells (65.48 vs. 55.84%; $P = 0.034$) and decreased Th17 cells (1.01 vs. 4.49%; $P < 0.01$) compared to LT patients. Th2 cell percentage in HSAT patients was positively and significantly correlated with the levels of Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) and pro-inflammatory (ITAC, IL-1 β , MIP-1 β , TNF- α) cytokines. Decreased unswitched memory B cells, myeloid dendritic cells, CD16 + CD56+ NK cells, and terminally differentiated CD8+ TEMRA cells were observed in HSAT patients. A

higher percentage of CD16-CD56++ NK cells, CD4+ T cells, and TNF- α was observed in the ERT + ITI group in comparison to the ERT monotherapy group. A strong correlation between Th2 cells and cytokines in HSAT patients confirms previously published studies in mice that demonstrate an association between antibody formation against ERT and Th2-type immune activation. These data further suggest that adjunct treatments to block Th2 and/or pro-inflammatory cytokines may potentially be considered for treatment in this patient population. Further longitudinal studies are needed to better understand mechanisms leading to both intact and broken immune tolerance in the setting of ERT.

doi:10.1016/j.ymgme.2022.107074

92 Microglia-derived extracellular vesicles promote neuropathology in Sanfilippo syndrome

Chloé Dias^a, Guillaume Morla^a, Nissrine Ballout^a, Christophe Santiago^a, Stéphanie Trudel^b, Jérôme Ausseil^b, ^aInfinity Center, INSERM UMR1291, CNRS UMR5051, Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France, ^bInfinity Center, INSERM UMR1291, CNRS UMR5051, Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France, Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Institut Fédératif de Biologie, CHU Toulouse, Toulouse, France

Sanfilippo syndrome (mucopolysaccharidosis type III, MPS III) is a severe neurological disease that shares common features with adult neurodegenerative disorders. In this syndrome, the progressive accumulation of partially degraded heparan sulphate oligosaccharides (HSO) activates the production of pro-inflammatory cytokines by astrocytes and microglia leading to severe neuroinflammation and oxidative stress, in turn leading to neuronal death. Consistent with our finding that abnormal extracellular HSO accumulation do not induce a direct activation of primary neurons¹, we hypothesize that the triggering and the propagation of neuroinflammation could be enhanced by the secretion of extracellular vesicles (EVs) by the activated microglia, as previously demonstrated in adult neurodegenerative disorders. The objective of the present study was to characterize the cargo of microglia-derived EVs in an *in vitro* model of MPS III. We first isolate EVs subpopulations from culture supernatants of the murine BV-2 microglial cell line treated with urinary GAGs from MPS III patients. By label-free quantitative proteomic using LC-MS/MS and RNA sequencing analysis, we showed that MPS-EVs are enriched with proteins and miRNAs involved in the inflammatory response and more specifically in neuroinflammation. On the other hand, MPS-EVs drive less proteins and miRNAs involved in neurodevelopment pathways, like axonal guidance, neuron differentiation or synaptogenesis. First results obtained by treating primary cortical neurons with EVs extracted from brain tissues of MPS IIIB mouse model showed a higher level of apoptotic, oxidative stress and inflammation mRNA markers compared to brain EVs extracted from wildtype mouse. Our results strongly suggest that MPS-EVs can deliver specific molecular messages to the surrounding naive cells and can actively participate to the propagation of neuroinflammation in Sanfilippo syndrome. MPS-EVs may also play a role in the regression and loss of cognitive and motor skills that occurs in childhood, by directly deprive neurons of neurodevelopmental molecules. ¹Puy *et al.*, *Glia* 2018.

doi:10.1016/j.ymgme.2022.107075

3 ANNEXE 3 : POSTER “MICROGLIA-DERIVED EXTRACELLULAR VESICLES PROMOTE NEUROPATHOLOGY IN SANFILIPPO SYNDROME”

Plus tard, j’ai été sélectionnée pour présenter l’ensemble des résultats obtenus avec le modèle *in vitro* d’EVs de microglie MPS III et proposés à la publication au mois de Mars 2024, au travers d’un poster intitulé « *Microglia-derived extracellular vesicles promote neuropathology in Sanfilippo syndrome* » lors du 1^{er} symposium EViNS (EVs in nervous systems) organisé par la société internationale des EVs (ISEV) à Rome, Italie en Décembre 2023.

J’ai également eu la chance de présenter ces résultats lors d’un short talk au cours du 6^{ème} meeting organisé par la société française des EVs (FSEV) en ligne en Novembre 2023 ainsi qu’au 17^{ème} symposium international sur les MPS et les maladies associées à Würzburg, Allemagne en Avril 2024 sous la forme de poster. Au cours de ce dernier congrès, les travaux exposés sur ce poster ont été récompensés par une présentation orale puis par deux prix du meilleur poster, un décerné par le comité organisateur du symposium et un par la fondation « Brains for Brain ».

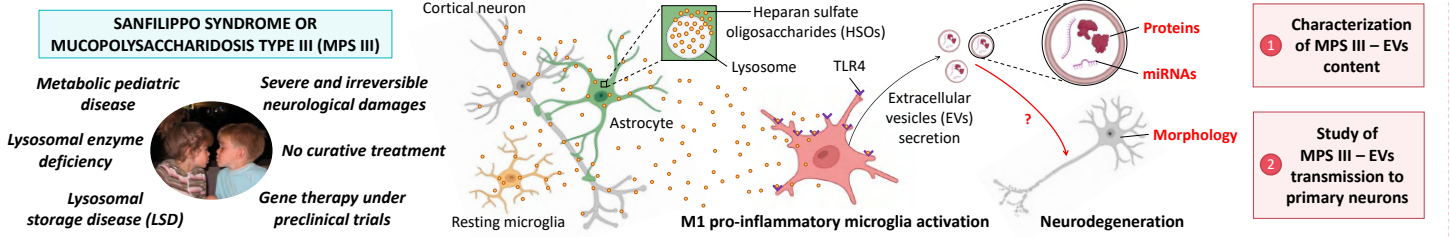
Microglia-derived extracellular vesicles promote neuropathology in Sanfilippo syndrome

Chloé Dias¹, Katia Alileche¹, Guillaume Morla¹, Nissrine Ballout¹, Christophe Santiago¹, Jérôme Ausseil^{1,2}, Stéphanie Trudel^{1,2}

¹ Infinity, INSERM UMR1291 – CNRS UMR5051 – University Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France

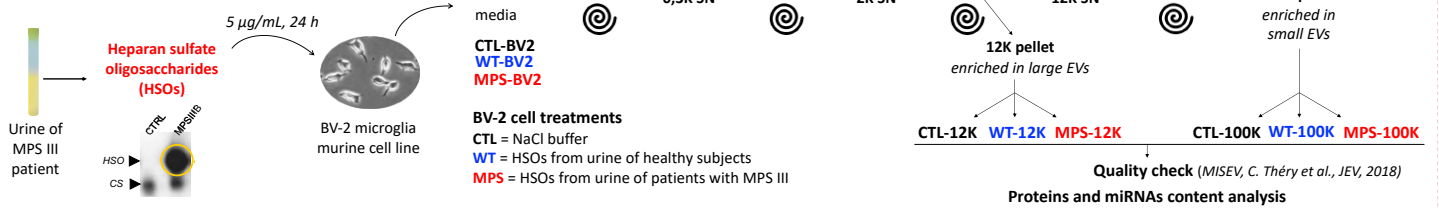
² Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, CHU Toulouse, Toulouse, France

MICROGLIA-DERIVED EXTRACELLULAR VESICLES PARTICIPATE TO NEUROPATHOPHYSIOLOGY IN SANFILIPPO SYNDROME ?



EXPERIMENTAL DESIGN

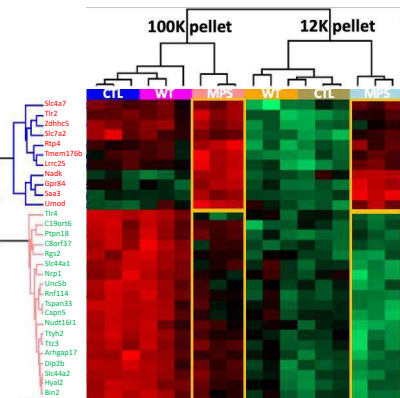
Differential ultracentrifugation (dUC) method



PROTEIN AND miRNAs CONTENT ANALYSIS OF MPS III – MICROGLIA-DERIVED EVs

LC-MS/MS – TimsTOF Pro MS; n=3

Statistics: ANOVA-like, adjusted p-value ≤ 0.05



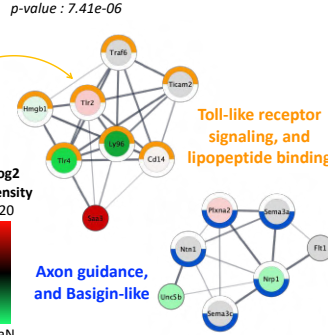
Protein-Protein Interaction Networks and Functional Enrichment Analysis

STRING tool and Cytoscape

Statistics: Minimum required interaction score = 0.4 (medium confidence)

Protein-Protein Interaction (PPI) enrichment

p-value: 7.41E-06

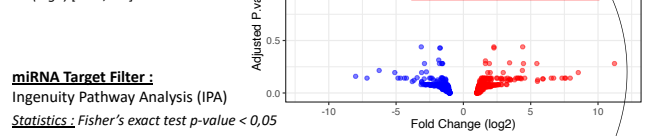


Qiaseq miRNA

Illumina NextSeq 550; n=3

Statistics: ANOVA-like adjusted p-value ≤ 0.1

FC (log2) [-1; >1]

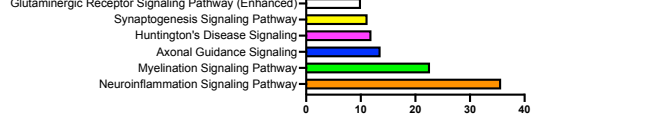


miRNA Target Filter

Inguity Pathway Analysis (IPA)

Statistics: Fisher's exact test p-value < 0,05

Top 10 canonical pathways in nervous system



- Most of the proteins **more** abundant in MPS-EVs are involved in inflammatory response
- Most of the proteins **less** abundant in MPS-EVs are involved in neurodevelopmental mechanisms

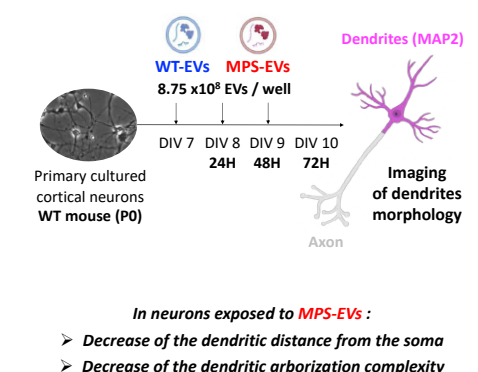
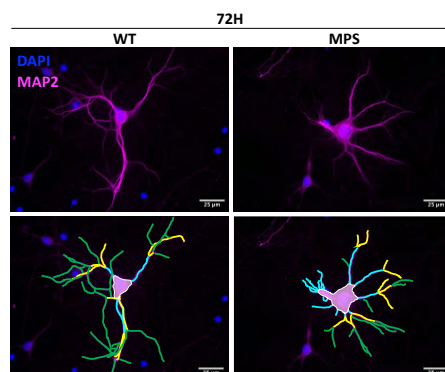
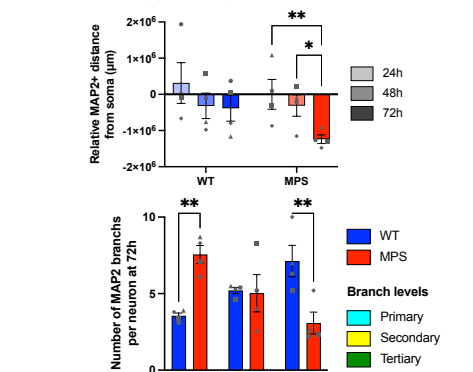
- miR-155-5p and miR-146a-5p target more mRNAs involved in neuroinflammation
- miR-100-5p targets more mRNAs involved in myelination
- miR-221-3p targets more mRNAs involved in axonal guidance

EVs secreted by MPS III-microglia carry a cargo of proteins and miRNAs that participate in inflammatory response and neuronal development

EFFECTS OF MPS III – MICROGLIA-DERIVED EVs ON PRIMARY NEURONS MORPHOLOGICAL ORGANIZATION

Fluorescent microscopy – Zeiss ApoTome 2 and Imaris software; n=4

Statistics: 25 squares mosaic images (10X) or 10 neurons per n (40X), two-way ANOVA, p-value ≤ 0.05



- In neurons exposed to MPS-EVs:
- Decrease of the dendritic distance from the soma
- Decrease of the dendritic arborization complexity

EVs secreted by MPS III-microglia impair dendrites organization and could alter neurotransmission

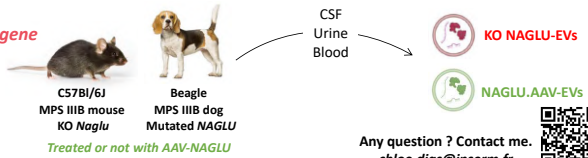
CONCLUSION

- EVs from MPS III-microglia:
 - carry pro-inflammatory cargo
 - are deprived in neurotrophic cargo
- EV-cargo from MPS III-microglia alters neuron morphology

EVs secreted by microglia exposed to HSOs from MPS III patients play a role in the progression of the neuropathology

PERSPECTIVES

EVs as biomarkers of gene therapy efficiency?



Any question? Contact me. chloe.dias@inserm.fr



4 ANNEXE 4 : POSTER “BRAIN-DERIVED EXTRACELLULAR VESICLES PROMOTE NEUROPATHOLOGY IN A MOUSE MODEL OF SANFILIPPO SYNDROME”

Finalement, le travail de transcriptomique de neurones corticaux primaires traités par des vésicules *ex vivo* isolées à partir de cerveaux de souris MPS IIIB nommé « *Brain-derived extracellular vesicles promote neuropathology in a mouse model of Sanfilippo syndrome* » a aussi eu l’opportunité d’être présenté deux fois à la communauté scientifique. Lors du 1^{er} symposium EViNS à Rome, Italie en Décembre 2023 puis au 17^{ème} symposium international sur les MPS et les maladies associées à Würzburg, Allemagne en Avril 2024.

Ces résultats ont été illustrés puis présentés à l’oral par Katia Alileche – à présent étudiante en thèse – que j’ai co-encadrée lors de son stage de M2 dans notre laboratoire et qui a participé à la réalisation des expérimentations pour mener à bien ce projet.

Brain-derived extracellular vesicles promote neuropathology in a mouse model of Sanfilippo syndrome

Katia Alileche^{1*}, Chloé Dias^{1*}, Nissrine Ballout¹, Jérôme Ausseil^{1,2} and Stéphanie Trudel^{1,2}

¹ Infinity, INSERM UMR1291 – CNRS UMR5051 – University Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France

² Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, CHU Toulouse, Toulouse, France

* These authors contributed equally to this work

Background

Pediatric neurodegenerative disease

Rare disease: 1/100,000 births

Cognitive and motor decline

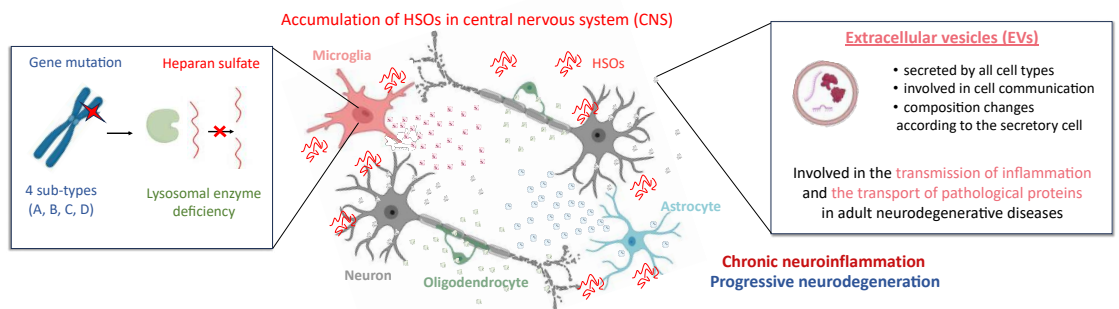
Premature death of the child

Lysosomal storage disease

Accumulation of partially degraded heparan sulfate oligosaccharides (HSOs)

No etiological treatment, on going gene therapy preclinical study

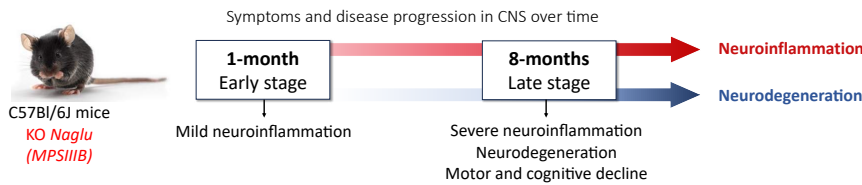
Pathophysiology of Sanfilippo syndrome (Mucopolysaccharidosis type III, MPSIII)



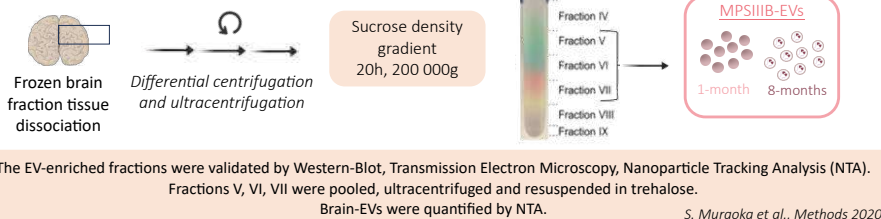
Extracellular vesicles participate to the disease onset and progression in Sanfilippo syndrome?

Experimental design

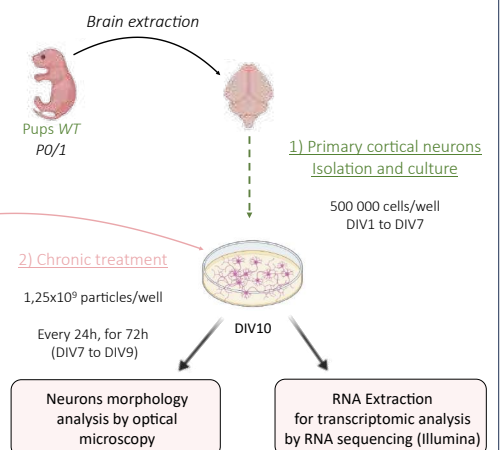
Mouse model of Sanfilippo syndrome type B



Brain-derived EVs isolation



Treatment of primary neurons with MPSIIIB-EVs

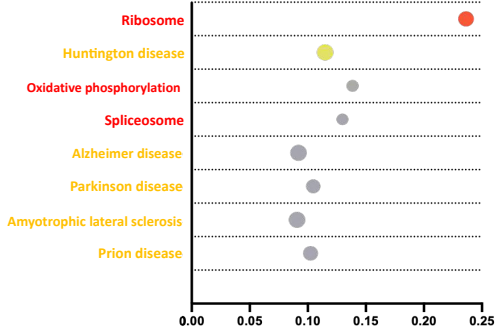


Transcriptomic analysis by RNA sequencing

Functional enrichment analysis of differentially expressed neuronal genes between MPSIIIB-EVs and WT-EVs treatment conditions at 1 and 8 months

Tool : STRING
Data base : KEGG pathways
ANOVA-like, n = 4, p-value < 0.05

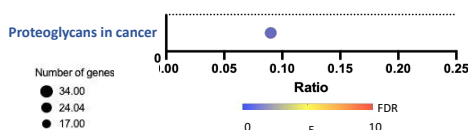
Neurons treated with 1-month MPSIIIB-EVs



Overexpression of mRNAs enriched in protein synthesis and ATP production pathways.
Adaptative stress response?

Differential expression of mRNAs common to adult neurodegenerative diseases.
Early initiation of neuronal dysfunction?

Neurons treated with 8-months MPSIIIB-EVs

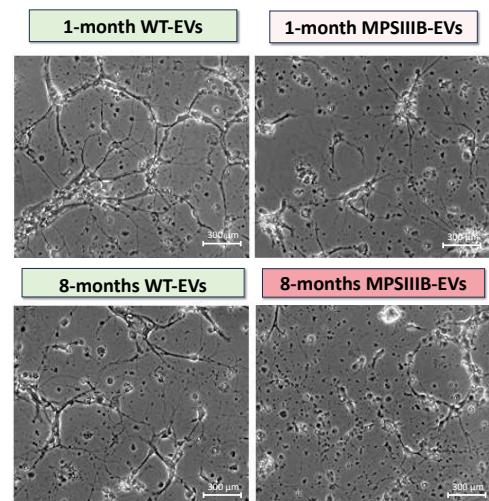


Underexpression of mRNAs involved in cancer cell survival.
Decrease of neuronal survival through Heparan Sulfate ProteoGlycan pathway?

Neurons morphology analysis

Objective: 10X

Phase contrast optical microscopy



Fragmentation of neuronal extensions and increase of debris.
Alteration of neuronal morphology after exposure to MPSIIIB-EVs

Conclusion & Perspectives

- ✓ Effects and content of EVs change according to the stage of the disease
→ EVs as surrogate biomarkers for monitoring gene therapy efficiency
- ✓ EVs participate to the spreading of the disease in Sanfilippo syndrome

→ Analysis of an intermediate stage: 4-months MPSIIIB-EVs (moderate neuroinflammation)

ANNEXES

Titre : Caractérisation des vésicules extracellulaires et étude de leur rôle dans la neuropathologie de la mucopolysaccharidose de type III

Mots clés : Mucopolysaccharidose, Vésicules extracellulaires, Neurodégénérescence, Microglie, Héparane sulfate, Neuroinflammation

Résumé : La mucopolysaccharidose de type III (MPS III) ou syndrome de Sanfilippo est une maladie pédiatrique rare, d'origine génétique, dite de surcharge lysosomale (MSL) et causée par le déficit en enzymes impliquées dans la dégradation de l'héparane sulfate. Le diagnostic tardif et l'absence de traitement curatif entraînent le décès de l'enfant avant l'âge adulte. Cependant les derniers essais cliniques de thérapie génique chez des enfants atteints de MPS III de type B ont donné des résultats prometteurs. L'accumulation progressive d'oligosaccharides d'héparane sulfate (HSOs) anormaux et partiellement dégradés dans le milieu extracellulaire, active directement la production de cytokines pro-inflammatoires par les astrocytes et la microglie. La mise en place précoce d'une neuroinflammation chronique conduit progressivement à la mort neuronale, à l'origine de troubles neurodégénératifs sévères et irréversibles.

Les mécanismes cellulaires liés à la propagation de la neuroinflammation ne sont pas encore élucidés, et une des hypothèses est qu'elle pourrait être médiée par la sécrétion de vésicules extracellulaires (EVs). Chez l'adulte atteint de troubles neurodégénératifs, des travaux récents ont démontré que les EVs provenant de cellules activées et notamment de la microglie, sont chargées d'un contenu moléculaire pathologique spécifique et suscitent un vif intérêt lié à leur utilisation comme biomarqueurs. L'objectif de mon projet de thèse est d'investiguer la contribution des EVs dans la physiopathologie de la MPS III, par i) l'analyse de la composition en protéines et en ARNs des EVs-MPS III et ii) l'évaluation de la réponse biologique des neurones corticaux primaires naïfs au message transmis par ces EVs-MPS III. Dans ce but, j'ai isolé et étudié les EVs provenant de deux modèles de la maladie, le surnageant d'une lignée microgliale activée avec des HSOs de patients MPS III et les tissus cérébraux du modèle murin MPS IIIB.

Par l'analyse de la composition en protéines et micro ARNs des EVs, j'ai pu mettre en évidence que les EVs-MPS III transmettent aux cellules réceptrices du système nerveux central (SNC) un cargo altéré et spécifique impliqué dans la réponse inflammatoire et dans le développement neuronal. Ensuite, grâce à des expériences de transmission des EVs-MPS III sur des neurones sauvages corticaux primaires, j'ai pu démontrer, par microscopie à fluorescence, que la morphologie des compartiments somato-dendritiques est fortement altérée. Ensuite, en utilisant des EVs isolés de cerveaux de souris MPS IIIB âgées de 1 mois, 4 mois et 8 mois, j'ai montré que les EVs induisaient une signature transcriptionnelle des neurones différente en fonction des stades de la maladie.

En résumé, ces résultats suggèrent fortement que chez les patients atteints du syndrome de Sanfilippo, les EVs participent activement à la progression de la pathologie et au dysfonctionnement des neurones, certainement par la propagation de l'inflammation et l'altération des mécanismes de neurotransmission. Mon travail de thèse a permis de décrire dans nos modèles, que les EVs-MPS III transportent un contenu spécifique et caractéristique de la pathologie et de son évolution. Ces découvertes offrent la perspective d'utilisation des EVs comme biomarqueurs d'évaluation de l'efficacité thérapeutique pour les patients inclus dans les futurs essais cliniques.

Title: Characterization of extracellular vesicles and study of their role in the mucopolysaccharidosis type III neuropathology

Key words: Mucopolysaccharidosis, Extracellular vesicles, Neurodegeneration, Microglia, Heparan sulfate, Neuroinflammation

Abstract: Mucopolysaccharidosis type III (MPS III) or Sanfilippo syndrome is a rare pediatric inherited disease classified as a lysosomal storage disorder (LSD), caused by the deficiency of enzymes involved in the degradation of heparan sulfate (HS). Late diagnosis and lack of curative treatment lead to the death of the child before adulthood. However, the latest gene therapy clinical trial in children affected by MPS III type B have showed promising results. The progressive accumulation of abnormal and partially degraded heparan sulphate oligosaccharides (HSOs) in the extracellular space, directly activates the production of pro-inflammatory cytokines by astrocytes and microglia. The early onset of neuroinflammation leads progressively to neuronal death, causing severe and irreversible neurodegenerative deficiencies.

The cellular mechanisms involved in the propagation of the neuroinflammation remains to be elucidated, and one hypothesis is that it could be mediated through the secretion of extracellular vesicles (EVs). In adults with neurodegenerative disorders, recent works demonstrated that EVs, derived from activated cells and in particular from microglia, are loaded with specific pathological molecular content and are arousing great interest for their use as biomarkers. The objective of my PhD is to investigate the contribution of EVs in the pathophysiology of MPS III, by i) analyzing the composition in proteins and RNAs of MPS III-EVs and ii) studying the biological response of naïve primary cortical neurons to the message transmitted by these MPS III-EVs. For this purpose, I isolated and studied EVs from two models of the disease, the supernatant of a microglia cell line activated by HSOs of MPS III patients and the brain tissues of the MPS IIIB mouse model.

By analyzing the proteins and micro RNAs composition of EVs, I was able to demonstrate that MPS III-EVs transmit to the recipient cell of the central nervous system (CNS) a specific and altered cargo involved in inflammatory response and in neuronal development. Then, through transmission experiments of MPS III-EVs to wild-type primary cortical neurons, I was able to demonstrate by fluorescence microscopy, that the morphology of somato-dendritic compartment is strongly altered. Then, using MPS III-EVs isolated from MPS IIIB brains of mice aged of 1 month, 4 months and 8 months, I showed that EVs induced a different transcriptional signature of neuron depending on the stages of the disease.

To summarize, these results strongly suggest that in patients with Sanfilippo syndrome, EVs actively participate to the neuron pathology and dysfunction, certainly through the spreading of inflammation and the alteration of neurotransmission mechanisms. My PhD work is the first report on the content of EVs released by MPS III microglia and reveals a disease-associated signature, providing a framework for future studies on biomarkers to evaluate efficiency of emerging therapies.