



HAL
open science

Caractérisation des vésicules extracellulaires issues du cil primaire et leur implication dans le développement de l'athérosclérose

Megan Piquet

► **To cite this version:**

Megan Piquet. Caractérisation des vésicules extracellulaires issues du cil primaire et leur implication dans le développement de l'athérosclérose. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2023. Français. NNT : 2023ANGE0098 . tel-04755546

HAL Id: tel-04755546

<https://theses.hal.science/tel-04755546v1>

Submitted on 28 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.

THESE DE DOCTORAT

DE
L'UNIVERSITÉ D'ANGERS

SOUS LE SCEAU DE
LA COMUE ANGERS – LE MANS

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie-Santé

Spécialité : Physiologie, Physiopathologie, Biologie Systémique Médicale

Par

Megan PIQUET

**Caractérisation des vésicules extracellulaires issues du
cil primaire et leur implication dans le développement de l'athérosclérose**

Thèse présentée et soutenue à Montpellier, le 27 Octobre 2023

Unités de recherche : Laboratoire Mitovasc « Physiopathologie cardiovasculaire et mitochondriale »

UMR CNRS 6015 ; INSERM U1083

Bâtiment IRIS 2, 3 Rue Roger Amsler, 49100 ANGERS

Laboratoire PhyMedExp « Physiologie & Médecine Expérimentale du Cœur
et des Muscles »

UMR CNRS 9214 ; INSERM U1046 ; Université de Montpellier

371 Avenue du Doyen G. Giraud, CHU Arnaud de Villeneuve, Bâtiment Crastes
de Paulet, 34295 Montpellier

Rapporteurs avant soutenance :

Bernard MULLER Professeur des universités, Université de Bordeaux
Alain LACAMPAGNE Directeur de recherche CNRS, PhyMedExp, Montpellier

Composition du Jury :

Bernard MULLER Professeur des universités, Université de Bordeaux
Alain LACAMPAGNE Directeur de recherche CNRS, PhyMedExp, Montpellier

Dir. de thèse :

Frédéric GAGNADOUX PU PH CHU d'Angers Fonction et établissement d'exercice

Co-dir. de thèse :

Carmen MARTINEZ Directeur de recherche CNRS, PhyMedExp, MONTPELLIER, France

L'auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon les conditions suivantes :



- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

**Consulter la licence creative commons complète en français :
<http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.0/fr/>**



Remerciements

Dans un premier temps, je souhaiterais remercier les membres du jury : le Pr Bernard Muller et le Dr Alain Lacampagne pour avoir accepté d'évaluer et de juger mon travail de thèse. Merci, Alain, de m'avoir permis de finir ma thèse à Montpellier au sein du laboratoire PhyMedExp.

Merci à mes directeurs de thèse : le Pr Frédéric Gagnadoux et le Dr Carmen Martinez.

Pr Frédéric Gagnadoux, pour l'encadrement tout au long de cette thèse et pour m'avoir permis de travailler avec des vésicules de patients.

Dr Carmen Martinez, merci Carmen de m'avoir laissé ma chance en M1 en effectuant mon stage à tes côtés, et merci d'avoir cru en moi pour le projet sur le cil primaire durant ces 4 années. Merci pour toute l'aide que tu m'as apportée durant ces 3 années de thèse si particulières, pour les discussions scientifiques et pour les réunions toujours bienveillantes et constructives. Merci pour ton écoute, ton soutien, ta disponibilité, et tout ce que j'ai oublié. Enfin, comment ne pas te remercier de m'avoir permis de descendre à Montpellier à tes côtés pour poursuivre cette thèse dans les meilleures conditions.

Je tiens ensuite à remercier toutes les personnes qui ont contribué à la réussite de cette thèse,

Le Dr Ramaroson Andriantsitohaina, Naina, merci pour l'aide apportée durant toutes ces années, pour les discussions scientifiques et cette source inépuisable d'idées pour le projet de thèse. Merci pour les séances de running entre 12h et 14h à Angers et les superbes balades à moto à Montpellier. Au plaisir d'en programmer de nouvelles régulièrement.

Merci aux incroyables personnes rencontrées à Angers, Sylvain, Mireille, Luisa, Sakina, Liliana, Thibaud, Merwan, Mathieu, Rose, Corentin.

Sylvain, merci pour tous les conseils aussi bien sur les techniques que sur l'analyse des données. Merci pour ta bienveillance, ta disponibilité, ton aide au cytomètre pour mes brefs retours sur Angers. Merci d'avoir répondu à toutes mes questions, même bêtes.

Mir, comment ne pas te remercier pour tous les bons moments passés à Angers, merci pour ta joie de vivre, les longues discussions toujours incroyables dans les couloirs. Merci pour ton

organisation quasi militaire que j'ai toujours admirée et pour ta disponibilité et ton aide lorsqu'on en avait besoin.

Thibaud, comment ne pas te remercier !! Merci d'avoir été mon acolyte pendant les stages et pendant cette année et demi de thèse à Angers et d'avoir toujours été là par la suite !! Merci pour ton soutien émotionnel, nos 400 coups à SOPAM et pour tous ces moments mémorables. Delaunay to triangle !!

Merci au reste de l'équipe d'Angers qui se reconnaîtra pour l'aide apportée tout au long de ce long fleuve pas très tranquille.

Montpellier : Merci à tous les membres du laboratoire PhyMedExp pour leur accueil incroyable à notre arrivée. Pour leur aide et pour toutes les conversations au détour d'un couloir. Merci en particulier à l'équipe Evmed :

Xavi, on aura traversé beaucoup de choses ensemble !! Merci pour ta gentillesse, pour ton aide et ton soutien aussi bien à Angers qu'à Montpellier. Merci pour ta disponibilité, toutes nos conversations et moments partagés.

Elodie, merci d'avoir été ma "partner in crime" durant cette thèse, merci pour tous ces fous rires et ces "expériences" bien souvent ratées après 18h !! Ce qui se passe à PhyMedExp après 18h reste à PhyMedExp, ... Merci pour ton aide pour les manip, pour les discussions scientifiques ou pas, pour le soutien émotionnel quand c'était nécessaire. Merci de supporter toutes mes bêtises et mes blagues pourries au bureau. Merci pour toutes les soirées incroyables (passées et futures) qu'on a passées avec notre quatuor de choc et les autres. Enfin, juste merci d'être toi !!

Stéphane, Rachel et Louis, merci pour l'aide apportée durant cette thèse sur les différentes manip et pour les animaux.

Merci aux autres doctorants, ingénieurs et chercheurs, techniciens et le pôle administratif pour toute l'aide apportée et les bons moments passés.

Hugo, merci d'avoir le même humour nul à chier que moi, de répondre toujours présent pour faire les 400 coups. Merci pour ton aide et ton soutien sans faille !! Merci pour nos échanges

de réels sans fin et nos discussions profondes dont nous seuls avons la compréhension. Et enfin, merci de faire partie de ce quatuor, ma deuxième famille !!

Elisa, comment écrire des remerciements sans te mentionner !! Merci pour ton aide, pour ces discussions au petit déjeuner et tout au long de la journée. Merci pour le soutien émotionnel sans faille. Comment ne pas se comprendre entre hypersensibles !! Merci pour toutes les soirées passées et futures. On a encore de nombreux projets à réaliser dont on n'a toujours pas fixé la date haha. Merci d'être toi, Elisa, et de faire partie de ce quatuor !!

Merci à ceux qui sont toujours présents, Lamia, Marion, Héloïse, Salomé et tous les autres, pour les bons moments passés ensemble, les randonnées et les soirées. Et merci à ceux qui ne sont plus là mais qu'on revoit de temps en temps, Yvonne, JB (Les compétitions de tir de nerf sur Falcon 50 en salle de réunion me manquent).

Merci à tous les chercheurs et en particulier Seb, Prisca, Sandrine et Pascal, toujours disponibles pour discuter même pendant les pauses repas. Merci pour toute l'aide apportée et les bons conseils.

Enfin, merci aux stagiaires de passage au labo qui sont devenus des amis, Xavier, Vianney et évidemment Jordi et Layla. Jordi, merci pour tous les bons moments, les soirées mémorables et toutes ces fois où tu m'as fait sortir de mes gonds juste pour le plaisir haha. Layla, tu sais déjà ce que je pense de toi !! Merci d'avoir été ma psy et de m'avoir soutenu quand j'en avais besoin. Merci pour tous les bons moments, les fous rires, les soirées passées et à venir.

Enfin, merci à tous les membres de ma famille qui m'ont toujours poussé à donner le meilleur de moi-même.

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| Remerciements | 2 |
| Table des illustrations..... | 9 |
| Liste des tableaux..... | 11 |
| Liste de abréviations..... | 13 |
| Partie I : Introduction bibliographique | 17 |
| I. Le Système vasculaire dans l'athérosclérose | 19 |
| A. Structure du réseau vasculaire | 19 |
| B. La paroi artérielle | 20 |
| 1. Structure d'un vaisseau sain | 20 |
| a) Intima..... | 20 |
| b) Media..... | 21 |
| c) Adventice..... | 21 |
| 2. Réactivité vasculaire | 22 |
| C. La cellule endothéliale | 23 |
| 1. Fonction de l'endothélium..... | 23 |
| a) Endothélium et perméabilité | 24 |
| b) Endothélium et force de cisaillement | 25 |
| 2. Voies de signalisation associées | 27 |
| a) Le monoxyde d'azote..... | 27 |
| D. Physiopathologie de l'athérosclérose..... | 29 |
| 1. Généralité..... | 29 |
| 2. Développement de la plaque..... | 30 |
| 3. Dysfonction endothéliale..... | 32 |
| a) Stress oxydant | 33 |
| (1) Définition | 33 |
| (2) Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) | 33 |
| (3) Rôle physiologique..... | 34 |
| (4) Rôle physiopathologique | 35 |
| 4. Zones prédisposées au développement de l'athérosclérose | 36 |
| a) Courbures et intersections | 36 |
| II. Cil primaire | 38 |
| A. Historique | 38 |
| 1. Les différents types de cils | 39 |
| a) Cil motile..... | 39 |
| a) Cil primaire | 40 |
| B. Structure du cil primaire | 42 |
| 1. Corps basal | 42 |
| 2. Zone de transition | 44 |
| 3. Axonème | 45 |
| 4. Membrane ciliaire..... | 46 |
| C. La ciliogenèse | 48 |

| | | |
|-------------|---|------------|
| 1. | Assemblage du cil..... | 48 |
| a) | Rôle de transport intraflagellaire (IFT) | 49 |
| b) | Le BBSome | 53 |
| 2. | Maintien du cil à la surface des cellules | 54 |
| a) | Contrôle de la longueur des cils | 54 |
| 3. | Désassemblage du cil | 55 |
| D. | Voies de signalisation associées | 57 |
| 1. | Signalisation biochimique : exemple de la voie Hedgehog (HH) | 57 |
| 2. | Signalisation biomécanique : exemple des forces de cisaillements | 59 |
| E. | Au niveau vasculaire | 61 |
| 1. | Cil primaire et développement cardiovasculaire..... | 61 |
| 2. | Cil des cellules endothéliales | 61 |
| 3. | Implication dans le développement de l'athérosclérose | 62 |
| F. | Ciliopathies | 64 |
| 1. | Syndrome de Bardet-Biedl | 64 |
| 2. | La polykystose rénale..... | 66 |
| III. | Vésicules extracellulaires | 68 |
| G. | Biogenèse | 69 |
| 1. | Les petites vésicules..... | 69 |
| 2. | Les grandes vésicules..... | 72 |
| 3. | Les corps apoptotiques | 73 |
| H. | Composition des VEs | 74 |
| 1. | Protéines et lipides associés | 74 |
| 2. | Cytokines associées..... | 75 |
| 3. | Acides nucléiques associés | 75 |
| I. | Devenir des EVs au niveau des cellules cibles | 76 |
| J. | Rôle biologique des VEs..... | 78 |
| 1. | La communication inter-cellulaire..... | 78 |
| 1. | Rôle au niveau cardiovasculaire | 79 |
| K. | Implications physiopathologiques : exemples de l'athérosclérose..... | 80 |
| L. | Vésicules extracellulaire issues du cil primaire | 82 |
| 1. | Historique..... | 83 |
| 2. | Connaissances actuelles..... | 85 |
| | Objectif du travail de thèse | 87 |
| | Partie II : Résultats expérimentaux..... | 89 |
| | Article: Extracellular vesicles derived from primary cilia induce oxidative stress in human endothelial cells | 91 |
| | Partie III : Discussion..... | 131 |
| | Partie IV : Conclusion et perspectives | 147 |
| | Bibliographie..... | 151 |
| | Annexe..... | 175 |

Table des illustrations

| | |
|---|-----------|
| Figure 1 : Structure de l'artère saine..... | 22 |
| Figure 2 : Composition des jonctions interendothéliales.. | 24 |
| Figure 3 : Effet des forces de cisaillement sur les cellules endothéliales..... | 26 |
| Figure 4 : Exemple de récepteurs sensibles aux forces de cisaillement. | 27 |
| Figure 5 : Voie de signalisation du NO : | 29 |
| Figure 6 : Etapes du développement de l'athérosclérose..... | 31 |
| Figure 7 : Zones prédisposées au développement de l'athérosclérose..... | 37 |
| Figure 8 : Structure interne du flagelle..... | 40 |
| Figure 9 : Structure générale du cil primaire | 41 |
| Figure 10 : Structure du corps basal..... | 42 |
| Figure 11 : Différentes voies impliquées dans la formation du cil primaire..... | 43 |
| Figure 12 : Structure de la zone de transition et des différentes protéines impliquées. | 45 |
| Figure 13 : Localisation ciliaire des PtdIns et des phosphatases et kinases associées .. | 47 |
| Figure 14 : Principales protéines impliquées dans l'assemblage du cil primaire..... | 48 |
| Figure 15 : Composition de l'IFT..... | 50 |
| Figure 16 : Mécanisme du transport IFT..... | 52 |
| Figure 17 : Structure du BBSome et ces différentes implications. | 54 |
| Figure 18 : Principales protéines impliquées dans le désassemblage du cil primaire. | 57 |
| Figure 19 : Mécanisme d'activation et de répression de la voie HH. | 59 |
| Figure 20 : Détection des forces de cisaillement par le cil primaire..... | 60 |
| Figure 21 : Rôle protecteur du cil primaire dans le développement de l'athérosclérose. ... | 64 |
| Figure 22 : Différents types de VEs | 69 |
| Figure 23 : Rôle de la machinerie ESCRT dans la formation des vésicules intraluminales ... | 70 |
| Figure 24 : Processus de formation des sVEs..... | 72 |
| Figure 25 : Exemple de voie de biogénèse des sVEs et des IVEs..... | 73 |
| Figure 26 : Composition des VEs..... | 76 |
| Figure 27 : Devenir des vésicules à la surface des cellules cibles. | 78 |
| Figure 28 : Différentes voies de modulation de l'angiogénèse par les VEs..... | 80 |
| Figure 29 : Cycle de vie de l'algue unicellulaire Chlamydomonas et identification des VEs ciliaires..... | 83 |

| | |
|--|------------|
| Figure 30 : Marqueurs et marqueurs candidats des VEs ciliaires..... | 86 |
| Figure 31 Effet du traitement avec le CH ou le MLN4924 sur l'architecture des cellules:.. | 133 |
| Figure 32 : PMPCA ne semble pas être invalidé par siRNA..... | 136 |
| Figure 33 : HUVECs soumises à une fore de cisaillement rotatoire..... | 136 |
| Figure 34 : Analyse par immunofluorescence de la présence des cils à la surface de différents types cellulaires. | 138 |
| Figure 35 : Effet des IVEs sur la formation de structures similaires à des capillaires. | 142 |
| Figure 36 : Effets des VEs sur la prolifération des CML..... | 143 |
| Figure 37 : Effets des VEs sur la migration des CML..... | 144 |
| Figure 38 : Schéma récapitulatif des résultats expérimentaux. | 150 |

Liste des tableaux

| | |
|---|-----------|
| Tableau 1 : Caractéristiques diagnostiques et prévalences dans le syndrome de Bardet-Biedl. | 66 |
|---|-----------|

Liste de abréviations

α TAT1 : α -tubuline acétyltransférase 1

AJ : Jonction adhérente

AKT : Protéine kinase B

AMPK : Protéine kinase activé par l'AMPc

Ang II : Angiotensine II

AurA : Aurora kinase A

BBS : Syndrome Bardet-Biedl

BH4 : Tétrahydrobioptérine

CAT : catalase

CCT: Chaperonine contenant le complexe polypeptidique 1

c-Src : Proto-oncogène tyrosine-protéine kinase Src

CE : Cellule endothéliale

CEP290 : Protéine centrosomale 290

CML : Cellule musculaire lisse

CO₂ : Dioxyde de carbone

EDHF : Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium

EDRF : Facteur relaxant dérivé de l'endothélium

EGFR : Récepteur du facteur de croissance épidermique

EndoMT : Transition endothélio-mésenchymateuse

eNOS : NO synthase endothéliale

ESCRT : Complexe de tri endosomal requis pour le transport

ET-1 : Endothéline-1

FGF : Facteur de croissance des fibroblastes

GCs : Guanylate cyclase soluble

GEF : Facteur d'échange nucléotidique de guanine

GMPc : Guanosine monophosphate cyclique

GPCR : Protéine G couplé aux récepteurs

GPx : Glutathion peroxydase
HAoEC : Cellule endothéliale aortique humaine
HDAC6 : Histone déacétylase 6
HEF1 : Activateur humain de la filamentation 1
HH : Hedgehog
HSP22 : Protéine de choc thermique 22
HUVEC : Cellule endothéliale de veine ombilical humaine
ICAM-1 : Molécule d'adhésion intracellulaire 1
IFN γ : Interféron gamma
IL-1 : Interleukine-1
IL-6 : Interleukine-6
iNOS : NO synthase inductible
INPP5B : Inositol polyphosphate 5-phosphatase B
INPP5E : Inositol polyphosphate 5-phosphatase E
IFT : Transport intraflagellaire
KAP3 : Protéine 3 associée à KIF
IVEs : Grandes vésicules
KIF3A : Membre de la famille kinésine 3A
KIF3B : Membre de la famille kinésine 3B
KLF : Facteur de type krüppel-like
LDL : Lipoprotéine de basse densité
LDLox : Lipoprotéine de basse densité oxydée
MARK4 : Kinase 4 régulant l'affinité des microtubules
Mets : Syndrome métabolique
MKS : Syndrome Meckel Gruber
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NEK : Kinase apparentée à NIMA
Nde1 : Protéine de neurodéveloppement 1 associée à NudE
nNOS : NO synthase neurale

NO : Monoxyde d'azote

NPHP : Néphronophtise

Nrf2 : Facteur nucléaire (dérivé des érythroïdes 2)-like 2

OCRL : Syndrome oculocérébronéphrologique de Lowe

PC1 : Polycystine 1

PC2 : Polycystine 2

PCEAM-1 : Molécule d'adhésion des plaquettes aux cellules endothéliales

PDE : Phosphodiesterases nucléotidiques cycliques

PDGF : Facteur de croissance dérivé des plaquettes

PGI2 : Prostacycline I2

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PKG : protéines kinases dépendantes du GMPc

PLK4 : Polo-like kinase 4

PTCH1 : Patched-1

PtdIns : Phosphoinositides

RNS : Espèces réactives de l'azote

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

SAS6 : Protéine homologue 6 anormale d'assemblage du fuseau

sVEs : Petites vésicules

sGC : guanylate cyclase solubles

shARN : ARN en épingles à cheveux

SHH : Sonic Hedgehog

SMO : Smoothened

SNARE : Récepteur des protéines d'attachement solubles au facteur sensible à la N-éthylmaleimide

SOD : Superoxyde dismutase

STIL : Locus d'interruption de SCL

TGF- β : Facteur de croissance transformant

TJ : Jonction serrée

TNF α : Facteur de nécrose tumorale alpha

TRic : Complexe d'anneau de la protéine polypeptidique 1

TTBK2 : Kinase 2 de la tubuline tau

TULP3 : Protéine de type tubby-like 3

VC : Vésicules ciliaires

VCAM-1 : Molécule d'adhérence cellulaire vasculaire 1

VEs : Vésicules extracellulaires

VEGF: Facteur de croissance endothélial vasculaire

Partie I : Introduction bibliographique

I. Le Système vasculaire dans l'athérosclérose

A. Structure du réseau vasculaire

Avant 1628 on ignore tout du système vasculaire. On pensait alors que le sang était produit par le foie et que le cœur le distribuait aux organes quand ceux-ci en avaient besoin.

C'est un médecin anglais William Harvey (1578-1657) travaillant sur le système veineux et en particulier sur les valves, qui met en évidence la complexité du réseau vasculaire dans son ouvrage intitulé « démonstration anatomique du mouvement du cœur et du sang dans les êtres vivants ». Il démontre par de nombreuses expériences que le sang expulsé par le cœur est distribué aux organes par les artères et qu'il remonte par le biais des veines. Le lien entre les deux types de vaisseaux est cependant inconnu. Il faudra attendre l'étude des organes au microscope pour mettre en lumière la présence des capillaires.

L'approfondissement des recherches sur ce système vasculaire a permis de mettre en évidence son importance dans l'homéostasie cellulaire et l'absorption des nutriments tels que les vitamines et les minéraux mais également dans l'élimination des déchets (Potente, 2011). De par sa complexité, le système vasculaire joue de nombreux rôles physiologiques et de nombreuses pathologies lui sont également associées.

De manière générale, les artères, qui possèdent une paroi épaisse comprenant une couche élastique. Les artères systémiques ont pour rôle principal d'acheminer le sang oxygéné du cœur vers les organes. Il existe une exception pour les artères pulmonaires et ombilicales qui transportent quant à elle le sang désoxygéné vers les poumons permettant sa réoxygénation. Les artères jouent un rôle crucial dans la distribution de nutriments à toutes les cellules, l'élimination du dioxyde de carbone (CO₂) et des déchets, le maintien d'un pH optimal, ainsi que la circulation des protéines et des cellules du système immunitaire. Elles exercent également une fonction essentielle dans la régulation de la pression artérielle.

Les capillaires, prolongements du réseau artériel, assurent la liaison avec les veines. Ces vaisseaux, sont les plus petits de l'organisme. Ils consistent en une monocouche de cellules endothéliales (CE) entourée d'une membrane basale. De par leur structure, les capillaires possèdent une souplesse et une élasticité remarquable, les rendant sensibles aux dommages.

Ils jouent également un rôle vital dans l'acheminement de nutriments et d'oxygène (O₂) aux cellules, la collecte de déchets et de CO₂ qui sera par la suite acheminé aux alvéoles pulmonaires. Quant aux veines, elles assurent le retour du sang vers le cœur. Comparativement aux artères, elles présentent un diamètre plus large, ce qui favorise le stockage sanguin. En outre, les veines ont une pression artérielle environ 90% plus basse que les artères et sont équipées de valvules qui régulent le sens de la circulation sanguine, empêchant le reflux. Les veines possèdent des parois plus minces. Elles contiennent également moins de cellules musculaires lisses (CML) et moins de fibres de collagène que de fibres élastiques, ce qui leur confère une capacité d'extension supérieure à celle des artères.

B. La paroi artérielle

1. Structure d'un vaisseau sain

De manière générale, les vaisseaux sanguins sont constitués de trois couches de différents types cellulaires appelées tuniques. On distingue ainsi, de l'intérieur vers l'extérieur l'intima, la média et l'adventice (Figure 1). Cette structure en multicouche leur confère des propriétés mécaniques uniques, telles que la capacité de s'étirer et de se contracter en réponse aux changements de pression sanguine.

a) *Intima*

La tunique intima est la couche interne de la paroi artérielle. Elle est composée d'une monocouche de CE, qui repose sur une fine couche de matrice extracellulaire appelée lame basale. Les CE, en contact direct avec le flux sanguin, possèdent une couche de glycoprotéine à leur surface appelée le glycocalyx. Ces glycoprotéines vont fournir une barrière protectrice entre l'endothélium et les cellules sanguines permettant ainsi une régulation des échanges à travers les vaisseaux. L'intima remplit de nombreuses fonctions importantes principalement grâce aux CE. Elles permettent, notamment, la régulation du flux sanguin et du tonus vasculaires, la modulation de l'inflammation et de la coagulation, ainsi que la régulation de la perméabilité vasculaire. Elles sont également impliquées dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, un processus appelé angiogenèse. En outre, cette proximité avec la circulation sanguine rend l'intima vulnérable et en particulier au développement de plaques d'athérosclérose et au développement et à la progression de maladies cardiovasculaires.

b) *Media*

La tunique média est la couche intermédiaire de la paroi artérielle, située entre la tunique intima interne et la tunique adventitielle externe. Elle est principalement composée de CML et de fibres d'élastine. Les CML sont organisées en anneaux concentriques autour de la lumière de l'artère. On les retrouve en concentration plus importante dans les vaisseaux de gros calibre qui vont gérer des volumes de sang très importants. La couche de fibres d'élastine et de collagène confère à la paroi artérielle sa résistance et sa flexibilité. Les fibres élastiques permettent à la paroi artérielle de se dilater sous l'effet de la pression sanguine, puis de revenir à sa taille initiale une fois que la pression diminue. Cette élasticité est importante pour assurer un débit sanguin régulier et pour protéger les organes contre les changements brusques de pression sanguine. Elle apporte donc un support structurel nécessaire aux CML. Des perturbations de la couche médiane sont couramment retrouvées. Par exemple, une hypertrophie ou une hyperplasie des CML peut entraîner une augmentation de la résistance vasculaire et une hypertension artérielle. De même, une perte de la flexibilité et de l'élasticité de la couche médiane peut contribuer à la formation de plaques d'athérome.

c) *Adventice*

L'adventice est la couche externe de la paroi des vaisseaux sanguins qui entoure l'intima et la média. Elle est principalement constituée de tissu conjonctif dense et de fibres élastiques ainsi que de fibroblastes, de nerfs et de progéniteurs cellulaires vasculaires. L'adventice a plusieurs fonctions importantes dans le maintien de la structure et de la fonction des vaisseaux sanguins. Elle assure la protection et la stabilité des vaisseaux sanguins, en les reliant aux tissus environnants par l'intermédiaire de tissus conjonctifs. C'est au niveau de l'adventice que l'on retrouve les capillaires formant la *vaso vasorum*, permettant l'apport d' O_2 et de nutriments nécessaires notamment aux vaisseaux de gros calibre qui possèdent une paroi ne leur permettant pas la simple diffusion de l' O_2 et du CO_2 . Des plexus lymphatiques et une innervation importante sont également observés sur la tunique.

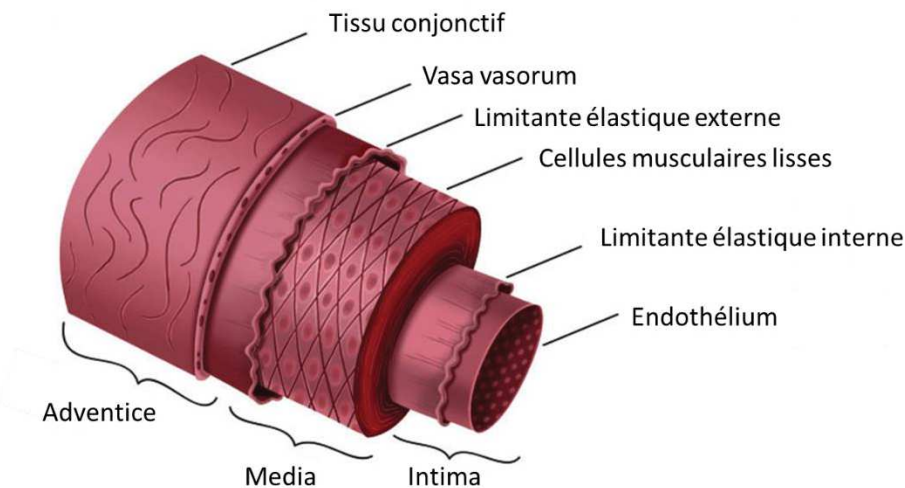


Figure 1: Structure de l'artère saine. La paroi artérielle est composée de trois tuniques : l'adventice, la media et l'intima. D'après Yalcin Enis, 2016

2. Réactivité vasculaire

Le diamètre des vaisseaux est un paramètre important dans l'homéostasie du réseau artérielle. En effet, il va permettre la modulation de la pression artérielle et du débit sanguin dans l'ensemble de l'organisme. Le calibre des artères est régulé par une combinaison de mécanismes locaux et systémiques. Au niveau local, les CML de la couche médiane sont capables de se contracter ou de se relâcher en réponse à des signaux tels que les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs ou les modifications de la pression sanguine. Cette régulation locale permet de répondre aux besoins métaboliques des différents tissus et de maintenir un débit sanguin régulier. Il existe deux grands types d'artères, les artères de conductance et les artères de résistance, avec des rôles différents mais complémentaires. Les artères de conductance ou élastiques sont situées proches du cœur et vont permettre l'acheminement d'un grand volume de sang. On compte parmi ces vaisseaux l'aorte. Les artères de résistance, aussi appelés artérioles, sont des vaisseaux sanguins de petit diamètre qui assurent la transition entre les artères de plus gros calibre et les capillaires. Elles sont considérées comme des vaisseaux de résistance périphériques car ils régulent la résistance vasculaire globale en ajustant le calibre de leurs parois principalement constituées de CML. Les artérioles sont les principaux sites de régulation de la pression artérielle, de par leur capacité de vasoconstriction et de vasodilatation importante. Elles sont également impliquées dans la régulation de la microcirculation, en contrôlant l'apport de sang et d'O₂ aux différents organes. Les artérioles sont capables de réguler leur diamètre de façon autonome, en réponse

à des signaux locaux tels que la concentration d'O₂, de CO₂, de lactate, d'ions Ca²⁺ et de molécules de signalisation telles que le monoxyde d'azote (NO). De plus, des signaux neuronaux et hormonaux peuvent également influencer le tonus vasculaire des artérioles.

C. La cellule endothéliale

1. Fonction de l'endothélium

Les fonctions largement reconnues des CE dans la régulation de l'homéostasie de l'organisme comprennent le contrôle de la perméabilité vasculaire et également la régulation du tonus vasculaire. En termes d'immunologie dans le contexte de l'homéostasie et de la pathologie cardiovasculaire, on peut considérer les CE sous deux angles : d'une part, elles font partie intégrante du système cardiovasculaire et, par conséquent, peuvent participer au développement des maladies cardiovasculaires si elles dysfonctionnent ; d'autre part, elles jouent un rôle actif dans les réponses immunitaires en cas de lésions ou d'infections (Pober, 2007). En conséquence, les lésions, l'hyperactivation et le dysfonctionnement des CE sont souvent impliqués dans l'apparition de maladies cardiovasculaires. Ces deux systèmes interagissent souvent, par exemple, lors de la cicatrisation, mais il existe également des situations où les CE ont des rôles spécifiques dans chacun de ces systèmes, comme pendant le développement et la régénération tissulaire. Les CE isolées de divers tissus manifestent des adaptations spécifiques propres à chaque organe, ainsi que des ajustements dans leur forme et leur fonction. Par exemple, les CE du système nerveux central forment la barrière hémato-encéphalique, les EC utérines expriment des récepteurs aux œstrogènes, les CE de l'endocarde se replient et s'adaptent au rythme cardiaque constant, enfin les CE engagées dans la formation de vaisseaux artériels ou veineux montrent différentes capacités de bourgeonnement (Domigan, 2012 ; Adams, 2007 ; Mickoleit, 2014).

a) Endothélium et perméabilité

Les CE établissent une barrière semi-perméable qui sépare le flux sanguin des tissus sous-jacents. Cette barrière maintient l'adhésion entre les CE et régule le transport de solutés à travers la paroi des vaisseaux sanguins, tout en contrôlant également la migration des leucocytes (Clæsson-Welsh, 2015 ; Goswami, 2016). Cette barrière se compose de divers types de jonctions : les jonctions serrées, également appelées "tight junctions (TJ)", les jonctions adhérentes, ou "adherens junctions (AJ)", ainsi que les jonctions lacunaires ou "Gap junctions". Elle inclut également une variété d'autres molécules, telles que PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule) et les nectines, qui sont reliées au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire de différentes molécules adaptatrices. L'architecture et la composition de ces jonctions entre les cellules varient en fonction des besoins spécifiques des organes dans les différents lits vasculaires (Engelhardt, 2004). (Figure 2)

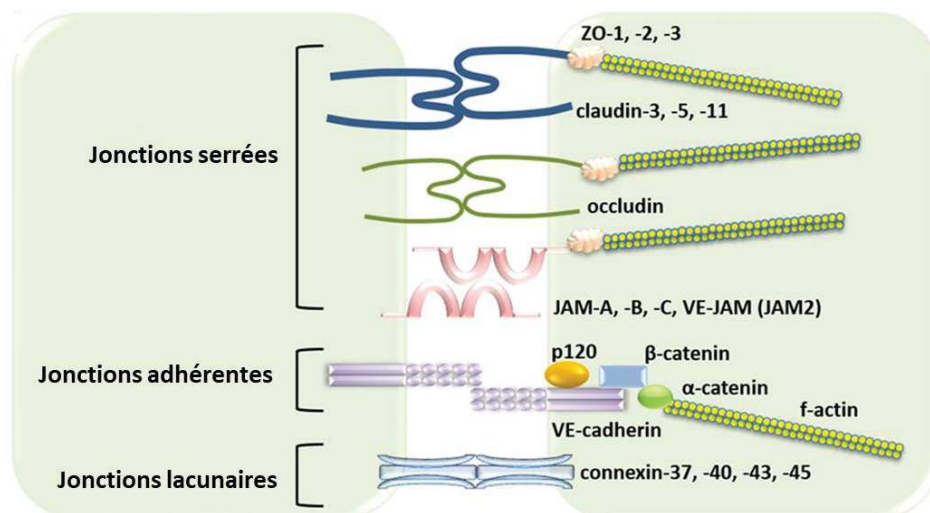


Figure 2: Composition des jonctions interendothéliales. Représentation schématique des jonctions interendothéliales composées de jonctions serrées, de jonctions adhérentes et de jonctions lacunaires. Les jonctions serrées sont formées par des protéines d'adhésion telles que les claudines, l'occludine et les JAM (junctional adhesion molecules). Les protéines Zonula occludens (ZO-1, ZO-2, ZO-3) relient les molécules d'adhésion au cytosquelette d'actine. Les jonctions adhérentes sont composées de la VE-cadhérine associée à la β-caténine et p120. L'α-caténine se lie à la β-caténine pour relier les jonctions adhérentes au cytosquelette d'actine. Les jonctions lacunaires sont formées des hexamères de connexine. D'après Komarova, 2017.

La perméabilité vasculaire peut être influencée directement par des molécules qui provoquent la désintégration de la barrière. La perméabilité peut également être régulée

indirectement par la pression artérielle et le flux sanguin. Une augmentation du débit sanguin, par exemple à la suite d'une vasodilatation, augmentera la perméabilité vasculaire (Baskurt, 2004). Les régulateurs moléculaires de la perméabilité vasculaire comprennent des facteurs de croissance et des cytokines inflammatoires. Par exemple, le composant principal des AJ est la VE-cadhérine, une protéine transmembranaire qui forme des complexes homophiles entre les CE. Ces jonctions se dissolvent en réponse à un certain nombre de stimuli, y compris le VEGF (Facteur de croissance endothélial vasculaire) et les cytokines inflammatoires TNF α (Facteur de nécrose tumorale alpha), l'interleukine (IL)-1 et l'IL-6 ainsi que l'histamine et la bradykinine, pour permettre l'extravasation des macromolécules (Dejana, 1999). Ces stimuli provoquent l'internalisation de la VE-cadhérine, par des mécanismes encore discutés. L'hypothèse principale est la phosphorylation directe ou indirecte de la VE-cadhérine par c-Src (Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src) (Orsenigo, 2012).

b) Endothélium et force de cisaillement

Les forces de cisaillement exercées sur les vaisseaux sont principalement ressenties par les CE. Ces forces correspondent à la friction exercée par le flux sanguin contre la paroi vasculaire. Elle est déterminée, selon la loi de Poiseuille (flux laminaire), par le débit (Q), la viscosité sanguine (μ) ainsi que le rayon du vaisseau (r) : $\tau = 4\mu Q/\pi r^3$. Chez l'Homme cette force de cisaillement est comprise entre 1 à 2 Pa soit 10 à 20 dyne/cm² (Dewey, 1981). D'après cette formule, il est donc facile de comprendre que des variations dans le diamètre des vaisseaux vont entraîner d'importantes modifications dans les forces de cisaillements associées. De plus, cette variation est également observée en fonction du type de vaisseaux mais également de la région vasculaire. Par exemple, cette force est de 10 dyne/cm² dans l'aorte et monte jusqu'à 50 dyne/cm² dans les artérioles chez l'homme. En revanche, dans la circulation veineuse, les forces de cisaillement sont moins élevées et varient entre 20 dyne/cm² dans les veinules et 1 dyne/cm² dans les veines caves chez l'Homme (Givens, 2016). Deux principaux types de forces sont observés au niveau du réseau artériel. Au niveau des courbures de l'aorte, des bifurcations, et des embranchements, les forces de cisaillement sont plus faibles et présentent une distribution inégale en raison des flux sanguins perturbés, avec des valeurs allant de 0 à 5 dyne/cm². En revanche, dans les segments droits des artères tels que l'aorte abdominale, le flux sanguin est unidirectionnel, ce qui crée des forces de cisaillement qualifiées de laminaires, atteignant ainsi des valeurs jusqu'à 15 dyne/cm² (Malek, 1999a).

Les CE répondent à ces forces en modifiant leur morphologie. Celles-ci vont s'aligner dans le sens du flux et s'allonger, ayant un phénotype quiescent les CE vont posséder des propriétés anti-thrombotiques, anti-prolifératives et anti-inflammatoires maintenues à travers l'expression des facteurs de transcription KLF (Facteur de type krüppel-like) 2 et 4. A noter que dans des conditions de faibles contraintes de cisaillement, ces cellules perdent leur capacité d'adaptation (Remuzzi, 1984). De plus, ces forces provoquent une réduction de l'expression des facteurs KLF, ce qui génère un phénotype caractérisé par la prolifération des CE et associé à des propriétés pro-inflammatoires et pro-coagulantes (Malek, 1999a).(Figure 3)

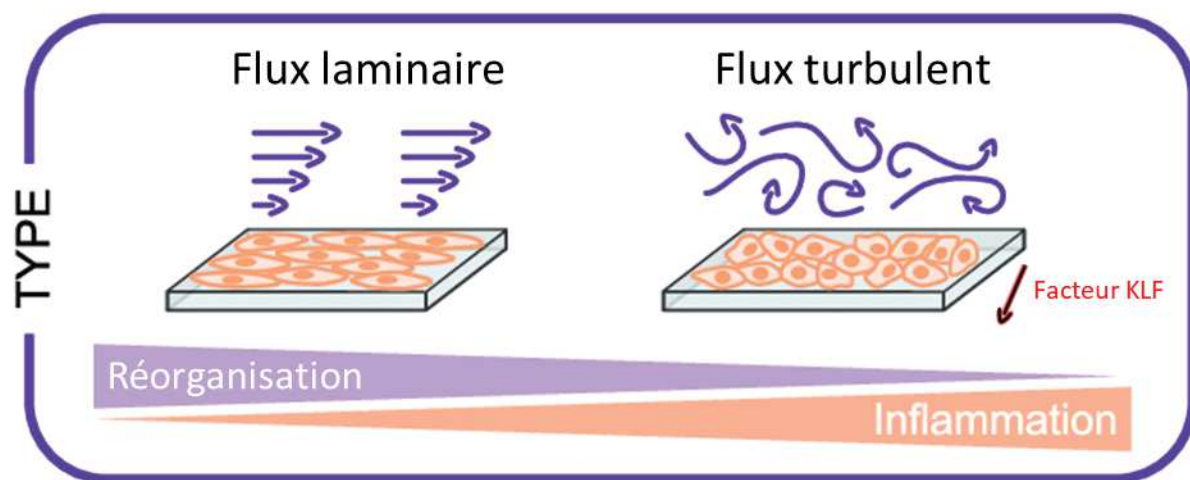


Figure 3: Effet des forces de cisaillement sur les cellules endothéliales. D'après Dessalles, 2021

Pour percevoir ces forces, les CE disposent d'un arsenal de capteurs comme le cil primaire qui sera détaillé par la suite (chapitre II), les intégrines, les molécules de jonctions, les canaux ioniques, les récepteurs aux tyrosines kinases ou aux protéines G, les cavéoles ou encore le glycocalyx. Par exemple, les intégrines constituées d'une sous-unité α et d'une sous-unité β forment des complexes en association avec diverses protéines du cytosquelette, formant ainsi des sites d'adhésion focale (Horwitz, 1993). L'activation de ces sites d'adhésion par les contraintes de cisaillement joue un rôle essentiel non seulement dans l'ancrage des cellules à leur substrat, mais aussi dans la transmission de signaux mécaniques à l'intérieur de la cellule, ce qui entraîne des modifications du cytosquelette permettant l'orientation des CE dans la direction du flux (Li, 2002).

De ce fait, selon la région spécifique de la circulation sanguine prise en compte et le type de force de cisaillement auquel elles sont exposées, un ou plusieurs mécanorécepteurs peuvent être activés, ce qui déclenche des voies de signalisation reflétant les réactions des CE en réponse à l'intensité et à la nature de la force de cisaillement rencontrée. (Figure 4)

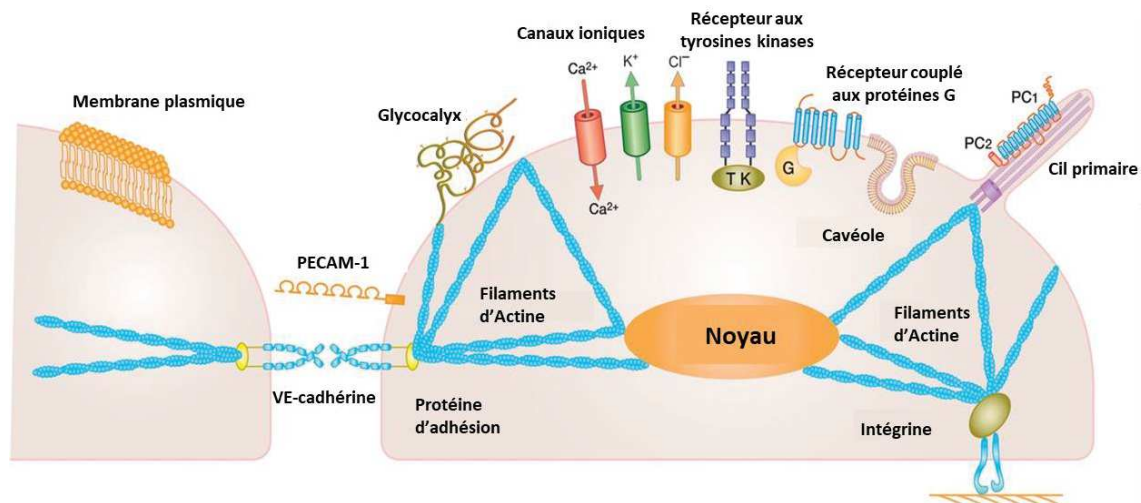


Figure 4: Exemple de récepteurs sensibles aux forces de cisaillement. D'après Ando, 2013

2. Voies de signalisation associées

L'endothélium joue un rôle essentiel dans la médiation des facteurs solubles, qu'ils soient produits par les CE ou non, qui régulent le tonus vasculaire, l'hémostase et la prolifération des cellules vasculaires. L'équilibre de ces processus est préservé, d'une part, grâce à un état vasodilatateur maintenu par des facteurs tels que le NO, l'EDHF (Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium) et la prostacycline I₂ (PGI₂), qui sont associés à des effets anti-oxydants, anti-inflammatoires et antithrombotiques, et, d'autre part, à un état vasoconstricteur favorisé par d'autres facteurs comme l'endothéline-1 (ET-1), l'angiotensine II (Ang II) et le thromboxane A₂, qui sont liés à des effets pro-oxydants, pro-inflammatoires et pro-thrombotiques (Strijdom, 2009). Ces facteurs solubles agissent simultanément sur le tonus vasculaire, qui dépend de l'état contractile des CML, ainsi que sur la régulation du flux sanguin.

a) Le monoxyde d'azote

Le NO d'origine endothéliale est découvert par Furchgott et Zawadzki (1980). Les deux chercheurs démontrent que l'acétylcholine exerce un effet vasodilatateur via la sécrétion d'EDRF (Facteur relaxant dérivé de l'endothélium). Plus tard, les travaux de Palmer (1987) et Ignarro (1987) démontrent que cet EDRF est le NO, une espèce radicalaire gazeuse.

Le NO est produit en continu par l'endothélium à partir de l'enzyme NO synthase endothéliale (eNOS), qui convertit la L-arginine en NO et L-citrulline en présence de son cofacteur, la tétrahydrobioptérine (BH₄). Cette enzyme est présente sous forme de monomères et de dimères localisés dans les cavéoles. Seule la forme dimérisée est capable de générer du NO (Andrew, 1999). La synthèse de NO par l'endothélium dépend non seulement de la quantité d'enzyme présente, mais aussi de son activité. Un des principaux facteurs physiologiques qui régule l'expression de l'enzyme est le flux sanguin. En effet, une augmentation des contraintes de cisaillement, grâce à un mécanisme dépendant du Ca²⁺ modulé par la voie PI3K/AKT (Phosphoinositide 3-kinase/ Protéine kinase B), induit l'expression du gène de la eNOS (Malek, 1999a). L'activité de l'enzyme est influencée par plusieurs facteurs, notamment la concentration de Ca²⁺ dans le cytosol, la phosphorylation, la dimérisation et la S-nitrosylation de l'enzyme. En plus de la eNOS, il existe deux autres isomorphes de la NOS : la NOS neuronale (nNOS) et la NOS inductible (iNOS), cette dernière étant présente dans les macrophages (Stuehr, 1997).

La production de NO à l'intérieur de la cellule est soigneusement régulée pour assurer une fonction appropriée du NO. En conditions physiologiques, de faibles concentrations de NO (10 nM) générées par l'eNOS agissent comme des vasodilatateurs et inhibent l'agrégation plaquettaire. En revanche, l'activation de l'iNOS dans les macrophages, induite lors de processus physiopathologiques tels que l'inflammation, produit des concentrations nettement plus élevées de NO (> 1 μM) et est associée à la fonction cytotoxique des macrophages, contribuant ainsi à la défense ultime de l'organisme. L'expression de l'iNOS est faible en conditions physiologiques, mais elle est induite par certaines cytokines inflammatoires telles que IL-1, l'interféron gamma (IFNγ), le TNFα, et les agents oxydants. L'effet du NO dépend de l'endroit où il est produit, de sa concentration et du type de tissu qu'il cible. Le NO libéré par l'endothélium stimule la guanylate cyclase soluble (GCs), entraînant la production de concentrations élevées de guanosine monophosphate cyclique (GMPc). Le GMPc interagit avec trois catégories de protéines intracellulaires : les protéines kinases dépendantes du GMPc (PKG), les canaux ioniques régulés par le GMPc, et les phosphodiésterases nucléotidiques cycliques (PDE) régulées par le GMPc. Ainsi, le GMPc peut influencer la fonction cellulaire via des mécanismes qui dépendent ou non de la phosphorylation des protéines. Selon le site où la GMPc est activée, différents effets

biologiques peuvent être observés. Au sein des CML vasculaires, une augmentation des concentrations de GMPc active les kinases dépendantes du GMPc, entraînant une diminution du Ca^{2+} intracellulaire, ce qui permet une relaxation cellulaire (Moncada, 1991). (Figure 5). En revanche, au niveau des plaquettes, une augmentation du taux de GMPc réduit l'activation des plaquettes et leur adhésion à la surface de l'endothélium (Radomski, 1993).

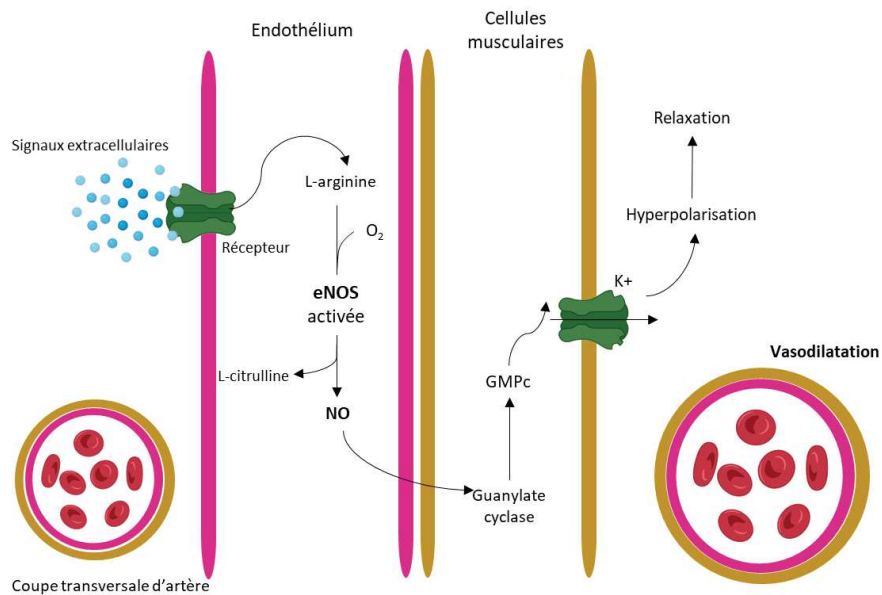


Figure 5: Voie de signalisation du NO : Les signaux du milieu extracellulaire tel que l'augmentation des forces de cisaillement permettent l'activation de la eNOS et la synthèse de NO. Le NO libéré va stimuler la guanylate cyclase qui va produire en grande quantité du GMPc. Ce GMPc va moduler la fonction cellulaire en induisant par exemple une vasodilatation.

D. Physiopathologie de l'athérosclérose

1. Généralité

L'athérosclérose est la principale cause de mortalité dans les nations développées et en voie de développement, constituant 32 % de l'ensemble des décès, selon les données de l'Organisation mondiale de la santé. L'athérosclérose représente une maladie inflammatoire complexe et chronique des artères. Elle se caractérise par le développement de plaques fibro-graisseuses dans la paroi des vaisseaux. À mesure que ces plaques progressent, la paroi des artères se rigidifie, provoquant un rétrécissement de la lumière artérielle. Dans certains cas, les plaques peuvent se rompre ou s'éroder, entraînant des conséquences cliniques graves, telles que l'infarctus du myocarde, l'accident vasculaire cérébral ischémique et la maladie artérielle périphérique. Ces pathologies figurent parmi les principales causes de décès dans le monde (Herrington, 2016). Cependant, de nombreuses zones de flou sont encore présentes

autour de cette pathologie. Par exemple, l'initiation de la formation des lésions d'athérosclérose chez les individus demeure incertaine, il est en revanche bien établi que les premières lésions peuvent être présentes dès la petite enfance chez l'Homme (Imakita, 2001). Cependant, il reste à déterminer si de telles lésions précoces évoluent en complications cliniques ultérieures. La toute première étude expérimentale sur l'athérosclérose utilisant des animaux a été menée il y a 113 ans par Ignatowski, qui fut le premier à démontrer que l'alimentation à base de jaunes d'œufs peut induire l'athérosclérose chez les lapins (Kapourchali, 2014). Par la suite, de nombreuses autres découvertes ont façonné les connaissances de la pathologie qu'est l'athérosclérose. Bien que ne nombreux mécanismes restent encore incertains ou non compris, les bases de la pathologie sont bien établies.

2. Développement de la plaque

L'événement initial du développement de la pathologie est l'infiltration des LDL (lipoprotéine de basse densité) dans l'espace sous-endothéliale au niveau des zones de dysfonctionnement endothéliale où ils subissent une oxydation. Par la suite les cellules mononucléaires (en majorité des monocytes accompagnés d'un petit nombre de lymphocytes) adhèrent aux CE de l'*intima* et migrent dans l'espace situé sous la couche intimale. C'est là que les monocytes subissent leur différenciation pour devenir des macrophages. Ce sont ces derniers qui captent les lipides, notamment les lipoprotéines de basses densités oxydées (LDLox) et autres lipoprotéines athérogènes, et adoptent l'apparence de cellules spumeuses, formant ainsi les stries graisseuses. Ce phénomène constitue la caractéristique principale de l'athérosclérose précoce, à savoir la formation de ces stries graisseuses (Watanabe, 1989). Ces LDLox initient une série d'activités favorisant l'inflammation et la coagulation, contribuant d'abord à l'établissement puis à l'expansion de la plaque d'athérome. En effet, ces LDLox stimulent l'expression de ICAM-1 (molécule d'adhésion intracellulaire 1) et VCAM-1 (molécule d'adhérence cellulaire vasculaire 1) à la surface des CE. Ce processus entraîne le recrutement, l'adhésion et la migration des monocytes, ainsi que la libération de chimiokines. Les monocytes infiltrés subissent ensuite une différenciation en macrophages qui expriment des récepteurs scavenger, permettant ainsi l'internalisation des LDLox et la formation de cellules spumeuses. L'accumulation de ces macrophages contribue à l'évolution de la lésion en produisant des facteurs de croissance tels que le PDGF (facteur de croissance dérivé des plaquettes), le TGF- β (facteur de croissance transformant) et le FGF (facteur de croissance des

fibroblastes). Cette sécrétion de facteurs de croissance, associée aux chimiokines, entraîne une modification du phénotype des CML vasculaires qui passent d'un état contractile et différencié à un état synthétique, prolifératif et inflammatoire. Ces cellules contribuent à la formation de la chape fibreuse qui enveloppe le cœur lipidique constitué des cellules spumeuses (Lillis, 2015). Cependant, les CML et la matrice riche en collagène qu'elles génèrent apportent une stabilité aux plaques, offrant ainsi une protection contre des événements beaucoup plus dangereux tels que la rupture de la plaque et la formation de thrombose (Schwartz, 2000). Au cours de l'évolution de l'athérosclérose, les CE, les macrophages et les CML subissent soit une apoptose, soit une nécrose (la première semble prédominer). La désintégration des cellules spumeuses et la perte de CML peuvent avoir des implications néfastes, conduisant à la formation d'un noyau lipidique instable et d'une capsule fibreuse fragile, susceptible de se rompre (Geng, 2002). De plus, l'apoptose contribue significativement à l'activité élevée du facteur tissulaire et à la propension thrombogène du noyau lipidique (Tedgui, 2001). (Figure 6)

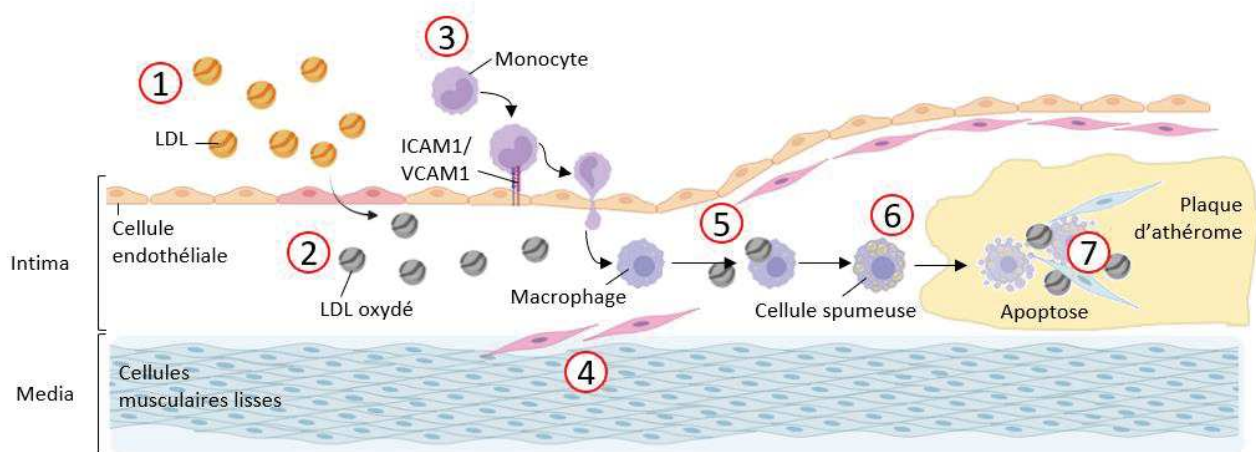


Figure 6:Etapes du développement de l'athérosclérose. Les LDL s'infiltrent dans l'espace sous-endothélial au niveau des zones de dysfonctionnement endothélial (1); les LDL oxydées favorisent l'inflammation (2); les monocytes circulants (3) et les cellules musculaires lisses vasculaires provenant de la média (4) migrent vers la région d'inflammation ; les macrophages captent des particules de LDL oxydées (5) et, éventuellement, se transforment en cellules spumeuses chargées de lipides (6), contribuant au développement de plaques d'athérosclérose (7).

Dans les stades plus avancés de l'athérosclérose, la présence de calcification localisée au sein des plaques d'athérosclérose est fréquente et tend à augmenter avec le vieillissement (Hoffmann, 2003). Le score de calcification de l'artère coronaire, qui mesure la quantité totale de calcification, est un indicateur précieux de la charge de plaque coronaire et fournit des informations pronostiques qui sont parfois bien plus fiables que celles obtenues par

l'évaluation traditionnelle des facteurs de risque ([Pletcher, 2004](#)). La calcification au sein de la plaque présente un certain degré d'activité et de régulation, rappelant ainsi la calcification osseuse, et peut toucher les tissus lipidiques et conjonctifs. Dans les artères coronaires, la présence de calcification est généralement liée à l'athérosclérose.

Par la suite, un processus d'angiogenèse est fréquemment observé dans les stades avancés de l'athérosclérose. Ce processus de prolifération et de germination endothéliale résulte des vasa vasorum présents dans l'adventice, s'étendant ensuite à travers la média jusqu'à la base de la plaque, où la néovascularisation est la plus apparente. Cependant, ces vaisseaux nouvellement formés sont la plupart du temps fragiles et présentent des brèches. Ils expriment des molécules d'adhésion cellulaire telles que VCAM-1, ce qui entraîne une extravasation locale de protéines plasmatiques, d'érythrocytes (entraînant des saignements) et de cellules inflammatoires. Par conséquent, l'angiogenèse et l'inflammation sont souvent simultanées et pourraient potentiellement accélérer la progression de la plaque ([Barger, 1984](#) ; [Virmani, 2005](#)). Bien que les érythrocytes extravasés soient fréquents dans les zones néovascularisées, leur présence ne semble pas être associée à une rupture de la surface de la plaque et/ou à une thrombose ([Davies, 1984](#)).

Enfin, si dans la plupart des cas la majorité des processus décrits précédemment sont asymptomatiques, la rupture de la plaque qui représente le dernier stade de la progression de la plaque est, quant à elle, bien souvent symptomatique. La thrombose qui en résulte peut être mortelle ou non en fonction de l'ampleur de la lésion.

3. Dysfonction endothéliale

En raison de sa position unique entre la circulation sanguine et la paroi vasculaire, l'endothélium pourrait jouer un rôle critique dans le développement et la progression de l'athérosclérose. Cette position lui confère un rôle important dans la régulation du mouvement des cellules inflammatoires entre le sang et les tissus adjacents. En condition saine et intacte, l'endothélium agit comme une barrière sélectivement perméable, empêchant l'adhérence et l'invasion des leucocytes, ainsi que l'agrégation et l'adhésion des plaquettes ([Libby, 2002](#)). Cependant, lorsque l'endothélium subit une dysfonction en réponse au stress hémodynamique (flux sanguin non laminaire) ou chimique (LDLox), l'équilibre vasculaire est perturbé. Cela entraîne une perte des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires et anti-thrombotiques de l'endothélium en raison de la diminution de la biodisponibilité du NO et de

la production de ROS (espèces réactives de l'oxygène), ce qui conduit à une augmentation de l'inflammation vasculaire (Park, 2015). Cette dernière modification altère fortement la balance entre les systèmes pro-oxydant et antioxydant générant ainsi un stress oxydant.

a) *Stress oxydant*

(1) Définition

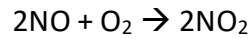
En condition physiologique, il existe une balance entre la production de molécules pro-oxydantes, les ROS et celle de molécules antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et le glutathion peroxydase, ce qu'on appelle plus communément la balance redox. En condition physiopathologique, la production en trop grande quantité de ROS modifie ce statut redox et favorise l'altération cellulaire. Cette modification dans la balance est appelée stress oxydant. Dans les CE, il peut être induit par l'exposition à des facteurs tels que l'oxLDL (Gradinaru, 2015), une glycémie élevée, des acides gras libres (Sun, 2019), l'homocystéine (Xu, 2019), ou encore le vieillissement (Haas, 2020). Il peut entraîner l'apparition de maladies telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives et favoriser le vieillissement.

(2) Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Les ROS constituent un terme global utilisé pour désigner des petites molécules hautement réactives dérivées de l'oxygène. Ces ROS peuvent être classés en deux catégories principales. La première catégorie englobe les radicaux libres, parmi lesquels figurent l'anion superoxyde (O_2^-), le radical hydroxyle ($OH\cdot$), le radical peroxy ($ROO\cdot$) et le radical alcoyle ($RO\cdot$). Ces entités sont des radicaux libres, caractérisés par la présence d'un ou plusieurs électrons non appariés. La seconde catégorie rassemble les non-radicaux, dépourvus d'électrons non appariés. Cela inclut l'oxygène singulet (1O_2), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les peroxydes organiques ($ROOH$) et l'ozone (O_3). Ces espèces non radicalaires ont la capacité de provoquer une oxydation directe et/ou de se transformer en radicaux libres en fonction des conditions environnementales (Bedouhène, 2017). La durée de vie des ROS au niveau biologique varie pour chaque espèce et dépend de facteurs externes tels que la température, la lumière, les agents réducteurs et les ions métalliques (Fu, 1995 ; Headlam, 2003).

La présence de radicaux dans les milieux biologiques ne doit pas automatiquement être associée à la présence de ROS. En effet, la présence de RNS (espèces réactives de l'azote)

parmi lesquelles on retrouve le NO est un exemple de radical RNS qui est capable de diffuser à travers les membranes cellulaires. Les effets du NO sur l'organisme dépendent largement de l'environnement. Par exemple, dans les fluides corporels, de petites quantités de NO réagissent avec l'O₂ pour former du dioxyde d'azote (NO₂·), qui est un radical plus instable :



Cependant, la majeure partie du NO· subit une oxydation pour donner naissance à l'ion nitrite (NO₂⁻) ou interagit avec les groupes hémiques présents dans l'oxyhémoglobine, conduisant à la formation de méthahémoglobine et de nitrate (NO₃⁻) (Cardoso,2022).

(3) Rôle physiologique

Les ROS sont des produits dérivés courants du métabolisme cellulaire, et leurs effets peuvent varier en fonction de leur concentration, allant jusqu'à entraîner la mort cellulaire. Cependant, il est important de souligner que leur production peut également avoir des effets bénéfiques. En effet, ils jouent un rôle crucial en tant que messagers secondaires dans de nombreux processus physiologiques essentiels, tels que la signalisation cellulaire, la prolifération, l'adhésion cellulaire ou encore l'expression génique (Marquitan, 2016 ; Villalpando-Rodriguez, 2021 ; Mittler, 2022). Les phagocytes, par exemple, utilisent l'O₂⁻ en combinaison avec d'autres espèces de ROS pour éliminer les bactéries. De plus, elles contribuent de manière active au système immunitaire en régulant la prolifération et la différenciation des fibroblastes, ainsi qu'en jouant un rôle crucial dans le repliement et la maturation adéquate des immunoglobulines. En conditions biologiques normales, la NADPH oxydase phagocytaire permet de générer l'O₂⁻, qui, en présence de protons, se combine pour former du H₂O₂. De plus, le H₂O₂ peut également réagir avec l'O₂⁻, donnant ainsi naissance aux OH·. Ces radicaux OH· sont ensuite utilisés par la myéloperoxydase pour engendrer un composé puissant, à savoir l'acide hypochloreux (HOCl), qui a la capacité de tuer les agents pathogènes (El-Benna, 2005).

Néanmoins, la source la plus importante de ROS se trouve dans les mitochondries au niveau de la chaîne respiratoire. Environ 2 % de l'O₂ consommé au niveau mitochondrial subit une transformation en radicaux O₂⁻ lors de la première réduction de l'O₂. La production de ces radicaux est assurée par les antioxydants, qui sont régulés en fonction du taux de radicaux

présents. Ainsi, la formation des radicaux O_2^- est contrôlée par des métalloenzymes, les SOD, qui catalysent leur conversion en H_2O_2 . Ce H_2O_2 peut donner naissance, par des réactions de type "réaction de Fenton", au radical $OH\cdot$, qui est l'une des espèces radicalaires les plus nocives du stress oxydant. La quantité de H_2O_2 est régulée par la CAT, qui accélère sa décomposition et par la glutathion peroxydase (GPx), qui facilite sa réduction en utilisant le glutathion. Le glutathion peut également se lier aux ions Cu^{2+} pour limiter leur participation dans la génération d'espèces réactives de l' O_2 via les réactions de type Fenton (Andreyev, 2005).

Malgré les nombreux rôles physiologiques, lorsque la production de ROS est excessive ou lorsque les mécanismes de défense antioxydants sont insuffisants, cela peut entraîner un stress oxydant, qui peut endommager les cellules et contribuer à diverses maladies telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives et le vieillissement.

(4) Rôle physiopathologique

Les ROS produits au sein des CE proviennent principalement de différentes sources telles que la xanthine oxydase, les NADPH oxydases, l'eNOS découplée et les mitochondries dysfonctionnelles (Schulz, 2014). Des niveaux excessifs de ROS ont la capacité d'oxyder les macromolécules, notamment les acides nucléiques, les lipides et les protéines. Des recherches récentes ont mis en évidence que certaines protéines, telles que la clustérine (Ren, 2019) ou la HSP22 (protéine de choc thermique 22) (Yu, 2019) exercent une inhibition sur la production de ROS mitochondriaux, ce qui atténue la dysfonction endothéliale induite respectivement par le diabète et l'angiotensine II. Par ailleurs, la sénescence prématurée des CE peut être induite par des facteurs tels que l'inhibition de la sirtuine 3, la dégradation de Nrf2 (facteur nucléaire (dérivé des érythroïdes 2)-like 2), la production accrue de ROS mitochondriaux et le déficit du facteur 1 d'interaction CR6 (Kim, 2020). De plus, les microARN, agissant comme méta-régulateurs de l'expression génique, ont également un rôle dans la régulation du stress oxydatant et de la fonction endothéliale. Par exemple, le miARN-92a favorise le stress oxydatif et accélère la dysfonction endothéliale (Shang, 2017), tandis que le miARN-195-5p préserve la fonction endothéliale (Xu, 2020). Enfin, il a été démontré qu'une perturbation des niveaux de S-adénosylhomocystéine, précurseur de l'homocystéine, par l'intermédiaire d'une inhibition de l'activité de la S-adénosylhomocystéine hydrolase à l'aide d'shARN (ARN en épingles à

cheveux), induit un dysfonctionnement endothélial chez la souris. Ce mécanisme semble être médié par la régulation à la hausse de p66shc (Xiao, 2019).

Dans le contexte de l'athérosclérose la production de ROS est fortement augmentée par le biais de plusieurs mécanismes. En plus de la baisse d'expression de la eNOS et donc de la production de NO, celle-ci peut également être découplée ou être en manque de l'un de ces substrats. Cela entraîne la production d'O₂⁻ (Vásquez-Vivar, 1998). De plus, la diminution des contraintes de cisaillement entraîne une augmentation de l'activité de la NADPH oxydase par la dérégulation de l'activité AMPK/Ras générant ainsi la production de ROS (Wang, 2010) La diminution du NO et la production de ROS favorisent le passage des CE dans un état apoptotique. En effet, le NO permet d'inhiber l'activation des voies pro-apoptotiques notamment induites par le TNF α . En revanche, les ROS vont favoriser leur activation et le recrutement de molécules pro-apoptotiques et pro-inflammatoires. Récemment, il a été montré que l'Ang II provoque l'apoptose des CE tout en stimulant la production de ROS, conduisant à une diminution de la viabilité cellulaire. Dans ce contexte, la surexpression de la sirtuine 6 s'est avérée avoir un effet protecteur en favorisant l'activation de la voie de signalisation de Nrf2/ARE (Yang, 2019). Une autre étude intéressante montre que lors de l'inflammation chez la souris, l'apoptose induite par le TNF α peut être prévenue par l'expression de TGF- β (Naito, 2019).

4. Zones prédisposées au développement de l'athérosclérose

a) *Courbures et intersections*

Les plaques d'athérosclérose ont tendance à se former principalement dans les vaisseaux de calibres moyens et grands, avec une préférence particulière pour les zones de bifurcation et de courbure, telles que la crosse aortique. Comme décrit précédemment, ces zones sont considérées comme pro-athérogènes en raison de la présence d'un flux sanguin oscillatoire ou turbulent, ce qui entraîne des contraintes de cisaillement relativement faibles (Figure 7). Les CE, qui tapissent la paroi interne des vaisseaux sanguins, possèdent divers récepteurs, notamment des mécanosenseurs, qui ont la capacité de détecter les signaux mécaniques, tels que le flux sanguin. Ces signaux mécaniques peuvent déclencher des modifications fonctionnelles et phénotypiques au niveau de l'endothélium vasculaire.

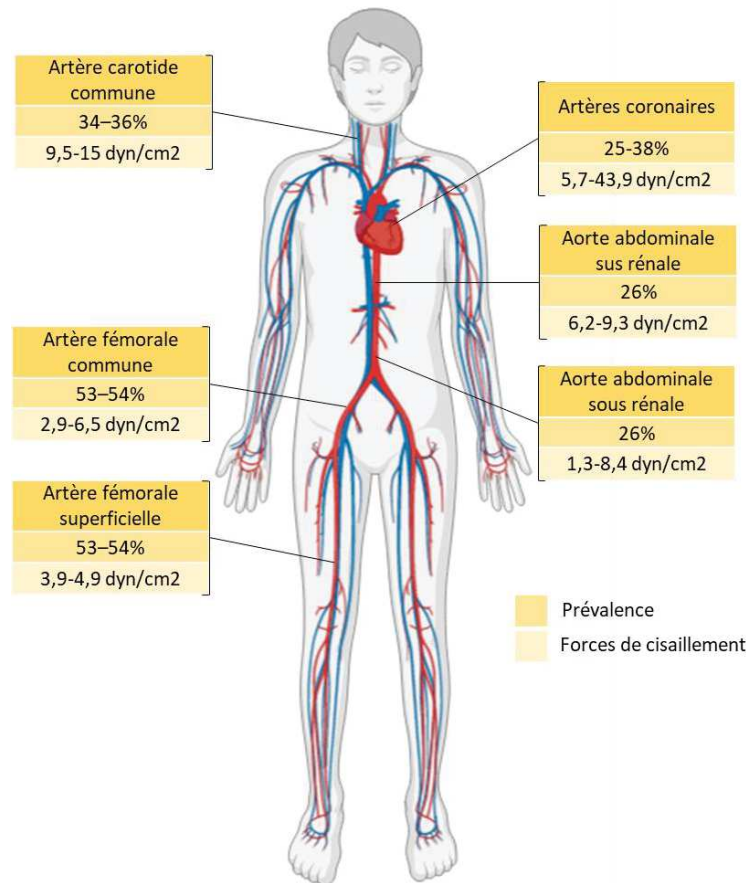


Figure 7: Zones prédisposées au développement de l'athérosclérose. Zones courantes du développement de l'athérosclérose, avec la prévalence associée chez les adultes d'âge moyen rapportée dans les études AWHS (Aragon Workers' Health Study) et PESA (Progression of Early Subclinical Atherosclerosis) et les plages des contraintes de cisaillement. (Fernández-Friera, 2015 ; Laclaustra, 2016)

Il a été démontré que les régions pro-athérogènes, caractérisées par un flux sanguin non laminaire, sont associées à une altération de la fonction endothéliale. Cela se traduit par une augmentation de la perméabilité de la paroi endothéliale, une prolifération cellulaire accrue ainsi que des fonctions adhérentes et coagulantes plus prononcées (Chiu, 2011). En revanche, les zones antiathérogènes, où le flux sanguin est laminaire et les contraintes de cisaillement sont plus élevées, maintiennent une fonction endothéliale normale. En d'autres termes, l'endothélium dans ces zones reste relativement imperméable aux cellules circulantes et régule efficacement les fonctions procoagulantes et prolifératives. Il est important de noter que ces différences entre zones pro-athérogènes et antiathérogènes contribuent à la prédisposition des endroits spécifiques où les plaques d'athérosclérose ont tendance à se former dans les vaisseaux sanguins (Malek, 1999b).

II. Cil primaire

A. Historique

Le cil primaire est une organelle complexe hautement conservée chez les mammifères au cours de l'évolution. Aujourd'hui, il est au cœur de nombreuses études. Cependant, sa découverte remonte à presque 350 ans. On doit probablement la première observation de cette organelle à Antony Van Leeuwenhoek en 1675. Il étudie alors de petits organismes dans l'eau de pluie et décrit des protozoaires « munis de divers pieds incroyablement fins, ou de petites jambes, qui se déplaçaient avec beaucoup d'agilité » ([traduit d'une lettre écrite par Leeuwenhoek en 1676](#)). Le terme cil sera, quant à lui, employé pour la première fois par Otto Friedrich Muller en 1786.

À cette époque, la distinction entre cil et flagelle n'est pas claire. C'est en 1898, en s'appuyant sur les travaux de nombreux chercheurs avant lui, que Karl Wilhelm Zimmermann, cité comme le découvreur du cil primaire, fait pour la première fois la distinction entre cil non motile et cil motile. Il nomme cette structure immobile, flagelle central. Ses nombreuses études, sur les cellules mésangiales et la juxtaglomérulaire, lui ont même permis de prédire le rôle sensoriel de ce flagelle central.

Il faudra attendre les travaux de Sergei Sorokin ([1968](#)) pour que le terme de cil primaire apparaisse. Il le décrit comme le premier des cils à être construit à la surface des cellules avant de disparaître définitivement.

Pendant les années 80, le cil primaire ne suscite pas grand intérêt. Considéré comme un vestige de la cellule ou encore une excroissance, l'engouement pour cette organelle reprend dans les années 2000 avec la découverte de son implication dans le développement et la physiopathologie rénale ([Pazour, 2000](#)).

Les connaissances et les découvertes sur le cil primaire ne cessent d'augmenter. Il est aujourd'hui bien établi qu'il joue un rôle majeur dans de nombreux processus physiologiques tel que le développement embryonnaire notamment dans la mise en place de l'asymétrie gauche droite ([Satir, 2007](#)), mais également chez l'adulte où son rôle dépend de sa localisation. Ainsi, le cil primaire est capable de détecter le flux au niveau rénal ([Praetorius,](#)

2005) et vasculaire. C'est également un élément clé des voies de signalisation comme la voie Hedgehog (HH), Wnt, PDGF α ou encore TGF β (Anvarian, 2019). Il est ainsi considéré comme l'antenne de la cellule, capable de capter des signaux biochimiques, mécaniques ou encore osmotiques du milieu extracellulaire et de les transmettre à la cellule, participant ainsi à la régulation des processus de prolifération, de migration, ou encore de différenciation cellulaire.

Du fait de sa place centrale dans l'homéostasie de l'organisme, la dysfonction du cil primaire est également au cœur du développement de certaines pathologies, aujourd'hui connues sous le nom de ciliopathies. Mises en lumière pour la première fois par Praetorius et String en 2005 avec leurs travaux sur la souris Oak Ridge Polycystique Kidney (ORPK) (Praetorius, 2005 ; Lehman, 2008), il existe aujourd'hui une pléthore de pathologies liées à une mutation au niveau du cil primaire.

1. Les différents types de cils

Chez les mammifères, il existe deux types de cil qui diffèrent selon leur structure interne et leur capacité à générer un mouvement. On distingue ainsi le cil motile du cil primaire. De façon générale, les deux types de cil sont composés d'une structure interne appelée axonème organisé en doublet de microtubules entouré par la membrane ciliaire. La structure du cil primaire sera décrite de façon précise dans la suite de cette introduction.

a) *Cil motile*

Les cils motiles sont généralement retrouvés en grand nombre à la surface de cellules spécialisées. Ainsi, on les retrouve tapissant les cellules épithéliales bronchiques, les trompes de Fallope ou encore les spermatozoïdes (appelé flagelle). Ces cils possèdent une dynamique de battement qui leur permet de mettre en mouvement la cellule qui les porte ou encore de déplacer un fluide (Wan, 2018), permettant ainsi, l'évacuation du mucus ou encore le mouvement des ovocytes.

Cette capacité de battement est due à la structure en 9+2 doublets de microtubules formant l'axonème, et la présence de bras de dynéines internes et externes. Bien que le rôle exact de ces bras de dynéines soit encore flou, Blanchon et son équipe (2020) propose que les bras externes régulent la fréquence de battement du cil et que les bras internes donneront la forme au battement. Grâce à l'hydrolyse de l'ATP, ces structures permettent le mouvement des

microtubules entre eux et la présence de pont de nexines converti ce mouvement en courbure (Figure 8).

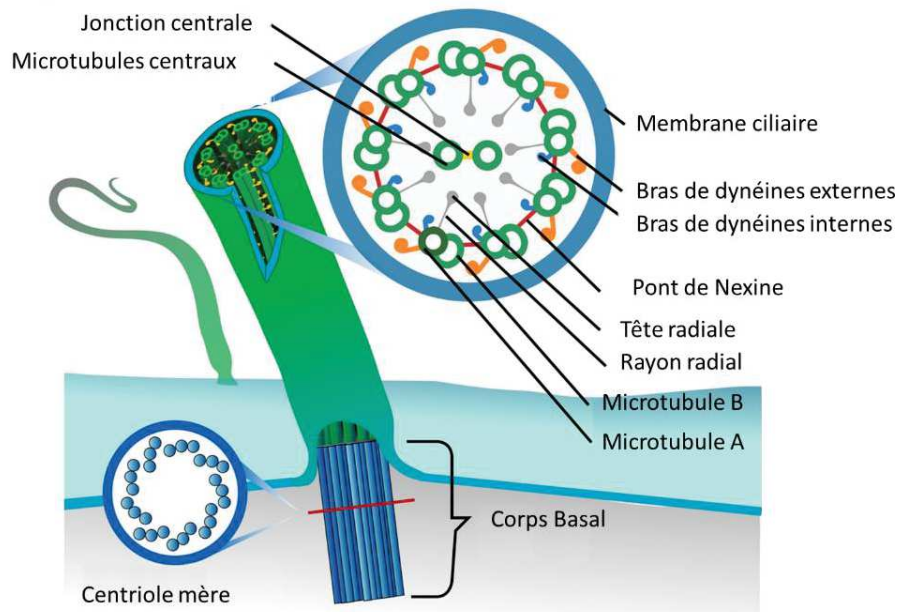


Figure 8: Structure interne du flagelle. Adapté à partir d'une illustration de LadyofHats

Ce type de déplacement par flagelle est couramment retrouvé chez de nombreux organismes unicellulaires comme *Chlamydomonas reinhardtii* ou encore *Caenorhabditis elegans*. Ces deux organismes sont aujourd'hui considérés comme des organismes modèles dans l'étude et la compréhension du cil et des pathologies associées.

a) Cil primaire

Le cil primaire est, quant à lui, présent en un seul exemplaire à la surface de la plupart des cellules quiescentes de l'organisme. Mis à part quelques exceptions, sa structure particulière ne lui permet pas d'acquérir une motilité. Il ne possède généralement pas de paire centrale de microtubules, lui conférant une structure en 9+0 microtubules. En revanche, on peut les retrouver dans des zones spécifiques où leur structure va être fortement modifiée pour lui conférer une spécialisation. C'est le cas des cils des cônes et des bâtonnets de la rétine qui vont permettre, grâce aux photorécepteurs à leur surface, la détection de signaux visuels, ou encore des cils du nœud de Hensen qui sont pourvus de motilité et détermine l'asymétrie gauche droite de l'embryon tout en possédant une structure en 9+0 microtubules (Buceta, 2005)

Le cil est constitué de 4 grandes parties distinctes : Le corps basal composé des centrioles mère et fille et ancré à la membrane plasmique. Autour de ce corps basal s'organise un collier ciliaire constitué de fibres en Y composant la zone de transition. Cette barrière physique sépare le corps basal de l'axonème, la troisième grande partie du cil constituée de microtubules se projetant à la surface de la cellule. Enfin, autour de l'axonème, on retrouve la membrane ciliaire en continuité avec la membrane plasmique mais de composition bien distincte (Figure 9).

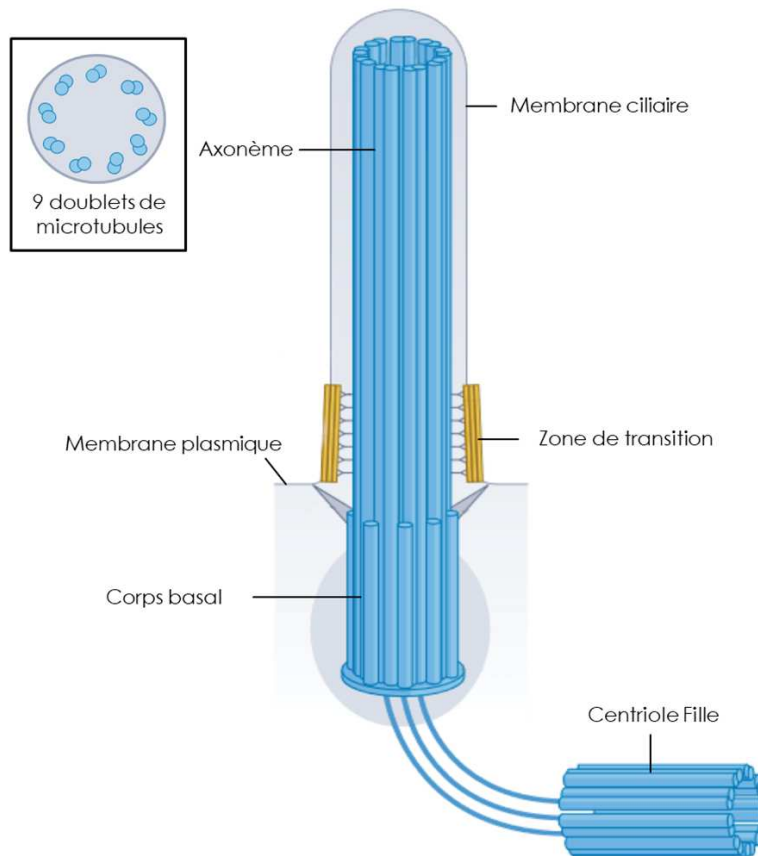


Figure 9: Structure générale du cil primaire

B. Structure du cil primaire

1. Corps basal

Le corps basal provient de la maturation du centriole mère ; il est composé de 9 triplets de microtubules, prolongé par des appendices distaux et subdistaux permettant un ancrage solide à la membrane (Figure 10). La présence du corps basal à la membrane est finement régulée lors de la ciliogenèse et dépend fortement du cycle cellulaire. Lors des phases prolifératives de la cellule, le centrosome situé au centre de la cellule, et possédant alors 2 centrioles, entame un processus de maturation durant lequel les deux centrioles vont se séparer et former chacun de leur côté un centriole mère et un centriole fille. Ce processus est régulé par l'action de trois protéines : La polo-like kinase 4 (PLK4) qui va permettre la phosphorylation du locus d'interruption de SCL (STIL) et donc induire sa liaison à SAS6 (protéine homologue 6 anormale d'assemblage du fuseau), une protéine d'assemblage servant d'échafaudage à la duplication des centrioles (Takao, 2019). Les deux centrioles mère et fille sont reliés par une matrice péri centriolaire formant une barrière de protection autour de ces deux organites.

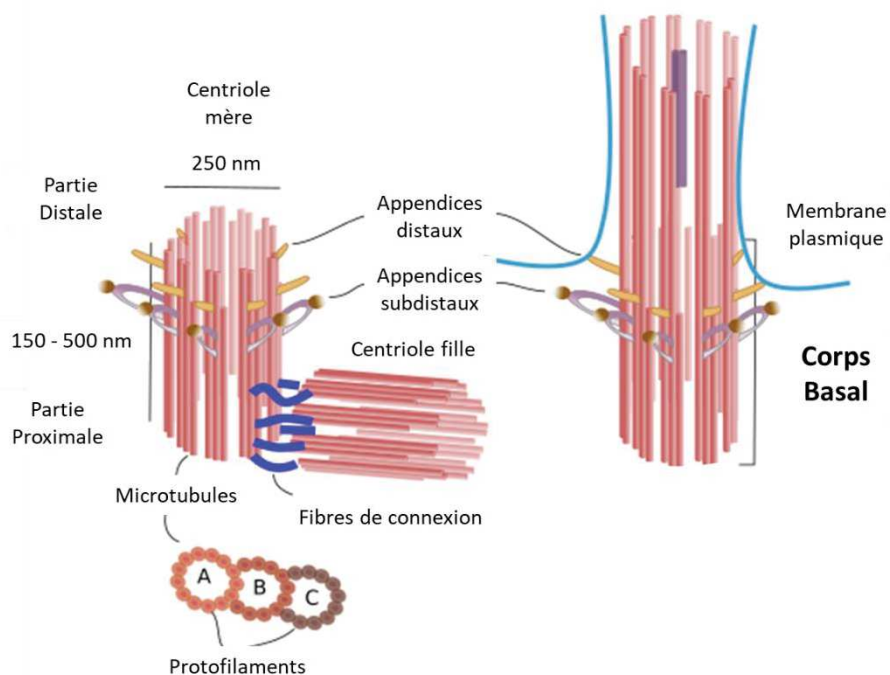


Figure 10: Structure du corps basal. Adapté à partir d'une illustration de *Atlas of plant and animal histology* (<https://mmegias.webs.uvigo.es/02-english/5-celulas/ampliaciones/7-centriolo.php>)

Après la maturation du centriole mère pour former le corps basal, celui-ci va s'ancrer à la membrane plasmique suivant deux voies afin d'initier la ciliogenèse. La voie extracellulaire,

d'une part, initie la ciliogenèse par ancrage direct du corps basal à la membrane. Cette voie, observée dans les cellules polarisées des mammifères comme les cellules épithéliales, favoriserait les capacités biomécaniques du cil primaire comme la détection des modifications de flux (Mazo, 2016). Cependant, la littérature ne montre aucune trace de l'utilisation de cette voie dans de nombreuses cellules, y compris les CE vasculaires qui sont pourtant polarisées et possèdent un cil primaire décrit comme senseur du flux sanguin.

D'une autre part, la deuxième voie amenant à la ciliogenèse est la voie intracellulaire qui passe par le transport des vésicules périciliaires de l'appareil de Golgi et d'endosome de recyclage (Sorokin, 1968 ; Lu, 2015 ; Yang, 2020). (Figure 11)

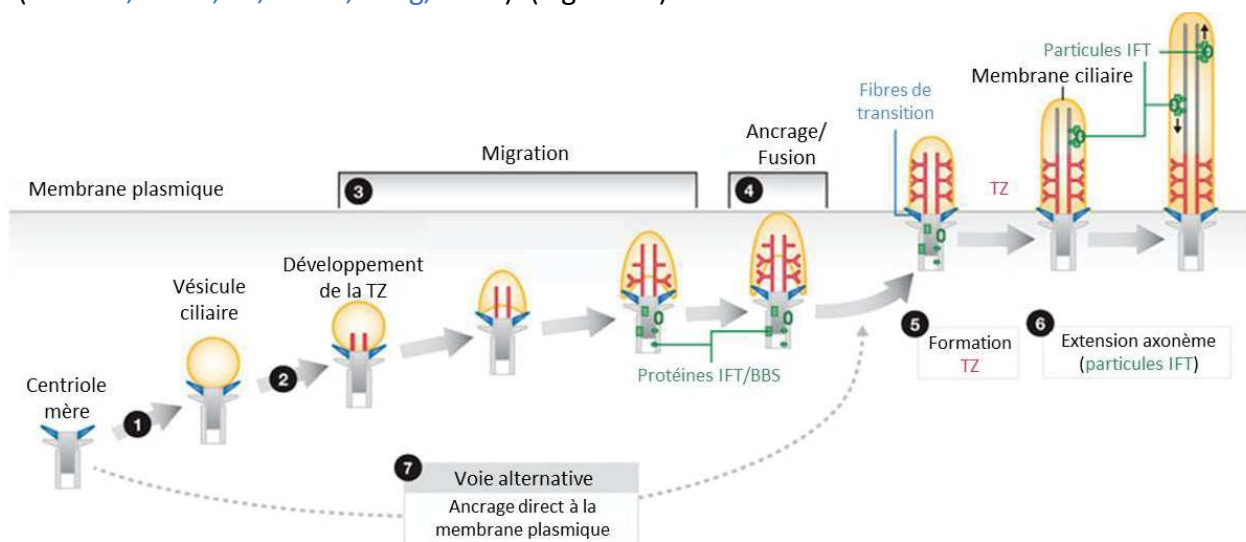


Figure 11: Différentes voies impliquées dans la formation du cil primaire. La première étape de la voie intracellulaire, après la formation du centriole mère, est la formation d'une vésicule ciliaire (1) suivi du développement de la zone de transition immature (2). Par la suite, la vésicule ciliaire va s'invaginer et le corps basal va migrer jusqu'à la membrane plasmique (3) puis fusionner avec celle-ci et s'ancrer à l'aide des fibres de transition (4). Par la suite, la zone de transition va mûrir (5) et l'axonème se forme à l'aide des particules IFT et du BBSome (6). Il existe une voie de formation alternative, dite extracellulaire qui entraîne l'ancrage direct du centriole mère à la membrane pour former le corps basal et initier la ciliogenèse (7). TZ : Zone de transition, IFT : transport intraflagellaire, BBS : complexe du Syndrome Bardet-Biedl. D'après Reiter, 2012.

Ce transport vésiculaire impliquant de nombreuses protéines permet l'acheminement de protéines essentielles à l'initiation de la ciliogenèse comme Rab8 et Rab11 nécessaires à la croissance du cil. L'association et la fusion de vésicules périciliaires permettent la formation de la vésicule ciliaire. Ce processus est notamment régulé par la protéine de remodelage de membrane EHD1/3 et la protéine SNAP29 du complexe SNARE (récepteur des protéines d'attachement solubles au facteur sensible à la N-éthylmaleimide), elles-mêmes chaperonnées par IFT (transport intraflagellaire) 20 (Lu, 2015). Cette vésicule va par la suite

englober l'extrémité du corps basal et permettre la formation et l'allongement de l'axonème, et puis, fusionner avec la membrane plasmique dont l'invagination forme la poche ciliaire ([Ghossoub, 2011](#)).

2. Zone de transition

Le corps basal est ensuite ancré à la membrane grâce aux appendices distaux qui forment désormais les fibres de transitions. La zone de transition est donc composée de ces fibres de transitions ainsi que de projections en Y faisant le lien entre la membrane ciliaire et les doublets de microtubules. Cette partie du cil joue le rôle d'une véritable barrière physique entre le cytoplasme et le cil et est un élément clé des échanges protéiques ([Reiter, 2012](#)).

Comme d'autres compartiments cellulaires, la zone de transition possède une composition spécifique de protéines regroupées en 3 complexes majoritaires (CEP290, MKS, NPHP) ayant chacun un rôle spécifique. CEP290 permet la formation des liens membrane/microtubules afin de refermer le compartiment ciliaire ([Wang, 2013](#)). Les complexes MKS et NPHP seraient quant à eux impliqués dans la formation et le maintien du cil. En effet, plusieurs études récentes ont montré qu'une déplétion d'un de ces complexes entraîne des défauts de ciliogenèse ([Lambacher, 2016](#)). D'autres travaux montrent également une interaction forte des protéines de la zone de transition avec des protéines du BBSome, un complexe central dans le trafic intraciliaire ([Yee, 2015](#)). (Figure 12)

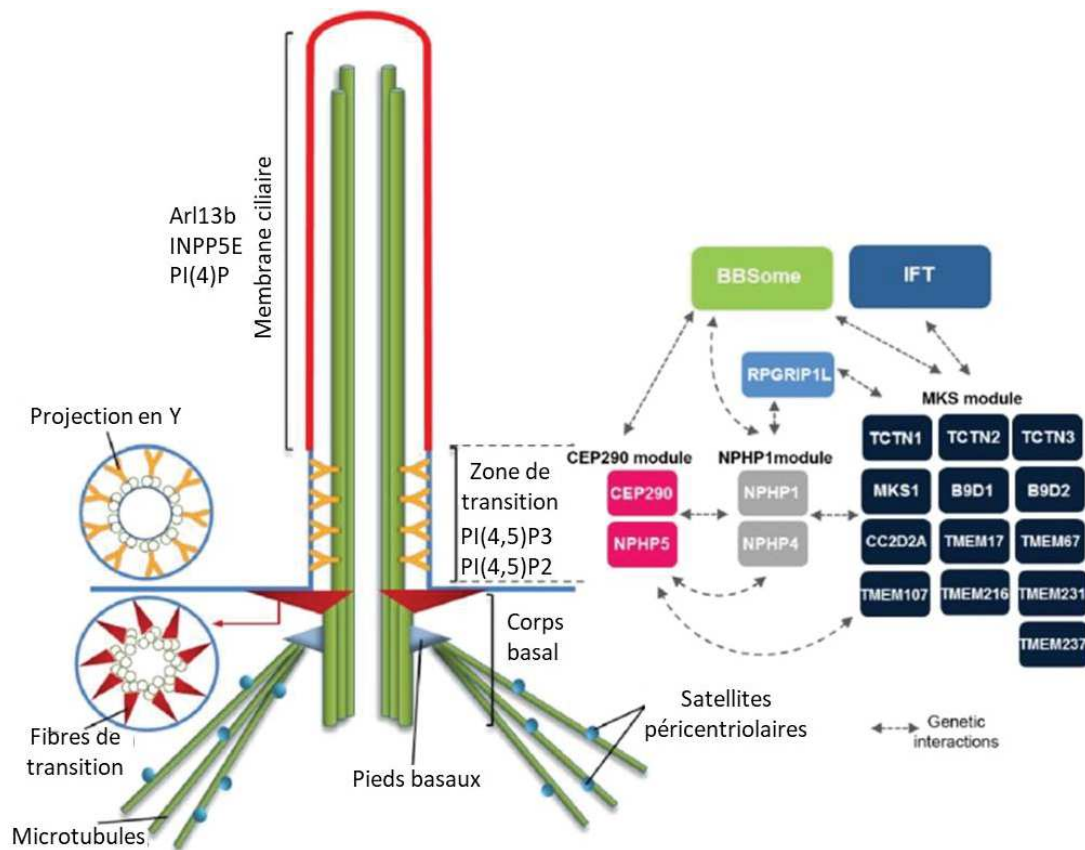


Figure 12: Structure de la zone de transition et des différentes protéines impliquées. D'après Gonçalves, 2017

3. Axonème

L'axonème forme la structure interne du cil primaire. Il supporte la membrane ciliaire et sert également d'échafaudage pour le transport IFT qui sera détaillé par la suite (voir paragraphe C.1.a). Il est composé de neuf doublets de microtubules. Chaque microtubule est composé d'un microtubule dit complet (microtubule A) constitué de treize protofilaments de tubuline et d'un microtubule incomplet (microtubule B) composé quant à lui de dix protofilaments de tubuline (Downing, 2007). Les protofilaments sont formés d'hétérodimères d' α et β tubuline qui subissent une polymérisation. Ces hétérodimères répondraient au « code de la tubuline », les rendant sensibles aux modifications post-traductionnelles (Yu, 2015). Une étude récente sur les cils de *C. elegans* a montré qu'un mécanisme de régulation structurelle et fonctionnelle de l'axonème serait médié par la composition de ces hétérodimères. En effet, la perte de l'isotope tba-6 de l' α tubuline entraînait une ultrastructure anormale de l'axonème et une altération de la distribution des protéines de l'IFT (Silva, 2017).

Afin d'assurer un axonème viable et fonctionnel, les microtubules doivent subir des modifications post-traductionnelles et notamment l'acétylation de la tubuline sur la lysine 40.

La grande stabilité des microtubules résulte d'une régulation fine de cette acétylation par deux protéines : l' α TAT1 (α -tubuline acétyltransférase 1) qui permet l'acétylation et la HDAC6 (histone déacétylase 6) qui permet au contraire la déacétylation de la tubuline (Chawan, 2020)

Parmi les autres modifications post-traductionnelles des composants du cil, on retrouve la glycylation et la glutamylation qui se produisent sur l'extrémité C-terminale et qui favorisent la polymérisation des microtubules (Wloga, 2017). La glycylation semble réguler la croissance de l'axonème. En effet, plusieurs études montrent que des mutations des glycyclase entraînaient une réduction de la longueur des cils (Rocha, 2014 ; Wloga, 2009). Elle permet également la stabilisation des cils formés (Gadadhar, 2017). Au contraire, la glutamylation semble réguler négativement la croissance de l'axonème car une perte des glutamylases spécifiques aux cils entraîne un allongement de ceux-ci (Kubo, 2015).

Malgré des connaissances de plus en plus nombreuses, le rôle de ces modifications post-traductionnelles dans la genèse de l'axonème et la mise en place d'un cil fonctionnel reste encore flou.

4. Membrane ciliaire

La membrane ciliaire recouvre l'axonème, et même si elle est continue à la membrane plasmique sa composition est quant à elle très différente. Les premières études sur le sujet ne sont pas récentes, c'est Kaneshiro en 1987 qui montre pour la première fois que la membrane ciliaire est enrichie en sphingolipides et en stérols (Kaneshiro, 1987). Depuis, de nombreuses études ont montré que la membrane ciliaire est principalement composée de phosphoinositides (PtdIns). Les PtdIns sont des lipides possédant un squelette d'acide gras et de glycérol avec un groupe D-myo-inositol-1-phosphate qui peut être modifié aux positions D3, D4 ou D5 par des lipides kinases et des phosphatases. Les différentes phosphorylations donnent naissance à de nombreux sous-types de PtdIns présentant une répartition caractéristique dans les différents compartiments cellulaires et notamment dans le cil primaire. On dénombre aujourd'hui sept molécules générées par ces phosphorylations (PtdIns(3)P, PtdIns(4)P, PtdIns(5)P, PtdIns(3,4)P₂, PtdIns(3,5)P₃, PtdIns(4,5)P₂, PtdIns(3,4,5)P₃). Sur la membrane ciliaire, on retrouve principalement PtdIns(4)P, néanmoins au niveau de la zone de transition c'est PtdIns(4,5)P₂ qui est retrouvé en majorité où il permet le passage des GPCR (G protein-coupled receptors) de la cellule vers le cil, par l'intermédiaire de la protéine TULP3 (tubby-like protein 3) (Badgandi, 2017). L'activité de ces PtdIns est régulée par l'action

de 3 phosphatases : INPP5E (Inositol polyphosphate 5-phosphatase E), OCRL (Occulocerebrorenal syndrome of Lowe) et INPP5B (Inositol polyphosphate 5-phosphatase B). (Figure 13)

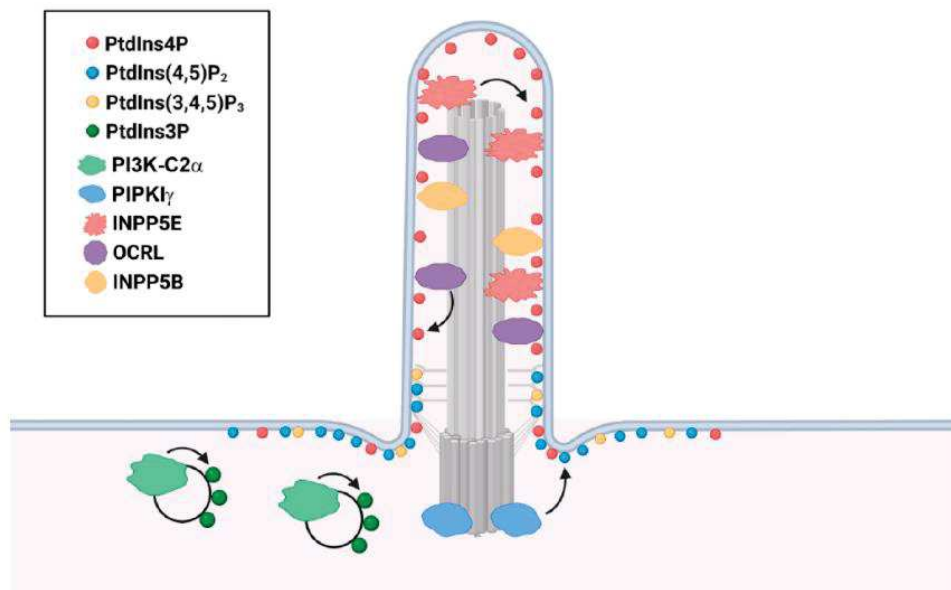


Figure 13: Localisation ciliaire des PtdIns et des phosphatases et kinases associées. PtdIns4P est le principal PtdIns le long de la membrane ciliaire. Les PtdIns(4,5)P₂ et PtdIns(3,4,5)P₃ se localisent principalement à la base des cils. Le PtdIns3P s'enrichit dans le compartiment endocytique de recyclage péricentriolaire à la base des cils. La génération et la régulation des PtdIns par les phosphatases et kinases spécifiques sont indiquées par les flèches. D'après Chen, 2022.

INPP5E est localisé au niveau de l'axonème. Son rôle principal serait le maintien de la stabilité du cil primaire et de la régulation de la signalisation ciliaire (Chávez, 2015 ; Garcia-Gonzalo, 2015). En effet, ces études montrent qu'INPP5E séquestre PtdIns(4)P et PtdIns(4,5)P₂ dans leur compartiment respectif et régule leur activité. Ainsi, l'absence d'INPP5E induit une accumulation de PtdIns(4,5)P₂ conduisant à une accumulation de TULP3 et des GPR161 au niveau de la zone de transition.

OCRL régule principalement l'activité de PtdIns(4,5)P₂ le long du cil primaire. Son inactivation catalytique entraîne une augmentation de la taille des cils (Luo, 2012 ; Prosseda, 2017). De par son domaine ASH (ASPM -SPD2Hydin, aa 563-678) qui possède un site de liaison aux Rab et notamment à Rab8, OCRL participe également au transport vésiculaire de l'appareil de Golgi vers la base du cil (Coon, 2012).

Enfin, INPP5B possède les mêmes fonctions que OCRL au niveau de la formation du cil. Cependant leurs structures protéiques sont différentes avec seulement 45 % d'homologie (Luo, 2013).

C. La ciliogénèse

1. Assemblage du cil

La ciliogénèse met en jeu de nombreux processus et de nombreuses protéines et effecteurs pour permettre l'assemblage des différentes parties du cil décrites précédemment. L'assemblage du cil est initié lorsque la cellule sort du cycle mitotique, en réponse à une absence de molécules mitogènes ou de facteurs de différenciation (Archer, 1971; Pedersen, 2008 ; Sorokin, 1962). L'assemblage du cil passe par une série d'étapes bien définies. La sortie du cycle mitotique entraîne le recrutement de Rabin8, un GEF (Guanine nucleotide exchange factor), dans l'endosome de recyclage et l'appareil de Golgi. Rabin8 est ensuite activé par Rab11 ce qui aboutit au recrutement de Rab8. Des vésicules péri-ciliaires associées à Rab8 sont ensuite acheminées au niveau des appendices distaux du centriole mère. Cela entraîne l'amarrage des appendices distaux à la membrane plasmique. Les vésicules péri-ciliaires fusionnent sous l'action de Ehd1/3 pour former la vésicule ciliaire. La croissance des microtubules et l'extension axonémique sont ensuite initiées par le retrait de la protéine CP110 du centriole mère sous l'action de deux kinases TTBK2 (Tau Tubulin Kinase 2) et MARK4 (Microtubule affinity-regulating kinase 4). Enfin, l'allongement de la membrane ciliaire serait également initié par Rab8. Finalement, la croissance de l'axonème et la mise en place d'un cil fonctionnel nécessitent également la présence d'un transport IFT couplé au BBSome. (Figure 14)

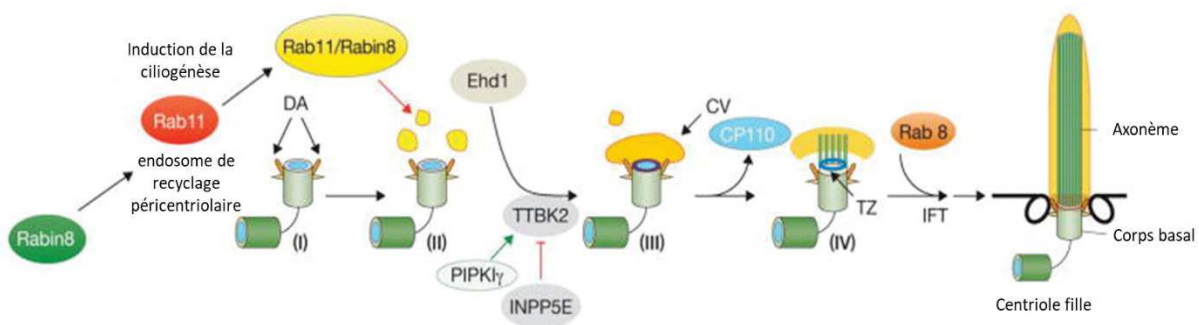


Figure 14: Principales protéines impliquées dans l'assemblage du cil primaire. L'assemblage du cil primaire passe par une série d'étapes numéroté de I à IV aboutissant au remodelage du centriole mère et à la mise en place d'un cil fonctionnel. D'après Sánchez, 2016.

a) *Rôle de transport intraflagellaire (IFT)*

Le cil primaire est un compartiment bien isolé et indépendant de la cellule, cependant il ne possède pas de capacité de synthèse protéique. Ainsi, les protéines nécessaires à sa construction et à sa fonction sont synthétisées dans le cytoplasme et acheminées au niveau de l'axonème par le transport IFT. L'IFT, décrit pour la première fois par l'équipe de Rosenbaum (Kozminski, 1993), s'organise en cargo et permet d'acheminer les protéines le long des microtubules du corps basal vers la pointe ciliaire par un transport antérograde et de les recycler par un transport rétrograde. Le transport antérograde est permis par des moteurs kinésines-2 à une vitesse d'environ 2 $\mu\text{m}/\text{sec}$ formé par deux sous unités motrices KIF3A (kinesin Family member 3A) et KIF3B (kinesin Family member 3B) et d'une sous unité non motrice KAP3 (KIF-Associated Protein 3) (Kozminski, 1995). Le transport rétrograde est quant à lui géré par des moteurs dynéines à une vitesse de 3,5 $\mu\text{m}/\text{sec}$ (Pazour, 1998). Ce complexe est composé d'une chaîne lourde homodimérique, DYNC2-H1, d'une chaîne légère intermédiaire, DYNC2LI1, d'une chaîne intermédiaire WDR34 et d'une chaîne légère DYNLL1.

Ces deux moteurs semblent indispensables pour la structure et la fonction du cil primaire. En effet, plusieurs études montrent que l'inactivation de la kinésine 2 chez plusieurs organismes modèles comme *Chlamydomonas* ou encore chez la souris entraîne une inhibition de l'assemblage du cil et du transport IFT (Kozminski, 1995 ; Nonaka, 1998). Il en est de même chez les mutants pour les différents composants de la dynéine qui montrent une taille réduite du cil et un transport IFT altéré (Hou, 2004 ; May, 2005).

Les deux types de moteurs sont modulés par deux complexes IFT qui sont l'IFT-A et l'IFT-B. Le complexe IFT-A est composé de 6 protéines, 3 qui forment le cœur du complexe (IFT140, IFT122 et IFT144) et 3 périphériques (IFT43, IFT139 et IFT121). Le complexe IFT-B quant à lui, compte à ce jour, 16 protéines subdivisées en 2 complexes. IFT-B1 compose le cœur du complexe et est formé de 10 protéines (IFT56, IFT22, IFT46, IFT81, IFT25, IFT52, IFT70, IFT88, IFT27, IFT74) et IFT-B2 forme le complexe périphérique de 6 protéines (IFT20, IFT38, IFT80, IFT57, IFT54, IFT172). (Figure 15). Ces deux complexes sont enrichis en WDR40 et en GTPases, ce qui favorise les interactions protéiques IFT-IFT et IFT-cargo (Taschner, 2012). Il a par exemple été montré que IFT174 et IFT88 forment un module de liaison à la tubuline nécessaire lors de l'assemblage de l'axonème (Bhogaraju, 2013).

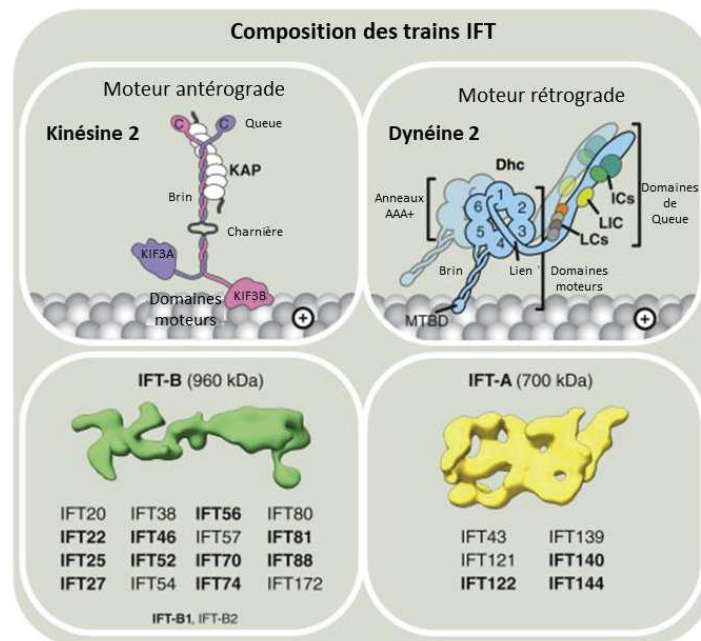


Figure 15: Composition de l'IFT. Composants constitutifs des trains moteurs antérograde et rétrograde. KAP, protéine associée à la kinésine ; Dhc, chaîne lourde de dyéne ; ICs, chaînes intermédiaires ; LIC, chaîne intermédiaire légère ; LCs, chaînes légères ; MTBD, domaines de liaison aux microtubules. D'après Pigino, 2021

Les transports antérogrades et rétrogrades se font sur les mêmes microtubules mais sans collisions. La question de savoir comment un tel mécanisme était possible s'est alors posé. Spepanek et son équipe ont résolu le problème en utilisant la microscopie à fluorescence résolue en temps (FLIM) qui permet de mettre en évidence des interactions protéiques. Ils ont montré que le transport antérograde utilisait les microtubules B alors que le transport rétrograde s'effectuait sur les microtubules A (Stepanek, 2016). De plus, ce transport IFT est doté d'un système évitant la concurrence des deux moteurs. En effet, la dyéne et la kinésine

sont toutes les deux présentes lors du transport antérograde et rétrograde ; cependant, la dynéine est maintenue inactive face à la membrane lors du transport antérograde avant que l'ensemble du train IFT subisse un changement de conformation dans la partie distale du cil pour permettre à la dynéine d'effectuer son transport rétrograde ([Jordan, 2018](#)). (Figure 16)

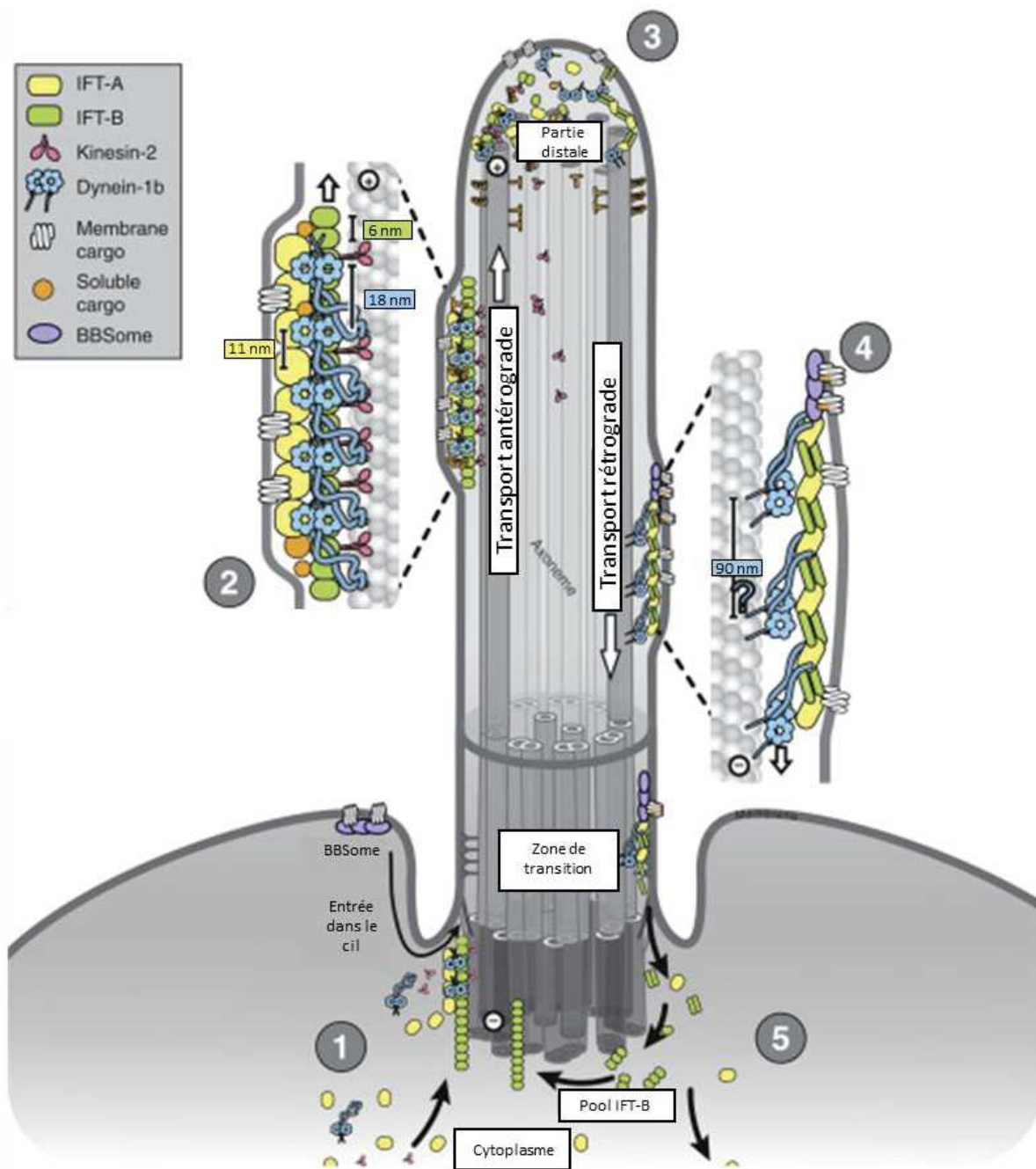


Figure 16: Mécanisme du transport IFT. Les composants de l'IFT comprennent cinq phases lorsqu'ils entrent et sortent du cil. Phase 1 : les trains antérogrades s'assemblent à la base du cil et pénètrent dans le cil. Phase 2 : les trains antérogrades sont déplacés par la kinésine-2 et transportent des protéines cargo vers la partie distale du cil. Phase 3 les protéines de l'axonème sont libérées à l'extrémité et incorporées dans la structure ciliaire. La kinésine-2 se dissocie des trains et retourne à la base ciliaire par un mécanisme indépendant de l'IFT. L'IFT-A, l'IFT-B et les dynéines des trains antérogrades se réarrangent pour construire les trains rétrogrades. Phase 4 : les trains rétrogrades sont propulsés par la dynéine pour se déplacer vers la base du cil et transporter les déchets et les molécules de signalisation vers la cellule. Le BBSome entraîne les récepteurs de signalisation activés hors du cil. Phase 5 : les trains rétrogrades se désassemblent et les composants de l'IFT sont recyclés à la base du cil. Certains composants de l'IFT, tels que les protéines IFT-B, forment un pool à la base du cil et sont rapidement recyclés pour assembler des trains antérogrades. D'après Pigino, 2021.

b) *Le BBSome*

Le BBSome est une structure complémentaire du transport IFT dans l'assemblage du cil et le maintien de ces fonctions. Ce complexe reconnaît un grand nombre de protéines ciliaires et s'y lie afin de faciliter leur passage au niveau de la zone de transition et pendant le transport IFT. D'après la littérature, le BBSome serait également impliqué dans l'assemblage et dans le maintien du transport IFT (Wei, 2012 ; Ou, 2005). Le BBSome est un complexe protéique constitué de 8 protéines (BBS1, 2, 4, 5, 7, 8, 9 et 18). Son assemblage est régulé par un autre complexe composé de 3 protéines BBS (BBS6, 10 et 12) couplé au complexe CCT/TRiC (Chaperonin containing tailless complex polypeptide 1 / tailless complex polypeptide 1 ring complex) qui agit comme un échafaudage pour la formation du complexe BBSome (Seo, 2010). D'autres protéines BBS sont également impliquées dans le fonctionnement du complexe. Par exemple, BBS3 est nécessaire au recrutement du complexe à la membrane et BBS17 régule le trafic du BBSome dans le cil (Jin, 2010 ; Seo, 2011). (Figure 17) Les données sur le complexe BBSome sont partielles mais les études sur le sujet sont de plus en plus nombreuses. Par exemple, BBS1 semble être l'une des sous unités les plus importantes du complexe, en effet, elle a été décrite comme ayant de nombreuses interactions avec des protéines cargo (Seo, 2011 ; Su, 2014). Le BBSome est également au cœur de pathologies, les ciliopathies, qui seront détaillées par la suite (paragraphe F). Les patients atteints du syndrome de Bardet-Biedl présentent une dysfonction du BBSome ou des protéines associées caractérisées par une obésité accrue, la présence de kyste rénaux et une dégénérescence rétinienne. Plus récemment, le rôle important du BBSome au niveau vasculaire a été identifié. Une perturbation spécifique du BBSome au niveau des CML entraîne une réduction du relâchement vasculaire et augmente la vasoconstriction. Ces modifications se produisent de manière indépendante de la pression artérielle et de la masse corporelle, mais sont liées au système rénine angiotensine (Reho, 2019). Le même groupe a montré en 2021 que le BBSome des CE jouait un rôle majeur dans la régulation de la fonction vasculaire, du tissu adipeux, du métabolisme lipidique hépatique et de la fonction rétinienne (Jiang, 2021).

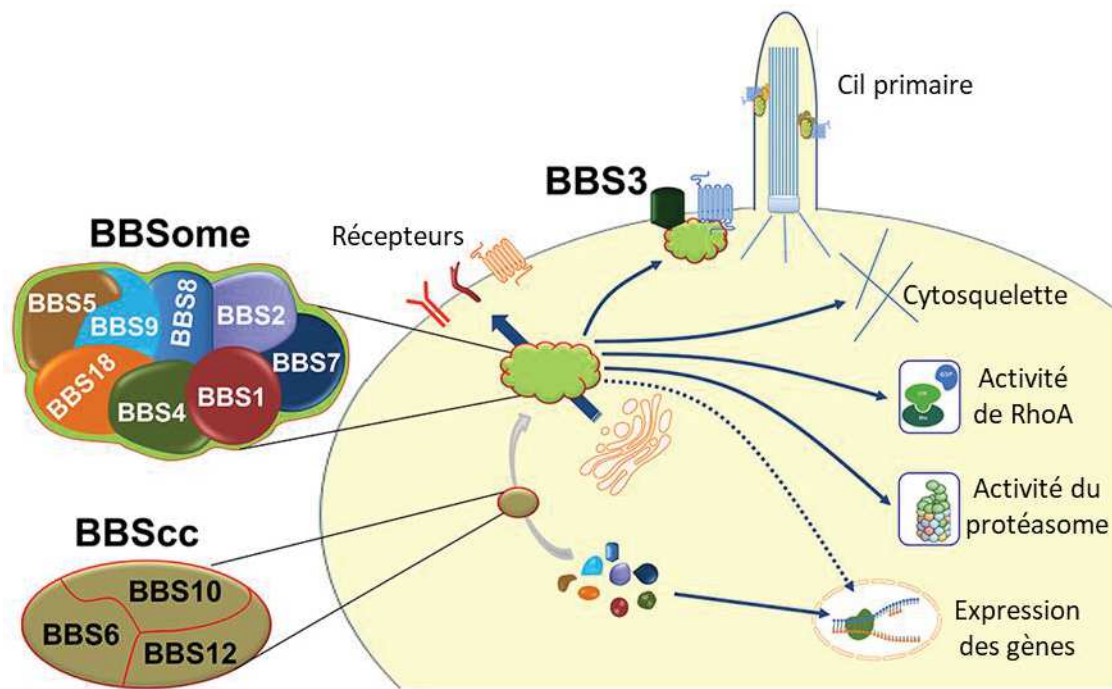


Figure 17: Structure du BBSome et ses différentes implications. D'après Zhao, 2022

2. Maintien du cil à la surface des cellules

a) Contrôle de la longueur des cils

Le maintien fonctionnel du cil à la surface des cellules est régulé par la longueur de l'axonème mais également le recyclage des protéines. Ce processus reste encore flou mais de plus en plus de protéines sont identifiées comme régulatrices de ces fonctions. Un bon candidat pour moduler ces processus est Nde1 (protéine de neurodéveloppement 1 associée à NudE) qui permet la régulation du taux d'IFT et un contrôle négatif de la longueur des cils par son interaction avec la protéine LC8. En effet, un épuisement de Nde1 entraîne une augmentation de la longueur des cils. En revanche, une surexpression de cette même protéine entraîne la formation de cil plus courts et trapus (Kim, 2011). Dans les cellules quiescentes, cette protéine est phosphorylée par CDK5 entraînant sur ubiquitination par FBW7, une ligase E3 qui se localise dans le centrosome et le corps basal. Ce processus permet le maintien de faibles concentrations de cette protéine (Maskey, 2015). La ligase E3/APC/CDC20 est également une bonne candidate dans la régulation de la longueur des cils. En effet, plusieurs études montrent que l'inhibition des sous unités APC, APC2 ou encore CDC20 augmente la longueur des cils, sans entraîner la reprise du cycle cellulaire. La sous unité régulatrice APC semble jouer un rôle important dans le maintien de l'intégrité axonémique. Cette régulation impliquerait la polyubiquitination de son substrat NEK1, un membre de la famille des kinases NEK (kinase

apparentée à NIMA) impliquées dans la régulation de la dynamique et de la stabilité des microtubules. Cette polyubiquitination entraîne la dégradation de NEK1 conduisant à des cils avec des structures ramifiées, probablement due à un axonème partiellement désassemblé et/ou à un assemblage aléatoire (Wang, 2014).

3. Désassemblage du cil

Le désassemblage du cil peut se produire suivant plusieurs processus, en fonction du type cellulaire et de l'environnement extracellulaire. Le cil peut subir un désassemblage progressif par réduction de l'axonème ou par décapitation de la partie distal ou de la totalité du cil (Pugacheva, 2007 ; Gerakopoulos, 2020 ; Mirvis, 2019). La perte du cil primaire peut être transitoire ou permanente. Cela peut se produire de manière transitoire lorsque les cils s'assemblent et se désassemblent en fonction du stade du cycle cellulaire ou lors de l'induction d'une différenciation ou d'un stress cellulaire. La perte ciliaire permanente se produit lorsque les cellules souches ciliées se différencient en cellules non ciliées comme c'est le cas des adipocytes. Dans les deux cas, une grande variété de signaux internes et externes se coordonnent pour effectuer le désassemblage du cil. Les cascades de signalisation en aval activées sur de tels signaux peuvent être distinctes et spécifiques au type de cellule. Le désassemblage du cil est étroitement lié au cycle mitotique et s'effectue sur la base de 3 grandes étapes, (1) l'activation de la kinase AurA (Aurora kinase A) et la désacétylation des microtubules, (2) la dépolymérisation des microtubules et (3) le remodelage de la membrane ciliaire et l'inhibition de l'assemblage de nouveaux cils. (Figure 18)

1. Lors de l'entrée dans le cycle cellulaire, la protéine HEF1 (Activateur humain de la filamentation 1), une protéine d'échafaudage, se lie et stabilise AurA au niveau du corps basal. Cette association entraîne la phosphorylation de HDAC6 médiée par AurA. HDAC6 désacétyle, à son tour, l' α -tubuline et la cortactine, conduisant respectivement à l'instabilité des microtubules et à l'augmentation de sa liaison à la F-actine conduisant à la polymérisation de l'actine (Pugacheva, 2007). Tous ces processus entraînent l'initiation du désassemblage du cil.
2. Comme décrit dans la partie précédente, la dégradation protéasomique de NEK1 joue fortement dans la dépolymérisation des microtubules. En revanche, lors du désassemblage du cil, de nombreux autres acteurs sont impliqués dans ce processus. C'est le cas de KIF24 membre de la famille des kinésines 24 et KIF2A membre de la

famille des kinésines 2A. Ces deux kinésines, en plus d'être impliquées dans le transport intracellulaire et IFT, possèdent également une activité de dépolymérisation (Walczak, 2013 ; Hirokawa, 2009). KIF24 est activée en aval de AurA par NEK2 une autre kinase de la même famille que NEK1. KIF24 entraîne à son tour le recrutement du complexe CP110/CEP97 qui empêche la croissance de l'axonème, et dépolymérise les microtubules en parallèle (Kobayashi, 2011). Conjointement, KIF2A est phosphorylé par PLK1, une kinase présente et active lors de la phase G2/M du cycle cellulaire. Pendant cette phase, KIF2A phosphoryle d'autres membres de la famille des kinésines, tel que KIF2B et KIF2C, afin d'assurer la bonne ségrégation des chromosomes et l'assemblage des fuseaux mitotiques. Ceci provoque la dépolymérisation des microtubules et favorise le désassemblage du cil (Miyamoto, 2015).

3. Parallèlement à la déstabilisation et à la dépolymérisation des microtubules, un remodelage de la membrane ciliaire est initié. L'une des premières étapes de ce remodelage serait la décapitation de la partie distale du cil par production de vésicules ciliaires (VC). Ce mécanisme implique l'activation de AurA qui entraîne la diminution de INPP5E et par conséquent une redistribution de PtdIns(4,5)P₂ dans la membrane ciliaire, favorisant l'excision des VC. L'analyse du contenu de ces VC a montré une abondance en produit du complexe IFT-B (Phua, 2017).
4. Le remodelage de la base du cil est quant à lui médié par TCTEX-1, une sous unité de la chaîne légère des dynéines cytoplasmiques, qui est phosphorylée au niveau de la T94. Cette phosphorylation entraîne la dissociation de YCYEX-1 du complexe dynéines 2, et favorise également la polymérisation de la F-actine entraînant le réarrangement du cytosquelette et la résorption du cil (Pfister, 2005).

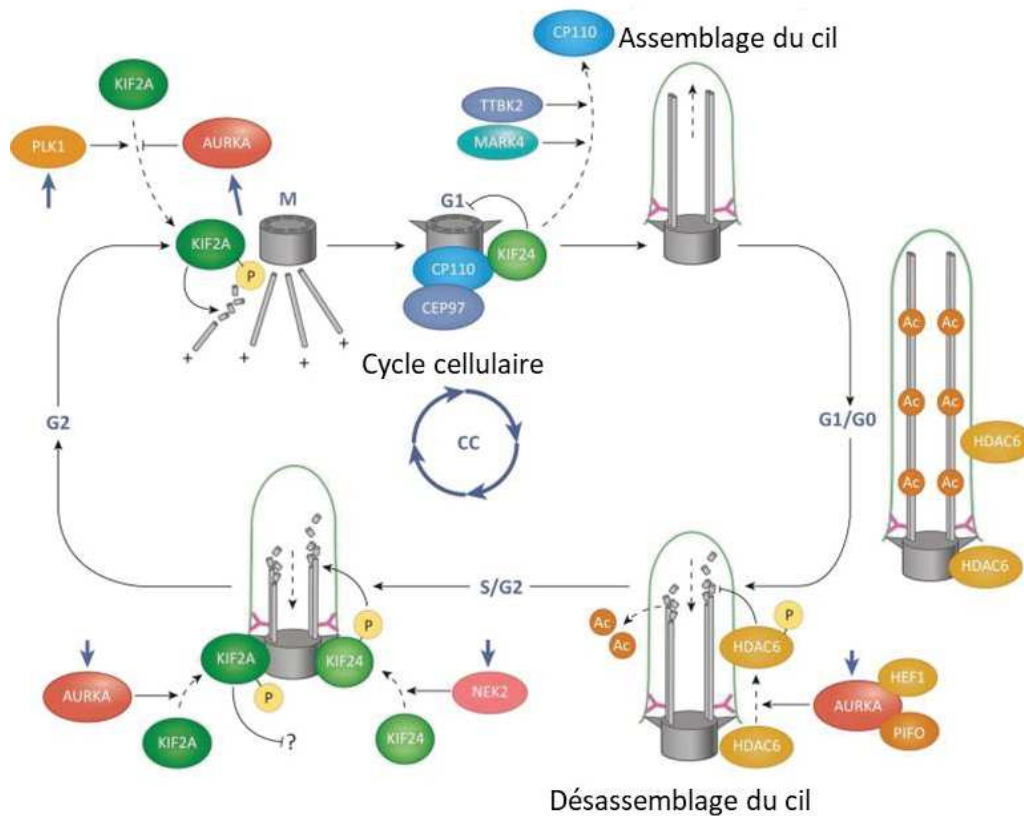


Figure 18: Principales protéines impliquées dans le désassemblage du cil primaire. D'après Malicki, 2016

D. Voies de signalisation associées

Du fait de sa localisation clé en contact avec le milieu extracellulaire, le cil primaire est le centre de nombreuses voies de signalisation. La réception de divers stimuli extérieurs autant biochimiques (facteurs de croissance, hormones) que biomécaniques (force de cisaillement, pression ou encore forces d'étirement) et la transmission des données à la cellule régissent l'activation de nombreux processus comme la migration, la différenciation, ou encore le cycle cellulaire (Berbari, 2009). De nombreuses voies biochimiques et biomécaniques passent par le cil primaire. Ici, et à titre d'exemple, une voie biochimique et une voie biomécanique seront décrites seulement.

1. Signalisation biochimique : exemple de la voie Hedgehog (HH)

Les voies de signalisations HH régulent de nombreux processus cellulaires tant au niveau du développement embryonnaire que dans l'homéostasie cellulaire chez l'adulte. Le lien entre cette voie de signalisation et le cil primaire est montré pour la première fois lorsque des défauts de l'IFT ont entraîné des perturbations dans la signalisation Sonic Hedgehog (SHH) lors

du développement embryonnaire chez la souris (Huangfu, 2003). Depuis, il est bien établi que la voie de signalisation SHH se localise dans le cil primaire chez les vertébrés. L'activation de la voie SHH implique l'activateur transcriptionnel GLI (GLIA) tandis que sa répression basale est médiée par le répresseur transcriptionnel GLI (GLIR), tous deux dépendant du cil primaire. SHH se lie à son récepteur Patched-1 (PTCH1) et déclenche la clairance endocytaire de PTCH1 du cil par l'ubiquitination du récepteur par les ubiquitines ligases SMURF1 et SMURF2 au niveau de la cavéoline-1 (CAV1) localisée à la base du cil (Yue, 2014). En l'absence de SHH, PTCH1 est enrichi dans la membrane ciliaire, empêchant l'accumulation d'un autre récepteur Smoothed (SMO). PTCH1 possède un domaine de détection de stérol transmembranaire (SSD) pouvant favoriser son enrichissement en cholestérol ou ses dérivés. Parallèlement, le GPCR de classe A, GPR161, est ciblé sur le cil par TULP3 et IFT-A pour activer les adénylyl cyclases via les protéines G ($G\alpha_s$), entraînant une augmentation des niveaux ciliaires d'AMPc. L'augmentation des niveaux d'AMPc libère la protéine kinase A (PKA) des sous-unités régulatrices (RI), qui, en collaboration avec la glycogène synthase kinase 3 bêta ($GSK3-\beta$) et les caséines kinases (CK), favorisent le clivage protéolytique des facteurs de transcription GLI dans leur forme complète (GLI-FL) en leur forme répresseur (GLIR) dans un processus dépendant du cil. Le suppresseur de FUSED (SUFU) séquestre GLI3 dans le cytoplasme. La liaison de SHH aux domaines extracellulaires (ECD) de PTCH1 est régulée par des dérivés du cholestérol. De plus, l'ubiquitination médiée par SMURF1/2 régule la sortie de PTCH1 des cils et son internalisation au niveau de la poche ciliaire. L'élimination de PTCH1 provoque un enrichissement et une activation concomitants de SMO dans les cils par le cholestérol ou ses dérivés. L'activation de PTCH1 entraîne la dissociation de SUFU des facteurs de transcription GLI et la formation de GLIA et leur interaction avec la kinésine associée aux microtubules KIF7 dans la partie distale du cil. L'activation de PTCH1 déclenche également la sortie ciliaire de GPR161 et l'entrée de GPR175, qui inhibe la production d'AMPc. GLIR et GLIA transloquent du cil vers le noyau pour réprimer et induire l'activation transcriptionnelle des gènes cibles HH. La signalisation SHH est essentielle dans les processus de prolifération cellulaire et la structuration des tissus ainsi que la régulation de l'homéostasie tissulaire et de la différenciation des cellules souches (Merchant, 2012). Au niveau des CE, l'activation de cette

voie favorise la libération de facteurs pro angiogéniques tel que le VEGF (Byrd, 2004). (Figure 19)

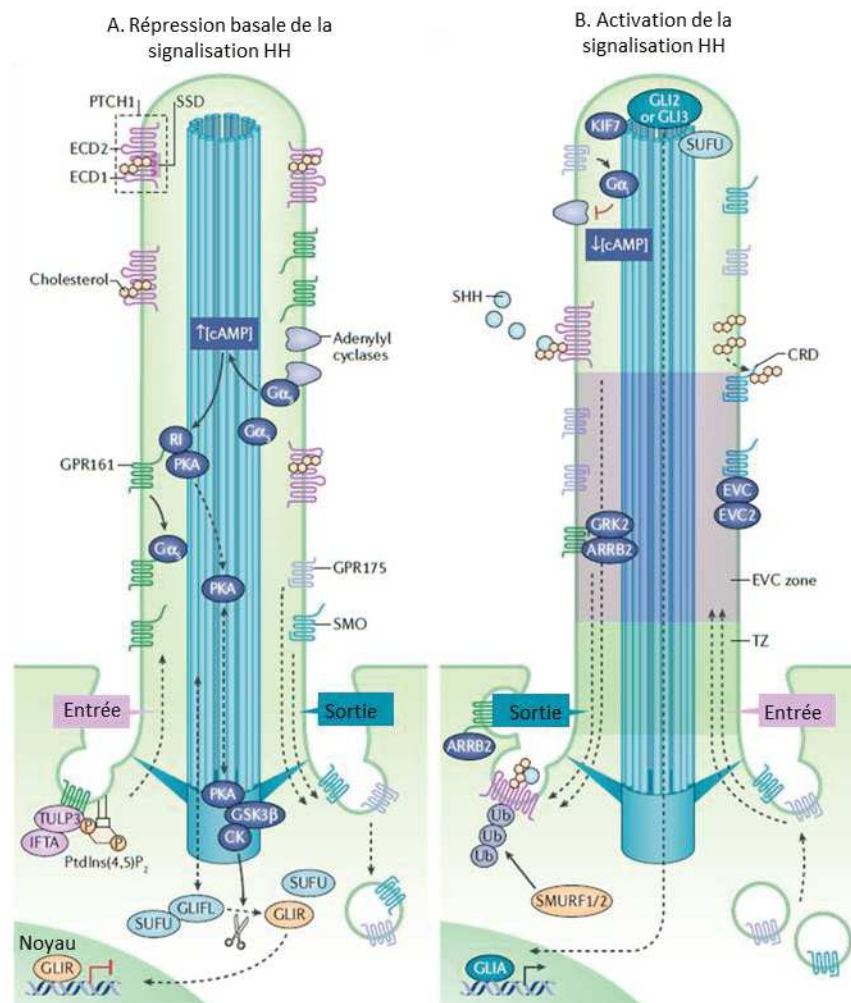


Figure 19: Mécanisme d'activation et de répression de la voie HH. D'après Anvari, 2019

2. Signalisation biomécanique : exemple des forces de cisaillements

Le cil primaire n'est pas seulement doté de récepteurs aux signaux biochimiques, il possède également la capacité de détecter les signaux biomécaniques comme les forces de cisaillements. Cet aspect du cil primaire est particulièrement intéressant dans le contexte des pathologies vasculaires et plus particulièrement dans le cas de l'athérosclérose.

La réponse aux forces de cisaillement est régie par deux protéines de la famille des polycystine. La polycystine 1 (PC1) et 2 (PC2) respectivement codées par les gènes PKD1 et 2. La PC1 est une protéine de 460 KDa composée de 11 domaines transmembranaires avec une région C-terminale intracellulaire sensible à la protéolyse. Sa région extracellulaire quant à

elle possède de nombreux domaines d'adhésion (Chapin, 2010). Afin d'être active d'un point de vue mécanosensoriel, PC1 doit se combiner à PC2 pour former le complexe PC1/PC2. PC2 autrement appelé TRPP2 (Transient receptor potential 2) est une protéine de 110 KDa faisant partie de la famille des canaux ioniques TRP (transient receptor potentiel). Elle est composée de 6 domaines transmembranaires, d'une partie N-terminal intracellulaire et d'une partie C-terminal avec un domaine de liaison au Ca^{2+} . PC2 semble indispensable dans la détection des influx calciques. En effet, plusieurs études montrent qu'une inhibition de PC2 réduit l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule (DiNello, 2020 ; Kleene, 2021 ; Walker, 2019). Le rôle de ce complexe dans la réponse au flux est bien étudié mais toujours discuté. Suite à la flexion du cil lors d'une contrainte de cisaillement, l'activation de PC1 conduit à l'ouverture du canal PC2 qui déclenche à son tour un influx de Ca^{2+} vers le cil. Ce Ca^{2+} se lie à la calmoduline et entraîne l'activation de l'Akt et de la PKC qui vont respectivement phosphoryler la eNOS aux sites sérine 1177 et 663 initiant ainsi la synthèse de NO (AbouAlaiwi, 2009). (Figure 20). Pour nuancer ces propos, une étude faite par Delling et collaborateurs montre que l'hypothèse, selon laquelle le Ca^{2+} que l'on pensait jusqu'à présent passer par le canal PC2 et être acheminé du cil vers la cellule, ne serait pas valide. Leurs propos se basent sur le fait que les canaux mécanosensibles couplés aux protéines G répondent dans un délai de 10 μs à 100 ms, or la stimulation effectuée pendant 10 à 20 s n'évoque pas une signalisation Ca^{2+} ciliaire mais plutôt une onde calcique initiée dans le cytoplasme qui se propage dans le cil primaire. Pour expliquer leurs résultats, ils proposent que la résolution temporelle était insuffisante sur les autres études et qu'il pourrait y avoir la présence d'artefacts (Delling, 2016).

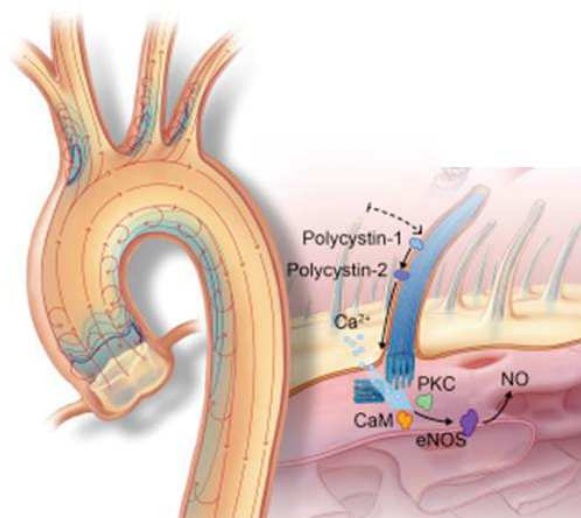


Figure 20: Détection des forces de cisaillement par le cil primaire. D'après Luu, 2018

E. Au niveau vasculaire

1. Cil primaire et développement cardiovasculaire

Le cil primaire joue un rôle crucial chez l'adulte mais il est également fortement présent chez l'embryon où il régit de nombreuses voies de signalisation et maturation morphologiques. Au niveau cardiovasculaire, le cil primaire est retrouvé principalement au niveau des cardiomyocytes peu matures où celui-ci est souvent invaginé dans la poche ciliaire avant de disparaître à l'âge adulte (Myklebust, 1977). Les cils sont également retrouvés nombreux au niveau des oreillettes et de la base des ventricules, des zones soumises à un faible stress mécanique. Cela suggère que le cil pourrait jouer le rôle de capteur des forces hémodynamiques dans ces régions (Van der Heiden, 2006). Dans la morphogenèse cardiaque, ces cils sont particulièrement importants notamment dans la mise en place de l'asymétrie gauche/droite. Plusieurs études sur des modèles animaux KO pour OFD, IFT88, IFT172 ou encore KIF3a, montrent des défauts d'ancrage du corps basal ou encore des défauts de transport IFT conduisant à une détermination bilatérale aléatoire. Dans certains cas, la ciliogenèse se fait partiellement avec la présence de cils plus courts et moins nombreux entraînant des défauts de cloisonnement des ventricules (Huangfu, 2003 ; Immacolata Ferrante, 2006). Au niveau vasculaire, on retrouve des cils sur de nombreux types de cellules et plus particulièrement sur les CE dans la lumière des vaisseaux où leur absence a été décrite comme déclenchant une fibrose associée à une transition endothéliale-mésenchymateuse (EndoMT), suggérant que le cil primaire est impliqué dans la régulation de l'EndoMT (Egorova, 2012). Par ailleurs, des travaux sur des embryons de poissons zèbres ont montré que les cils de la lumière des vaisseaux activent la voie Notch et l'expression de *foxc1b* entraînant le recrutement et la différenciation des cellules vasculaires murales (Chen, 2017).

D'autres études également sur le poisson zèbre ont montré qu'une altération dans la ciliogenèse ou sur PC2 entraînerait un défaut dans l'entrée de Ca^{2+} et perturberait la morphogenèse vasculaire (Goetz, 2014). L'ensemble de ces travaux démontre que les cils primaires sont des acteurs essentiels dans le développement et la maturation du système vasculaire chez les vertébrés.

2. Cil des cellules endothéliales

Le cil primaire des CE a largement été décrit et étudié au cours des 50 dernières années. La culture cellulaire *in vitro*, sur de nombreux types cellulaires comme les HUVEC (Cellule

endothéliale de veine ombilical humaine) ou encore les HAoEC (Cellule endothéliale aortique humaine) a grandement contribué à la compréhension du rôle du cil primaire au niveau vasculaire. Aujourd'hui, on attribue principalement au cil primaire des CE le rôle de senseur du flux sanguin. Comme décrit dans le chapitre précédent (D.2), la courbure du cil induite par le flux va déclencher la cascade de signalisation du NO grâce à la présence du complexe PC1/PC2 à la surface du cil. Ce mécanisme permet de réguler la vasodilatation et la vasoconstriction médiées par le flux. D'autres études ont également montré un rôle important du cil primaire des CE dans la régulation de la perméabilité ou encore dans la migration des CE. Très récemment, l'équipe de Diabougou a utilisé des CE artérielles de souris de type sauvage et *orpk/orpk* Tg737 déficientes en cils primaires exposées à une force de cisaillement physiologique (30 dynes/cm²) ou anévrisimal (2 dynes/cm²). Ils ont montré que les cellules dépourvues de cil primaire présentaient une résistance trans-endothéliale plus faible et donc une perméabilité augmentée. Ces observations sont corrélées à des niveaux faibles d'expression de ZO-1 qui entraîne une désorganisation des jonctions intercellulaires (Diabougou, 2022). Ces résultats viennent confirmer ceux obtenus précédemment par l'équipe de Jones en 2012. Avec l'utilisation des mêmes cellules de souris, ils ont montré que l'absence de cil primaire entraînait une modification de l'organisation du cytosquelette d'actine et de l'adhésion focale par la modulation de hsp27. Ces modifications induisent une altération de la migration des CE, passant d'une migration directionnelle uniforme à une migration aléatoire avec formation de fibres de stress et une phosphorylation réduite de FAK tyr397 (Jones, 2012). L'ensemble de ces études suggèrent que le cil primaire joue un rôle protecteur au niveau de l'endothélium des vaisseaux sanguins, garantissant son intégrité et ces fonctions. Les dysfonctions de celui-ci entraînent de nombreuses altérations pouvant conduire au développement de pathologies appelées ciliopathies qui seront détaillées par la suite.

3. Implication dans le développement de l'athérosclérose

Le rôle crucial du cil primaire dans l'intégrité vasculaire n'est plus à démontrer, cependant son implication dans le développement de l'athérosclérose reste encore floue et les études sur le sujet se font rares. Si les études vont maintenant dans le sens d'un rôle bénéfique et protecteur du cil primaire dans le développement de l'athérosclérose, la première étude sur le sujet faisait un tout autre constat. Van der Hein et son équipe (2008) ont conclu que le cil

primaire accélèrait la progression de l'athérosclérose. En effet, ils constatent que les souris déficientes en ApoE qui sont plus susceptibles à développer des plaques d'athérome possèdent un nombre de cils bien plus important dans l'arc aortique et dans les zones à fortes contraintes de cisaillement, en amont et en aval des lésions athérosclérotiques. Ces observations suggèrent qu'une corrélation existe entre la présence du cil primaire dans les zones de flux perturbé et la localisation des plaques d'athéromes. À tort, ils associent donc la présence de ces cils à l'apparition et au développement de l'athérosclérose. Les études plus récentes penchent toutes vers un rôle protecteur du cil primaire dans le développement de l'athérosclérose (Figure 21). Il a par exemple été montré que les cils primaires réduisaient la calcification vasculaire chez la souris ou encore que les cellules dépourvues de cils engageraient plus facilement la transition EndoMT via l'activation du facteur de transcription SLUG (Egorova, 2011 ; Sanchez-Duffhues, 2015). Les avancées majeures sur le sujet reviennent à Dinsmore et son équipe. En partant du postulat que les protéines PKD participent à la synthèse de NO induite par le flux et que la signalisation du NO limite l'athérosclérose (Kuhlencordt, 2001 ; Hopkins, 2013), ils ont analysé si les cils des CE étaient nécessaires à l'activation de la eNOS chez des souris double KO Tek-Cre IFT88 C⁻ ApoE^{-/-}. Ils ont constaté une réduction significative de l'activité de la eNOS causant l'augmentation de l'athérosclérose. Ajouté à cela, ils ont également montré que les souris ApoE^{-/-} nourries avec un régime riche en graisses et dépourvues de cils primaires sur les CE sont plus sensibles à l'athérosclérose et que les lésions athérosclérotiques étaient plus sévères chez ces souris. Finalement, une régulation positive des cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1 β , le TNF- α , le TGF- β et l'IL-6 a été observée (Dinsmore, 2016).

Le rôle protecteur du cil primaire contre le développement de l'athérosclérose est maintenant privilégié. Cependant, d'autres études sur le sujet seront nécessaires afin de confirmer cette hypothèse.

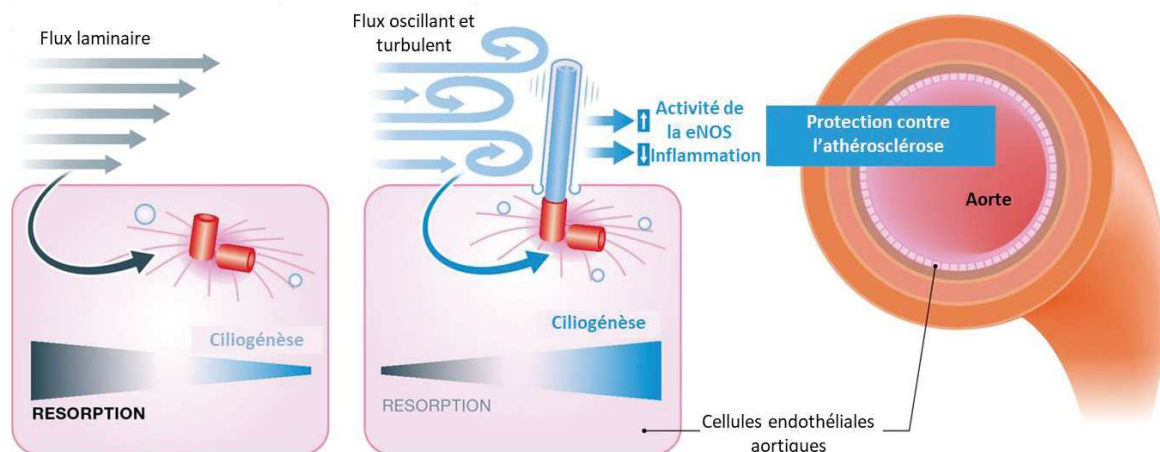


Figure 21: Rôle protecteur du cil primaire dans le développement de l'athérosclérose. D'après Schermer, 2016

F. Ciliopathies

Les dysfonctions du cil primaire conduisent la plupart du temps à l'apparition de défaillance d'organes et conduisent à l'apparition de maladies génétiques regroupées sous le nom de ciliopathies. Les ciliopathies regroupent des maladies très hétérogènes, mais bien souvent génétiques, avec des altérations diverses allant de l'apparition de kystes rénaux aux malformations cérébrales. Des atteintes secondaires sont également fréquemment observées avec notamment l'apparition d'une obésité et d'un diabète (Baker, 2009). Le cil primaire est impliqué dans le fonctionnement de nombreux organes et les atteintes cliniques peuvent se limiter à un seul ou à plusieurs organes. Malgré de nombreux symptômes, une certaine récurrence est observée permettant d'orienter le diagnostic vers une ciliopathie ou une autre. Les mutations peuvent toucher plusieurs protéines intervenant dans différentes régions du cil primaire. Les plus connues sont les mutations touchant les protéines du BBSome et causant le syndrome de Bardet-Biedl. D'autres mutations au niveau de la partie centrale du cil touchent les gènes *PKD1* et *PKD2* codant respectivement pour PC1 et PC2, causant notamment des atteintes rénales importantes comme les polykystoses rénales. Il n'existe actuellement aucun traitement curatif de ces maladies, bien que de nouvelles approches thérapeutiques fondées sur la meilleure compréhension du cil primaire soient en cours d'étude.

1. Syndrome de Bardet-Biedl

Le syndrome de Bardet-Biedl (BBS) est une maladie rare avec une prévalence comprise entre 1/120 000 et 1/160 000 en Europe. Le diagnostic de la maladie se base sur des critères cliniques décrits par Beales en 1999 (Beales, 1999). Pour qu'un patient soit considéré comme atteint du BBS, il doit posséder au moins 4 caractéristiques primaires ou trois caractéristiques

primaires et deux secondaires (voir tableau 1). Le diagnostic de cette maladie est compliqué du fait d'une apparition progressive des symptômes. Les premiers signes cliniques sont des reins hyperéchogènes, des kystes, une dilatation pelvienne et par la suite le développement d'une obésité qui est également retrouvée dans d'autres ciliopathies (Forsythe, 2013). Finalement, l'âge moyen du diagnostic est de 5,8 ans. La dystrophie rétinienne est le symptôme principal de cette maladie avec presque 100 % des patients atteints. Son origine n'est pas encore claire mais les hypothèses tendent vers une altération du trafic ciliaire (IFT) entraînant une dystrophie des cônes en bâtonnets ou au contraire bâtonnets en cônes (Mockel, 2011). Les mutations les plus courantes conduisant à ces phénotypes sont sur les protéines BBS1 et BBS10. Des corrélations entre génotype et phénotype ont été testées, cependant la grande variabilité phénotypique interfamiliale et intrafamiliale rend les prédictions compliquées (Zaghloul, 2009). Le deuxième signe clinique majeur est l'obésité avec une atteinte de presque 86 % des patients. Ceux-ci présentent un poids normal à la naissance et une apparition de l'obésité vers l'âge d'un an. Cette obésité est d'origine multifactorielle. Les modèles de souris démontrent une association entre une altération des protéines du BBSome et une augmentation de la prise alimentaire, une diminution de l'activité physique et une résistance périphérique à la leptine (Sheffield, 2010). En effet, des expériences sur des souris mutées pour certaines protéines du BBSome ont montré des niveaux plasmatiques accrus de leptine. De plus, des expériences de co-immunoprécipitation montrent que la protéine BBS1 interagit directement avec les récepteurs de la leptine et que la mutation commune M390R perturbe cette interaction (Seo, 2009). De nombreux autres signes cliniques qui ne seront pas décrits ici caractérisent ce syndrome (Tableau 1). À ce jour, aucun traitement n'est disponible pour le traitement de cette maladie, une meilleure connaissance du BBSome couplé à une thérapie génique pourrait être une approche intéressante et prometteuse dans le traitement de cette ciliopathie.

| <i>Caractéristiques principales</i> | <i>Fréquence</i> |
|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Dystrophie en bâtonnets et cônes | 93% |
| Polydactylie | 63–81 % |
| | Les quatre membres : 21 % |
| | Membres supérieurs uniquement : 9 % |
| | Membres inférieurs uniquement : 21 % |
| Obésité | 72–92 % |
| Anomalies génitales | 59–98 % |
| Anomalies rénales | 53% |
| Des difficultés d'apprentissage | 61% |

| <i>Caractéristiques secondaires</i> | <i>Fréquence</i> |
|-------------------------------------|------------------|
| Retard de la parole | 54–81 % |
| Retard de développement | 50–91 % |
| Diabète sucré | 6–48 % |
| Anomalies dentaires | 51% |
| Maladie cardiaque congénitale | 7% |
| Brachydactylie/ syndactylie | 46–100 %/8–95 % |
| Ataxie / mauvaise coordination | 40–86 % |
| Anosmie/hyposmie | 60% |

Tableau 1: Caractéristiques diagnostiques et prévalences dans le syndrome de Bardet-Biedl

2. La polykystose rénale

La polykystose rénale se caractérise par la présence de nombreux kystes sur les reins des patients. Il existe deux formes de la maladie, la polykystose rénale autosomique dominante (ADPKD) et la polykystose rénale autosomique récessive (ARPKD). L'ADPKD est une maladie courante qui se présente principalement chez les adultes, tandis que l'ARPKD est une forme

plus rare et souvent plus grave qui se présente généralement en période périnatale ou dans la petite enfance qui ne sera pas détaillée ici. L'ADPKD se traduit généralement par des mutations dans les gènes codant pour PC1 et PC2, respectivement *PKD1* et *PKD2*. La mutation la plus fréquente est sur *PKD1* (chromosome 16p13.3) responsable de près de 80 % des cas contre 15 % des cas attribués à la mutation sur *PKD2* (chromosome 4q22.1). Les ~ 5 à 10 % restants des cas de PKD sont génétiquement non résolus sont dus à de rares mutations dans d'autres locus ([Cornec-Le Gall, 2018](#)). Comme vu précédemment, le complexe PC1/PC2 permet de détecter le flux non seulement au niveau vasculaire mais également au niveau rénal. Les mutations entraînent donc un influx réduit de Ca^{2+} , l'augmentation des taux d'AMPc et l'activation aberrante de RAS–RAF–ERK dans les cellules épithéliales rénales qui sont des médiateurs importants de la croissance des kystes ([Nauli, 2003](#)). De plus, une signalisation accrue du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) et sa mauvaise localisation à la surface apicale des cellules épithéliales kystiques, ainsi que la présence des ligands EGF et du facteur de croissance transformant- α (TGF α) dans le liquide kystique, favorisent probablement la prolifération des cellules épithéliales tubulaires et la progression des kystes ([MacRae Dell, 2004](#)). Enfin, cette expansion des kystes entraîne des modifications du métabolisme cellulaire avec un passage à la glycolyse aérobie et une altération de l'oxydation des acides gras ([Rowe, 2013](#)). Les patients atteints de cette maladie présentent également des atteintes périphériques et notamment cardiovasculaires avec notamment une hypertension, une hypertrophie ventriculaire gauche, une dilatation de la racine aortique, des anévrismes artériels, des anomalies des valves cardiaques et des anévrismes intracrâniens. Ces altérations sont également dues à la perte de fonction du complexe PC1/PC2 qui joue un rôle crucial au niveau cardiovasculaire (Voir chapitre II.E.1).

III. Vésicules extracellulaires

Les vésicules extracellulaires (VEs) sont depuis une décennie au centre de la recherche scientifique tant dans le contexte physiologique que physiopathologique. Autrefois considérées comme des déchets relâchés dans le milieu extracellulaire par les cellules (Johnstone, 1987), il est aujourd'hui bien établi que ces VEs sont des acteurs clés dans la régulation de l'homéostasie de l'organisme. Les VEs sont des vésicules composées d'une bicouche lipidique libérées aussi bien par les cellules eucaryotes, y compris les cellules végétales, que les cellules procaryotes (Deatherage, 2012 ; Rome, 2019). Ces VEs sont retrouvées dans la plupart des fluides biologiques chez l'homme comme l'urine, le plasma, la salive ou encore le lait maternel. Du fait de leur grande diversité, la caractérisation et la classification de ces VEs restent encore incertaines et débattues. Le travail de la ISEV (Société internationale pour les vésicules extracellulaires) a permis l'établissement d'un document regroupement les informations nécessaires à l'étude des VEs (Théry, 2018). Cependant, les nouvelles découvertes sur le sujet font constamment évoluer les consensus sur le sujet. Néanmoins, la majorité des scientifiques s'accordent pour dire qu'il existe 3 grands types de VEs (Figure 22) :

- Les petites vésicules (sVEs), autres fois appelées exosomes, possèdent une taille comprise entre 30 nm et 100 nm et proviennent de corps multivésiculaires fusionnant avec la membrane plasmique
- Les grandes vésicules (IVEs), auparavant nommées microvésicules, possédant une taille comprise entre 100 nm et 1 µm et provenant du bourgeonnement de la membrane plasmique
- Les corps apoptotiques avec une taille généralement supérieure à 1 µm sont, quant à eux, générés lors de la vésiculation de cellules apoptotiques

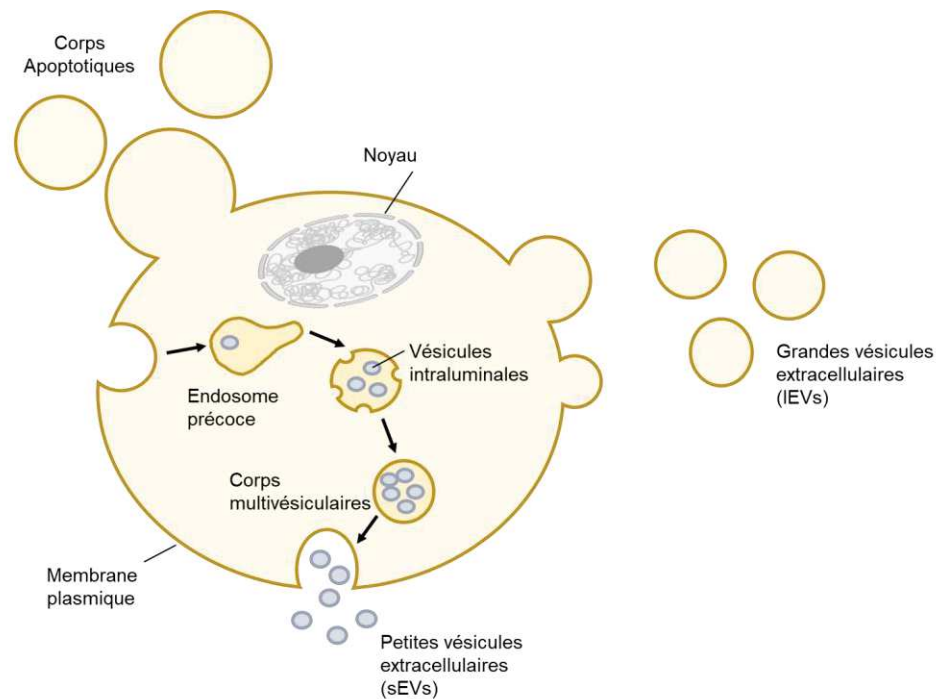


Figure 22: Différents types de VEs

Ces vésicules ont un contenu varié qui sera détaillé par la suite (Paragraphe H) avec un attrait particulier pour différents types de lipides, diverses protéines et acides nucléiques. L'ensemble de cette cargaison peut être impliqué dans la signalisation cellulaire et de nombreux processus comme l'angiogenèse (Ribeiro-Rodrigues, 2017).

G. Biogenèse

1. Les petites vésicules

Les sVEs proviennent de la maturation d'endosomes précoces en corps multivésiculaires contenant des vésicules intraluminales qui vont fusionner avec la membrane plasmique et libérer leur contenu par exocytose. Le rôle premier des endosomes est le recyclage de protéines et récepteurs jusqu'au lysosome (Huotari, 2011). Cependant, certains de ces endosomes échappent au processus de dégradation lysosomale et sont acheminés vers la membrane plasmique, où leur libération dans le milieu extracellulaire donne naissance aux sVEs (van der Groot, 2006). De façon générale, il existe deux grandes voies de biogenèse des sVEs, la voie dépendante du complexe ESCRT (complexe de tri endosomal requis pour le transport) et la voie indépendante de l'ESCRT. L'ESCRT est complexe multiprotéique subdivisé en 4 complexes ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II et ESCRT-III. L'adressage des cargaisons aux VEs se fait principalement par la présence ou non d'une ubiquitination de la protéine. La reconnaissance se fait par le complexe ESCRT-0 composé d'un hétérodimère HRS associé entre

autres à Esp15, la clathrine et les protéines STAM1/2. La clathrine favorise la reconnaissance des protéines mono-ubiquitées (Colombo, 2013). Une fois la cargaison liée au complexe, celui-ci recrute ESCRT-I (TSG101, Vsp28, VSP37A/B/C, Mvb12A/B) et lui transmet la cargaison via TSG101. ESCRT-I interagit ensuite physiquement avec l'hétérotétramère ESCRT-II (Vsp22, Vsp25, Vsp36) par l'intermédiaire de Vsp28 et Vsp36 (Schöneberg, 2017). Enfin, ESCRT-III (Chmp2A/B, Chmp3, Chmp4A/B/C et Chmp6) est recruté par l'interaction de Vsp25 avec Chmp6. ESCRT-III projette ces liaisons à la membrane sous forme de spirales stabilisées par la protéine accessoire ALIX. Cette conformation est l'élément clé permettant le remodelage de la membrane et sa scission. Enfin, l'ATPase VPS4 intervient pour finaliser la contraction et permet également de désassembler le complexe ESCRT-III et la libération des vésicules intraluminales (Saksena, 2009). (Figure 23)

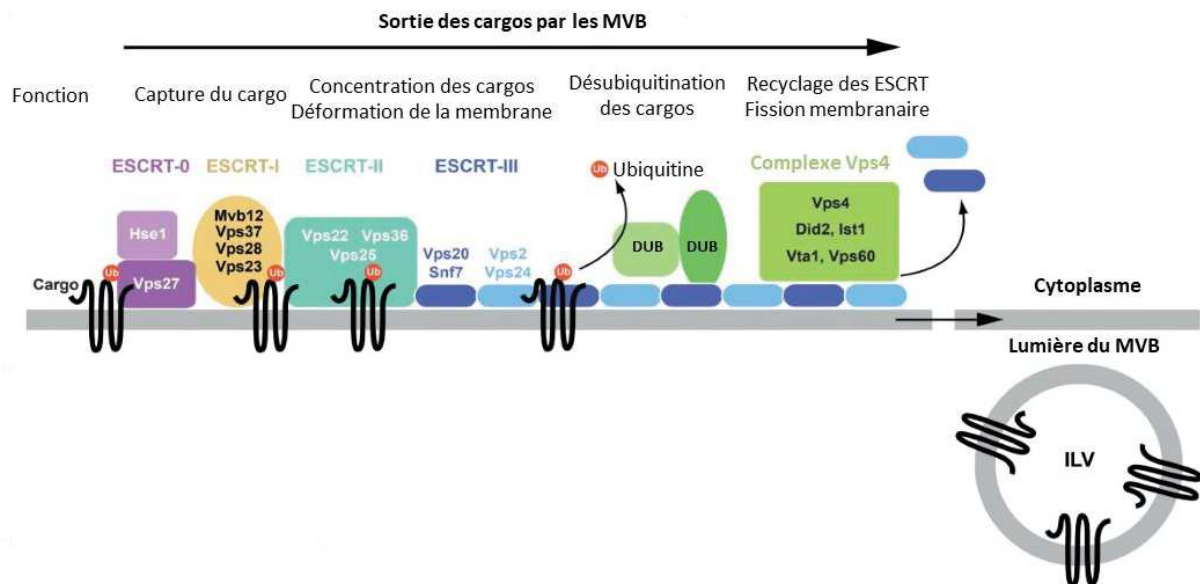


Figure 23: Rôle de la machinerie ESCRT dans la formation des vésicules intraluminales. MVB : corps multivésiculaire, ILV : vésicule intraluminale. D'après Mageswaran, 2013.

Les vésicules intraluminales peuvent également être formées de manière indépendante de l'ESCRT. En effet, une étude de Stuffers et son équipe (2009) a montré que l'inhibition totale de la machinerie ESCRT entraînait, tout de même, la formation de vésicules intraluminales. L'un de ces mécanismes est médié par la génération de céramide par la sphingomyélinase neutre de type II (nSMase2), qui hydrolyse la sphingomyéline en céramide. La céramide de par sa forme conique permet la génération de sous domaines membranaires qui vont imposer une courbure spontanée de la membrane pour former des vésicules intraluminales (Trajkovic,

2008). D'autres études montrent également un rôle important des tétraspanines dans la génération de sVEs. CD9, CD63 ou CD81 sont enrichis dans les sVEs en étant, de ce fait, des biomarqueurs intéressants pour la caractérisation de ces vésicules. CD63 est particulièrement enrichi dans la membrane des corps multivésiculaires et semble impliqué dans le tri endosomal dans les mélanocytes (Van Niel, 2011). CD9 et CD81 semblent également impliqués dans l'adressage des protéines aux sVEs. De plus, le fort enrichissement de ces tétraspanines à la membrane des corps multivésiculaires et la forme conique de certaines d'entre elles comme CD81 (Zimmerman, 2016) pourrait induire la formation de microdomaines et donc la courbure de la membrane.

Par la suite, les corps multivésiculaires contenant les vésicules intraluminales nouvellement formées sont acheminées jusqu'aux lysosomes si ces protéines sont ubiquitinées ou subissent une désubiquitination par les enzymes DUB. Ces DUB peuvent être des métalloprotéases dépendantes du zinc ou des protéases à cystéine (Clague, 2012). Les corps multivésiculaires ayant rencontré les DUB sont ensuite pris en charge par certains composants de la famille Rab tels que Rab7, Rab27A et Rab27B qui vont gérer l'acheminement vers la membrane plasmique. Les corps multivésiculaires sont ensuite pris en charge par le complexe SNARE composé de V-SNARE (vesicular-SNARE) localisé sur les corps multivésiculaires et de T-SNARE (Target-SNARE) sur la membrane plasmique. Le rapprochement des deux complexes permet la formation d'une structure à 4 hélices α permettant la fusion avec la membrane plasmique et la libération des vésicules intraluminales désormais appelées sVEs (Baker, 2016). (Figure 24)

La biogenèse des sVEs est un processus extrêmement complexe. Elle est ici décrite de manière généralisée ; cependant il existe de nombreux autres mécanismes et protéines impliquées qui vont dépendre de la cellule productrice de VEs (Bobrie, 2012).

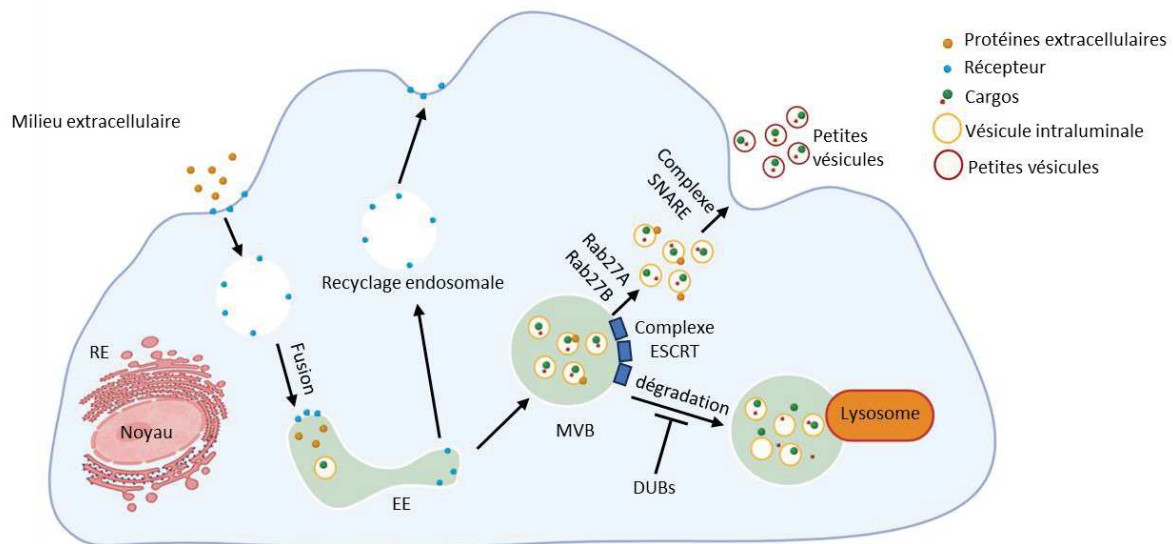


Figure 24: Processus de formation des sVEs. RE : Réticulum endoplasmique, EE : Endosome précoce, MVB : Corps multivésiculaires.

2. Les grandes vésicules

Les IVEs proviennent du bourgeonnement de la membrane plasmique. Les mécanismes qui permettent leur libération sont pour certains similaires à ceux impliqués dans la biogenèse des sVEs. Il a par exemple été montré que la protéine ARRDC1 (Arrestin Domain Containing 1) pouvait induire le bourgeonnement de la membrane plasmique par son interaction avec TSG101 au niveau de son motif PSAP. Cette interaction entraîne la relocalisation de TSG101 des corps multivésiculaires à la membrane de la cellule. L'ATPase VPS4 est également recrutée pour finaliser la scission de la membrane et libérer les ARMM (ARRDC1-mediated microvesicle) (Nabhan, 2012). Un autre processus est également impliqué dans la libération des IVEs, il nécessite un réarrangement du cytosquelette. Ce mécanisme est principalement médié par l'activation de petites protéines de liaison au GTP et en particulier ARF6 et ARF1. L'activation de la phospholipase D par ARF6 entraîne le recrutement de la kinase ERK (Extracellular signal-regulated kinases) à la membrane plasmique où elle phosphoryle à son tour la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCK, Myosin light-chain kinase). Enfin, la phosphorylation de MLC médié par MLCK entraîne la contraction de l'actomyosine et donc le bourgeonnement de la membrane plasmique (Muralidharan-Chari, 2009). ARF1 via l'activation des Rho GTPases, en particulier RhoA, phosphoryle également MLC via la voie de signalisation ROCK (Rho-associated protein kinase) (Schlienger, 2014). De plus, RhoA régule également le réarrangement du cytosquelette d'actine par la voie de signalisation RhoA-cofiline (Wilson, 2013). Il est également bien décrit qu'une augmentation calcique, en

particulier une augmentation soutenue de l'entrée de Ca^{2+} (Kunzelmann-Marche, 2001) induit l'activation de la calpaïne, une protéase capable de cliver les protéines du cytosquelette, ainsi que l'altération de la flippase, de la floppase et de la scramblase. Ces modifications entraînent une perte d'asymétrie des phospholipides membranaires et par conséquent le réarrangement du cytosquelette et le bourgeonnement (Hugel, 2005). (Figure 25)

Comme pour les sVEs, de nombreux autres mécanismes régissent le bourgeonnement de la membrane plasmique et sont dépendants du type cellulaire et de l'environnement extracellulaire.

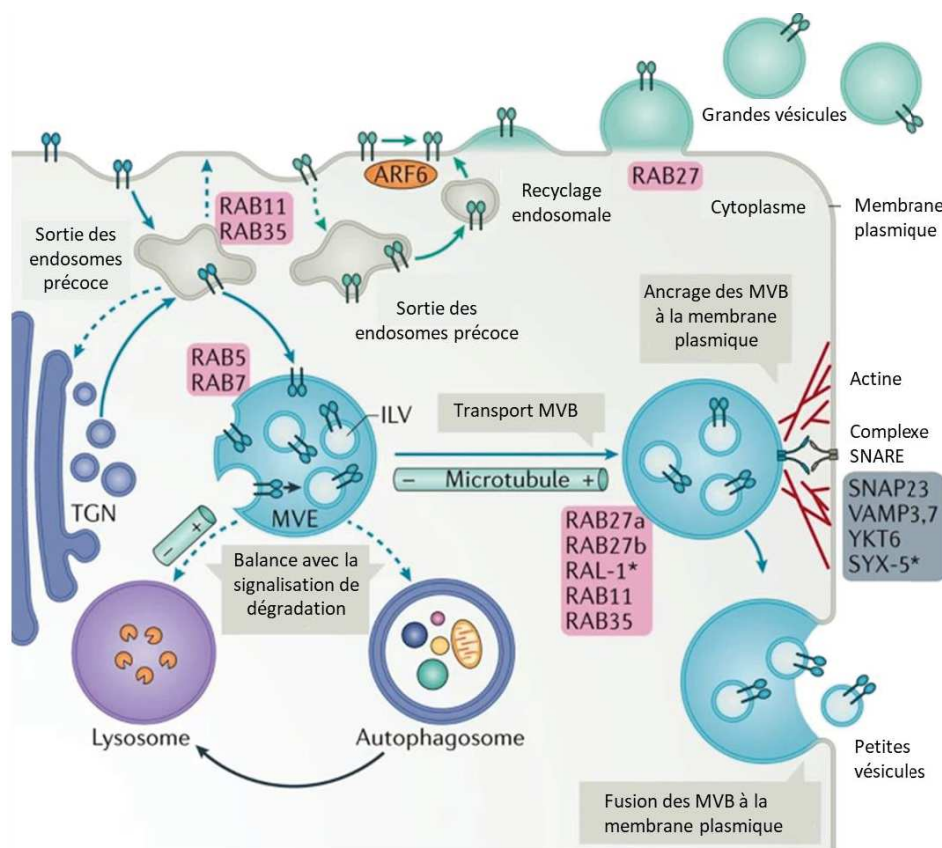


Figure 25: Exemple de voie de biogenèse des sVEs et des iVEs. D'après Van Niel, 2018

3. Les corps apoptotiques

L'apoptose des cellules se caractérise par des perturbations importantes de l'architecture cellulaire, entraînant la mort de la cellule, sous forme des modifications importantes de la membrane plasmique conduisant à la libération de corps apoptotiques puis leur phagocytose par les macrophages. L'une des modifications les mieux décrites est la translocation de la

phosphatidylsérine vers la couche lipidique externe. Ceux-ci vont se lier par la suite à l'annexine V qui va être reconnu par les cellules phagocytaires (Martínez, 2001). Par ailleurs une oxydation des molécules de surface favorise l'apparition de site de liaison à la thrombospondine et à la protéine du complément C3b qui vont par la suite être reconnus par les récepteurs présents à la surface des cellules phagocytaires (Friedl, 2002 ; Takizawa, 1996).

H. Composition des VEs

L'attrait des VEs comme biomarqueurs et potentiels vecteurs thérapeutiques a conduit la communauté scientifique à caractériser en profondeur ces VEs. L'obtention des VEs provenant de différentes origines, aussi bien des cultures de cellules primaires, des lignées cellulaires, des cultures de tissus ou isolés à partir du sang a permis l'établissement de nombreuses études protéomiques et l'enrichissement de base de données regroupant les protéines enrichies dans les VEs (Figure 26). On retrouve par exemple Vesiclepedia (Kalra, 2012) ou encore EVpedia (Kim, 2013).

1. Protéines et lipides associés

Il existe autant de types de VEs que de types cellulaires, il est donc difficile d'établir un profil protéomique type des VEs. De plus, les facteurs environnementaux, les signaux d'activation ou encore la méthode d'isolement peuvent influencer le contenu des VEs (Aatonen, 2014).

Les protéines qui sont retrouvées en grande majorité dans les sous types de VEs sont les protéines impliquées dans la biogenèse de celles-ci. Ainsi, on retrouve des protéines de la machinerie ESCRT et ses protéines accessoires (Alix, TSG101, HSC70 et HSP90 β) enrichies dans les sVEs (Théry, 2001 ; Géminard, 2004). De plus, les tétraspanines et en particulier CD63, CD9 et CD81 sont retrouvées enrichies dans les sVEs par rapport au lysat cellulaire (Witwer, 2013). Autrefois considérées comme des marqueurs spécifiques des sVEs, il est maintenant établi que ces tétraspanines peuvent également être retrouvés dans les IVEs et les corps apoptotiques (Bodrie, 2013 ; Colombo, 2013). Les IVEs sont, quant à elles, enrichies en protéines cytosoliques, de la membrane plasmique, du cytosquelette mais leur composition reste tout de même hétérogène. Les ARMM seraient, par exemple, enrichies en composants de l'ESCRT (TSG101, CHMP3, CHMP6, CHMP1B, Vsp37A/B/C/D, Vsp25, Vsp28 et Vsp36) mais également en ligases de la famille Nedd4 E3 et en récepteur Notch (Wang, 2017). Enfin, il existe pléthore de combinaisons protéiques en fonction des VEs isolées, par exemple l'étude

de Jeppesen (2019) montre l'absence de TSG101 dans les vésicules exprimant CD63 ou CD81 mais sa présence dans les vésicules positives pour CD9.

La présence de lipides dans les VEs est également très variable en fonction du type cellulaire et de la biogenèse de ces VEs. Elles sont généralement enrichies en sphingomyéline, cholestérol, phosphatidylsérine et glycosphingolipides (Record, 214).

2. Cytokines associées

De manière tout à fait intéressante, les VEs se sont révélées être porteuses d'importants médiateurs solubles comme les cytokines (Piquet, 2022). L'un des exemples les plus marquants est le transport d'IL-1 β par les VEs après activation de son récepteur P2X₇ par l'ATP. Cette activation entraînerait une perte d'asymétrie de la membrane plasmique et la libération de IVEs contenant IL-1 β (MacKenzie, 2001). D'autres cytokines, comme l'IL-18, IL-32 ou encore MIF (Macrophage migration inhibitory factor), peuvent également être retrouvés dans les vésicules (Gulinelli, 2012 ; Hasegawa, 2011). De façon intéressante, le TNF (Zhang, 2006) ou encore le VEGF d'origine plaquettaire (Kim, 2004) se retrouve également dans les EVs.

3. Acides nucléiques associés

Différents acides nucléiques sont retrouvés dans les EVs. Ils peuvent être liés à des complexes protéiques ou sous une forme libre circulante. La présence d'ARN messagers (ARNm) dans les EVs a été décrite pour la première fois en 2006 dans les EVs dérivées de cellules souches murines (Ratajczak, 2006) et en 2007 dans les EVs dérivées de mastocytes murins absorbés par les mastocytes humains (Valadi, 2007). Par la suite, de nombreuses études ont montré la présence d'ARN non codant, de miARN, d'ARN ribosomique (ARNr), et de nombreux autres ARN (Kogure, 2013 ; Mittelbrunn, 2011 ; Huang, 2013). Cependant, ces études sont à interpréter prudemment ; en effet, la vérification de la localisation intraluminaire de l'ARN dans les VEs, est principalement réalisée par un traitement à la RNaseA car leur présence peut être également due à un co-isolément de complexe nucléoprotéiques (Valadi, 2007). Cependant, certaines études ont rapporté que l'interaction des ARN avec la protéine Ago2 peut induire une résistance à la RNaseA (Li, 2012). Certains auteurs suggèrent donc qu'un prétraitement avec la protéinase K, qui rend les complexes AGO-ARN sensibles à la dégradation par la RNase, devrait également être effectué (Shelke, 2014).

L'étude des ADN présents dans les EVs est beaucoup moins répondu. Cependant, de plus en plus de travaux montrent la présence d'ADN mitochondriale (ADNmt), d'ADN simple brin (ADNsb) ou double brin (ADNdb) dans les EVs (Guescini, 2010 ; Thakur, 2014). La présence d'ADN dans les EVs pourrait être expliquée comme un moyen d'élimination des fragments endommagés pour maintenir l'homéostasie cellulaire (Takahashi, 2017). Le transfert de l'ADNmt par les EVs pourrait représenter, quant à lui, une voie alternative par laquelle l'ADNmt modifié peut pénétrer dans d'autres cellules, favorisant la diffusion de diverses pathologies (Guescini, 2010).

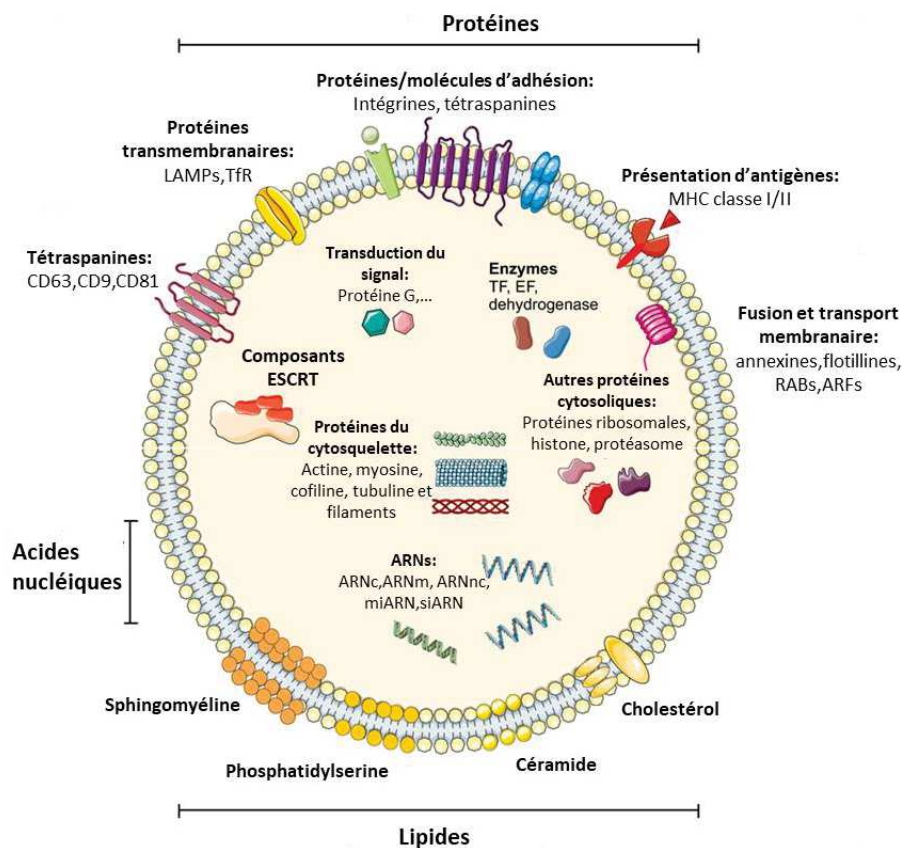


Figure 26: Composition des VEs. D'après Shahraki, 2023.

I. Devenir des EVs au niveau des cellules cibles

Une fois libérées dans le milieu extracellulaire, les VEs peuvent atteindre les cellules cibles afin de délivrer leur contenu et induire des changements phénotypiques qui affecteront leur état physiologique ou pathologique. L'interaction des VEs avec leur cellule cible peut se faire de plusieurs manières en fonction de l'origine de ces VEs mais également de l'identité de la cellule cible (Mulcahy, 2014). Ces interactions VEs/cellules réceptrices sont gérées par plusieurs éléments cellulaires, et en particulier, les tétraspanines, les intégrines, les lipides, les lectines,

les protéoglycanes ou encore les composants de la matrice extracellulaire. Cependant, la sélection du mode d'interaction n'est pas toujours claire et dépend probablement de la nature des VEs et des cellules cibles. Par exemple, il a été montré que les intégrines présentes à la surface des VEs peuvent interagir avec les molécules ICAM à la surface des cellules ([Morelli, 2004](#)). Les tétraspanines semblent également être de bons candidats dans la reconnaissance des intégrines ([Hoshino, 2015](#)).

Une fois en contact avec les cellules cibles, les VEs peuvent agir à la surface des cellules par l'interaction de récepteurs avec leur ligand. C'est le cas des VEs présentant des complexes CMH II-peptides qui vont se fixer aux récepteurs des lymphocytes T ([Tkach, 2017](#)). Les VEs peuvent être internalisées par endocytose médiée par la clathrine ou par macropinocytose ou phagocytose, de manière indépendante de la clathrine. On retrouve également des mécanismes d'endocytoses via les cavéoles et les radeaux lipidiques. Ces mécanismes sont fortement dépendants du type cellulaire. En effet, une étude récente de Horibe et ses collaborateurs ([Horibe, 2018](#)) montre que l'internalisation des VEs par les cellules HTC116 est régit uniquement par la voie dépendante des clathrines alors que l'internalisation au niveau des cellules COLO205 peut se faire soit par endocytose dépendante de la clathrine ou par endocytose via les caveolines. Un processus de fusion membranaire est également retrouvé lorsque le pH est acide ce qui pourrait expliquer que ce soit le mécanisme préférentiellement utilisé en milieu tumorale ([Parolini, 2009](#)).

Les vésicules peuvent libérer différents contenus aux cellules cibles, à savoir des ARNm ou des miARN mais également transférer des lipides ou protéines. Un exemple concret est le transfert de l'EGRF sous sa forme oncogénique EGFRvIII aux cellules tumorales ([Al-Nedawi, 2008](#)). (Figure 27)

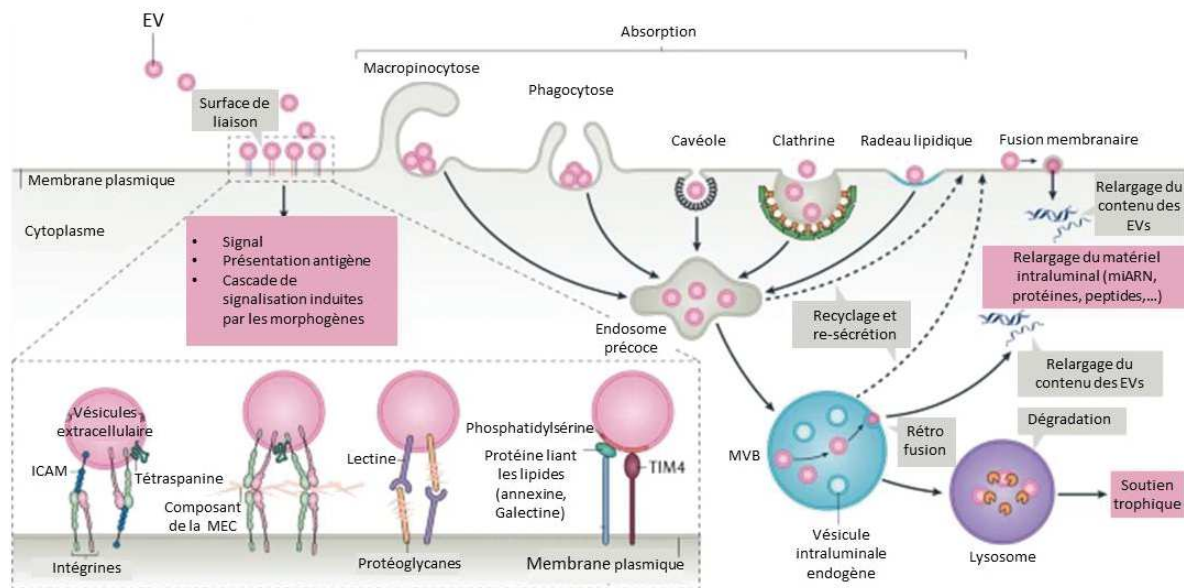


Figure 27: Devenir des vésicules à la surface des cellules cibles. D'après Van Niel, 2018.

J. Rôle biologique des VE

1. La communication inter-cellulaire

Les VE sont impliquées dans une multitude de processus physiologiques. Les VE sont transportées par les fluides corporels et peuvent donc agir sur des cellules cibles parfois très éloignées de leur cellule d'origine. Leurs interactions sont tellement nombreuses qu'il serait impossible de tout résumer ici. Ainsi, seulement quelques exemples seront développés dans cette partie. Des membranes lipidiques ont été identifiées dans les urines pour la première fois dans les années 90 (Kanno, 1995). L'identification de ces fractions membranaires en tant que VE est décrite en 2004 par Pisitkun et ses collaborateurs (Pisitkun, 2004). Le transfert d'aquaporine-2 (AQP2) par les VE est un exemple du rôle des VE urinaires dans la communication inter-cellulaire. AQP2 est une protéine jouant un rôle dans le transport apical du sodium (Na^+) qui est transporté des cellules du canal collecteur rénal à la membrane plasmique apicale du néphron par le biais des VE. Celles-ci en fusionnant avec la membrane entraînent une augmentation de la perméabilité à l'eau du néphron (Kamsteeg, 2006). La salive est également une grande source de VE ayant différents rôles. A titre d'exemple, des VE isolées de la salive des sujets sains sont enrichies en CD26 et en facteur tissulaire. Le CD26 est capable de cliver les peptides tel que la substance P et les chimiokines (Ogawa, 2011). Le facteur tissulaire quant à lui peut initier la coagulation. Cela pourrait expliquer un comportement physiologique retrouvé chez les mammifères à savoir lécher les plaies pour

favoriser la coagulation et la cicatrisation (Berckmans, 2011). Un dernier exemple est la présence de VEs dans le liquide synovial pouvant jouer un rôle important dans les processus inflammatoires de certaines pathologies comme la polyarthrite rhumatoïde. Les premières études sur les VEs synoviales ont montré l'accumulation et la distribution des protéines citrullinées portées par ces VEs dans le liquide synovial suggérant un rôle important dans les mécanismes auto-immuns puisque les peptides citrullinés sont des auto-antigènes spécifiques dans la polyarthrite rhumatoïde (Skinner, 2006). Les VEs sont retrouvées dans de nombreux autres fluides comme la bile, le liquide céphalo-rachidien ou le sang où elles vont intervenir dans des processus physiologiques et pathophysiologiques.

1. Rôle au niveau cardiovasculaire

Au niveau cardiovasculaire, les VEs vont jouer un rôle aussi bien dans le contexte physiologique que physiopathologique. Leur implication dans de nombreuses maladies n'est plus à démontrer, en revanche leur rôle dans la régulation cardiovasculaire est plus flou. Néanmoins, leur implication dans la coagulation ou encore l'angiogenèse est bien établie.

La coagulation est le rôle physiologique des VEs au niveau cardiovasculaire le mieux documenté. Leur capacité pro-coagulante a été démontrée au cours de pathologies et notamment dans les cellules cancéreuses où ce processus semble amplifié (Dvorak, 1981). Les VEs dérivées de plaquettes de par la présence de phosphatidylsérine, CD61, CD62P et du facteur X à leur surface ont une capacité pro-coagulante 50 fois plus élevée que les plaquettes activées (Sinauridze, 2007). Mon équipe a auparavant démontré l'effet pro-angiogénique des VEs notamment en modulant l'activité des CE. Le morphogène SHH semble fortement impliqué dans ces processus. En effet, il a été démontré que les VEs^{SHH+} favorisent non seulement l'activation de la voie de signalisation du NO mais également la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Le traitement de CE avec les VEs^{SHH+} induit la formation de structures capillaires sur Matrigel®. Ce processus a été fortement affecté lorsque de SHH a été inhibé suggérant un rôle important de cette voie dans la régulation des processus d'angiogenèse. De plus, ces VEs favorisent également l'adhésion cellulaire et augmentent la production de ICAM-1, Rho A et de facteurs proangiogéniques tel que le VEGF. Cette étude montre le rôle clé de la voie SHH dans les processus d'angiogenèse (Soleti, 2009). Mon équipe a également montré des effets *in vivo*. Le traitement avec les VEs^{SHH+} de souris ayant subi une ischémie des membres postérieurs a montré une récupération du flux sanguin et un nombre

de capillaires augmenté dans le membre ischémié comparé au membre non ischémié suggérant une augmentation de la néovascularisation (Benameur, 2010). Plus tard, mon équipe a également démontré un rôle bénéfique et protecteur des VEs^{SHH+} au niveau cardiaque à partir d'un modèle d'infarctus de myocarde chez le porc (Ghaleh, 2020). Les VEs de différentes origines induisent également une augmentation de l'angiogénèse. Par exemple, il a été montré que les VEs circulantes activent la voie NF-κB via le récepteur PPARα (Benameur, 2010). Les VEs dérivées de CE induisent quant à elles une angiogénèse médiée par le transfert de miARN-126 et l'activation ultérieure de la voie CXCL12/CXCR4 (Zernecke, 2009). (Figure 28)

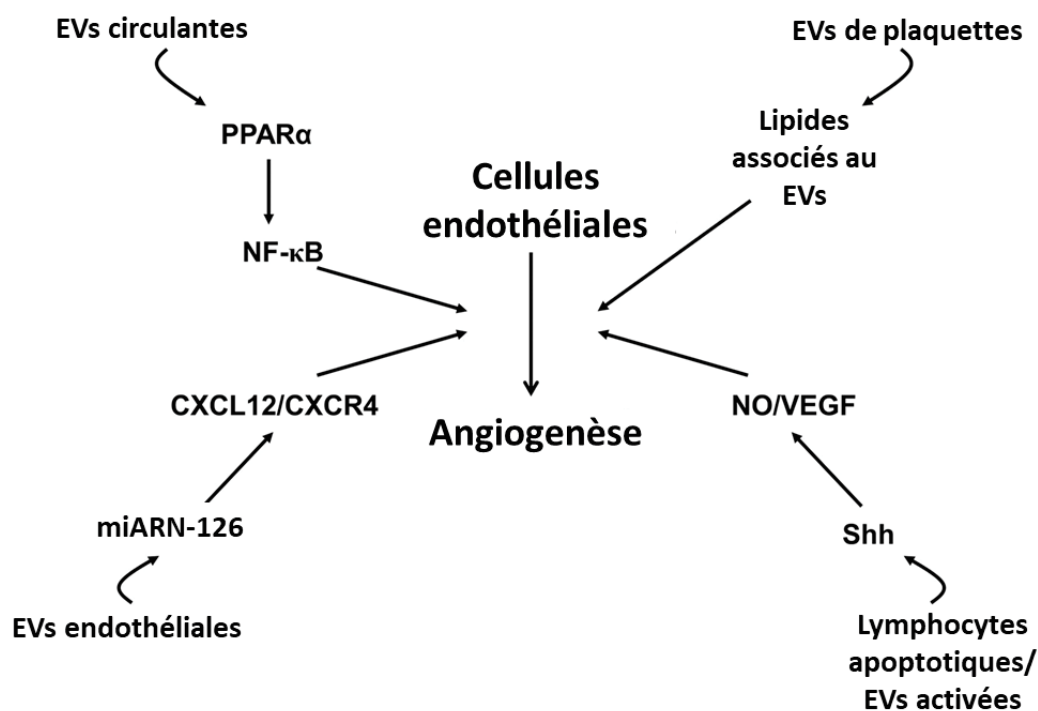


Figure 28: Différentes voies de modulation de l'angiogénèse par les VEs. D'après Martinez, 2011

K. Implications physiopathologiques : exemples de l'athérosclérose

Les VEs sont également de puissants effecteurs de l'inflammation cardiovasculaire ce qui en fait également d'excellents biomarqueurs de certaines pathologies. Leur rôle dans le développement de l'athérosclérose n'est plus à démontrer.

En plus de l'activation de l'endothélium, comme décrit dans le Chapitre I, les VEs dérivées de différentes origines cellulaires favorisent également le développement de cette pathologie à différents stades. Les VEs dérivées des plaquettes activées entraînent une augmentation de la phagocytose des LDLox et la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages

(Feng, 2019). De plus une étude menée par Ousmaal et son équipe sur les VEs isolées d'un modèle de gerbille *Psammomys obesus* dyslipidémique nourri avec un régime riche en énergie (HED) a montré une modification drastique de la fonction vasculaire avec une forte diminution de l'expression de la eNOS et de la cav-1 et une augmentation de la production de ROS ainsi que de l'expression de ICAM-1 favorisant la dysfonction endothéliale vasculaire et l'augmentation de l'inflammation (Ousmaal, 2020). L'activation des macrophages peut également se faire par l'intermédiaire des ligands TLR et ainsi initié la formation de cellules spumeuses augmentant ainsi l'inflammation au sein du vaisseau (Keyel, 2012). Une étude menée par les membres de mon laboratoire sur des patients atteints d'un syndrome métabolique (Mets) a montré que les IVEs de ces patients favorisaient l'augmentation de la perméabilité endothéliale dépendante de Rap1 mais également la migration et la prolifération des CML. De plus, ces IVEs Mets ont également augmenté l'expression de molécules pro-inflammatoires et l'activation des voies ERK5/p38 favorisant ainsi le développement de l'athérosclérose (Perdomo, 2020)

D'autres évènements peuvent également favoriser la pathologie. Comme décrit précédemment, les VEs jouent un rôle clé dans la coagulation et l'angiogenèse. Ces deux processus sont fortement impliqués dans l'athérosclérose et notamment dans la néovascularisation intraplaque et dans la déstabilisation de la plaque. Les VEs dérivées de cellules spumeuses favorisent la migration des CML mais également l'angiogenèse par un transfert de miRNA 150. De plus, les VEs exprimant CD40, une glycoprotéine appartenant à la famille des TNFRs, favorise également la prolifération des CE et l'angiogenèse. La mise en place de ces processus dans les plaques avancées entraîne une forte instabilité, la rupture de la plaque et peut conduire à l'apparition d'une thrombose (Zhang,2010 ; Leroyer,2008). Lors de la rupture de la plaque, les VEs portant le facteur tissulaire actif à leur surface initient le processus de coagulation en présence de fortes concentrations de phospholipides tels que la phosphatidylsérine. Cet environnement favorise les processus pro-thrombotiques et donc les complications liées à la maladie (Leroyer, 2007). Enfin, les VEs de la plaque jouent un rôle clé dans la progression de sénescence et de la formation du noyau nécrotique. Ces cellules bien que sénescents sont toujours métaboliquement actives et sécrètent non seulement des cytokines pro-inflammatoires mais également des VEs phénotypiquement sénescents (Stojanović, 2020). Même si cela reste à confirmer, ces VEs pourraient induire la sénescence

des cellules voisines. Une étude portant sur les vésicules de patients âgés atteint d'un syndrome coronarien aigu montre que celles-ci induisent la sénescence des CE *in vitro* par l'activation des voies Ang II/AT1R/NADPH et PI3K (Abbas, 2017). D'autres preuves de l'implication de ces VEs dans la sénescence des cellules au cours de l'athérosclérose est la présence de facteur pro-sénescence comme ADAM-17 ou encore les miRNA 21 et 217 (Canault, 2007 ; Mensà, 2020).

Malgré de nombreux rôles délétères des VEs dans la progression de la pathologie, des processus athéroprotecteurs sont mis en place et également médiés par les VEs. Par exemple, le stress des CE lié aux forces de cisaillement augmenté dans les stades précoces de l'athérosclérose entraîne la libération de VEs porteuses de miRNA 143/145 qui vont réduire l'expression de ELK1 et CAMK2d, deux régulateurs du phénotype des CML. Cette modification d'expression entraîne la dédifférenciation des CML et réprime leur prolifération, contribuant ainsi aux effets athéroprotecteurs des VEs mis en place lors de la progression de la plaque (Vion, 2013). De plus une étude *in vivo* avec un modèle de souris ApoE^{-/-} présentant des prédispositions au développement de l'athérosclérose montre que l'administration de VEs dérivées de CE apoptotiques entraîne une réduction de la surface de la plaque et de l'infiltration des macrophages et favorise la mobilisation des cellules progénitrices via la production de chimiokine CXCL12, un facteur de survie anti-apoptotique qui permet, dans un contexte d'athérosclérose, la stabilisation de la plaque (Zernecke, 2009).

De part leur nombreuses implications dans la pathologie, ces VEs peuvent être de puissants biomarqueurs présents dans les étapes précoces de la maladie et pouvant favoriser une prise en charge plus rapide des patients. De plus, les avancées cliniques au cours de ces dernières années sur l'utilisation des VEs en tant que vecteurs thérapeutiques montrent des résultats prometteurs comme l'utilisation de VEs^{SHH+} dans le traitement de l'ischémie myocardique (Ghaleh, 2020). La génération de VEs à visé thérapeutique dans le traitement ou la régulation de l'athérosclérose pourrait donc être envisagé.

L. Vésicules extracellulaire issues du cil primaire

Les connaissances actuelles et les études sur les VEs issues du cil primaire sont encore peu nombreuses. Aujourd'hui, les connaissances mécanistiques ainsi que le rôle physiologique de ces VEs sont encore limités.

1. Historique

Les premières études mettant en évidence la production de VEs par le cil primaire ont été faites sur les organismes modèles *Chlamydomonas reinhardtii* et *Caenorhabditis elegans*. La division cellulaire de l'algue unicellulaire *Chlamydomonas* est très contrôlée. Lorsque la cellule atteint sa taille maximale, ces flagelles sont résorbés et elle entame un processus de division cellulaire permettant la formation de cellules fille appelées sporanges. Ces sporanges sont enfermés dans la paroi cellulaire de la cellule mère et entament leur processus de croissance avec notamment la formation des flagelles. Une enzyme lytique végétative (VLE) est ensuite produite pour digérer la membrane cellulaire mère et ainsi libérer les cellules filles. (Figure 29)

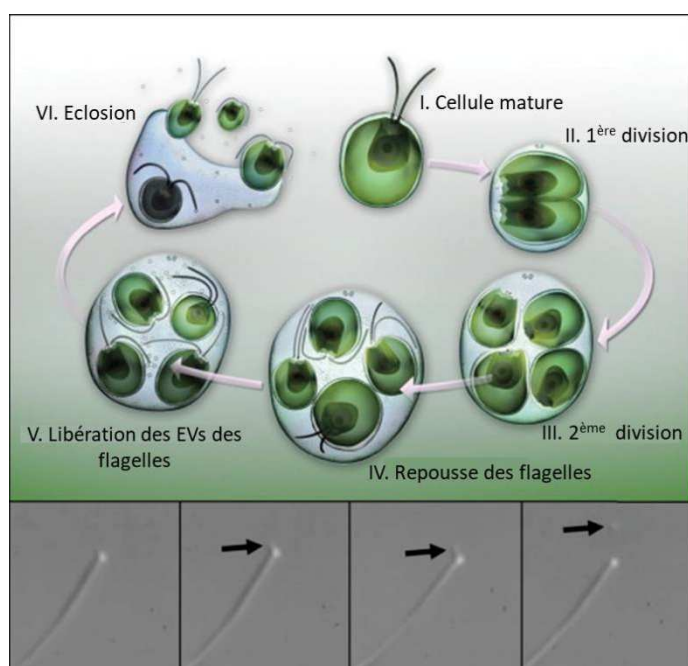


Figure 29: Cycle de vie de l'algue unicellulaire *Chlamydomonas* et identification des VEs ciliaires. La cellule mature résorbe ses flagelles (I), puis subit plusieurs cycles de division cellulaire (II et III) à l'intérieur de la paroi de la cellule mère. Les cellules filles font repousser leur flagelle (IV). Les VEs porteuses de protéases sont libérées des flagelles des cellules filles (V). L'écllosion se produit lorsque la protéase digère la paroi de la cellule mère, libérant les cellules filles (VI). Les 4 panneaux en bas montre la production d'une vésicule par un flagelle. D'après Wood, 2013.

Pendant longtemps, la manière dont cette enzyme était libérée était inconnue. Kubo et son équipe ont identifié que la VLE se trouvait dans les flagelles des cellules fille mais la manière dont celle-ci était adressée à la paroi cellulaire mère était inconnue (Kubo, 2009). Des VEs, ici appelées ectosomes, avaient été observées autour des sporanges mais leur rôle restait à déterminer. En 2013, le laboratoire de Wood, utilise la même préparation d'anticorps utilisé précédemment par Kubo pour identifier la VLE. Wood couple ces anticorps à de la microscopie à fluorescence et identifie rapidement la VLE non seulement dans les flagelles mais également

dans les ectosomes, apportant la première preuve de la libération de VEs par les flagelles. Ils identifient également la présence de PC2 et d'autres protéines ciliaires dans le contenu de ces ectosomes (Wood, 2013). Le mécanisme par lequel ces VEs sont produites est ensuite mis en évidence par Cao et son équipe (2015).

Plus tard un phénomène similaire est rapporté chez le ver *Caenorhabditis elegans*. Ce ver possède 302 neurones dont 60 sont ciliés. Trente deux de ces 60 neurones sensoriels ciliés sont directement ou indirectement exposés à l'environnement extérieur. Parmi ces 32 neurones, 6 libèrent des VEs suggérant que la production de VEs est une propriété intrinsèque de certains neurones ciliés (Wang, 2014). Chez le mâle, 48 neurones ciliés spécifiques sont identifiés, parmi ces neurones 21 produisent des VEs exprimant des polycystines spécifiques aux mâles *lov-1* et *pkd-2*. Ces VEs sont libérées dans l'environnement et permettent la mise en place des processus de reproduction du ver. L'évolution des outils moléculaires a permis, par la suite, d'identifier la protéine kinésine-3 KLP-6 et la protéine myristoylée coil-coil CIL-7 comme étant spécifiquement exprimées dans ces cils et régulant la biogenèse des VEs (Mauguire, 2015 ; Wang, 2014).

Chez l'homme, la première évidence de la production de VEs ciliaires a été obtenue lors de l'étude de la polykystose rénale. Plusieurs équipes ont tenté d'identifier des biomarqueurs de cette maladie à travers l'analyse des VEs contenues dans les urines de ces patients (Pisitkun, 2004). En parallèle, l'identification de PC1 et PC2 comme protéines mutées lors de la maladie et leurs localisations dans le cil primaire sont établies. La microscopie électronique du tissu rénal de ces patients a révélé une abondance de sVEs membranaires associées à la surface des cils du canal collecteur. Des observations similaires ont été faites dans l'arbre biliaire de souris mutantes *Pkhd1* (Hogan, 2009). Rapidement, un parallèle est fait entre les VEs urinaires récupérées et ces VEs observées. L'identification d'une sous population positive pour PC1 et PC2 est identifiée mettant ainsi en évidence une relation forte entre le cil primaire et ces VEs. Il a été rapporté que le protéome de ces VEs était enrichi en protéines impliquées dans la biogenèse des vésicules intraluminales, qui se forment dans les corps multivésiculaires et sont libérées sous forme de sVEs lors de la fusion des corps multivésiculaires avec la membrane plasmique. De plus, PC1 a été observé sur des corps multivésiculaires de cholangiocytes de rat par microscopie électronique, suggérant que les VEs positives pour PC1 pourraient suivre la voie de biogenèse des sVEs (Hogan, 2009).

2. Connaissances actuelles

Il existe très peu d'études sur le rôle des VEs ciliaires chez les mammifères aussi bien dans les conditions physiologiques et pathologiques. La biogenèse et le contexte dans lequel elle se produit reste également flou. La revue écrite par Naharros et Nachury résume certains de ces mécanismes en insistant sur le fait que cela ne pourrait pas être universellement appliqué à tout type de cils. Parmi les mécanismes mis en jeu, on retrouve, par exemple, la polymérisation des réseaux d'actine ou encore un bourgeonnement similaire aux VEs médié par les complexes ESVRT et l'ubiquitine (Naharros, 2022). Plusieurs études proposent un rôle de ces VEs dans la régulation de la longueur des cils, la reprise du cycle cellulaire, la prolifération cellulaire (Wang, 2019; Hoang-Minh, 2018) ou encore le maintien de l'homéostasie cellulaire et les fonctions cardiovasculaires. Il a été documenté que certains récepteurs peuvent être libérés par les VEs ciliaires pour maintenir l'homéostasie ciliaire. C'est le cas, par exemple, de la GRP161 (un récepteur orphelin surexprimé dans le cancer du sein triple négatif) et de SSTR3 (un récepteur de la somatostatine) (Nager, 2017). Ces auteurs ont démontré que, lorsque la machinerie BBSome est dysfonctionnelle, les GPCR dont GRP161 ne sont pas recyclés dans les corps cellulaires mais concentrent au niveau de la partie distale du cil avant d'être libéré dans l'environnement extracellulaire par les VEs ciliaires. Les auteurs proposent que ce mécanisme permet de limiter ou d'arrêter la signalisation induite par la stimulation par les hormones.

L'analyse protéomique des VEs a permis de mettre en évidence des protéines enrichies en certains composants de la dégradation de la matrice extracellulaire comme les métalloprotéinases matricielles telles que MMP2 et MMP9, les tétraspanines, les intégrines, les récepteurs de surface ou encore les protéines d'adhésion (Choi, 2015). (Figure 30)

En revanche, l'analyse des protéines de VEs ciliaires reste très vague. Quelques études comme celle de Mohieldin ont mis en évidence des protéines spécifiques des VEs ciliaires comme c'est le cas pour la NADPH-cytochrome P450 réductase (Mohieldin, 2021). La même équipe a par ailleurs identifié de multiples protéines de signalisation, dont le récepteur kinase BMPR2, le récepteur de la transferrine TFRC, une protéine d'adhésion cellulaire F11R, le récepteur tyrosine phosphatase PTPRS et le récepteur de la progestérone PGRMC2 comme étant localisés dans les VEs ciliaires. L'originalité de cette étude est que les VEs ciliaires sont obtenues après l'application de forces de cisaillement reproduisant ainsi un environnement

vasculaire (Mohieldin, 2020). Une étude précédente avait mis en évidence l'implication de ces protéines dans la fonction cardiovasculaire chez le poisson zèbre et la souris mais également dans le développement de pathologies comme les anomalies arythmogènes cardiaques et l'œdème, ainsi que l'hydrocéphalie, les boucles cardiaques randomisées pendant le développement embryonnaire et les reins kystiques. Toutes ces pathologies ont par la suite été liées à une dysfonction ciliaire (Reiter, 2017).

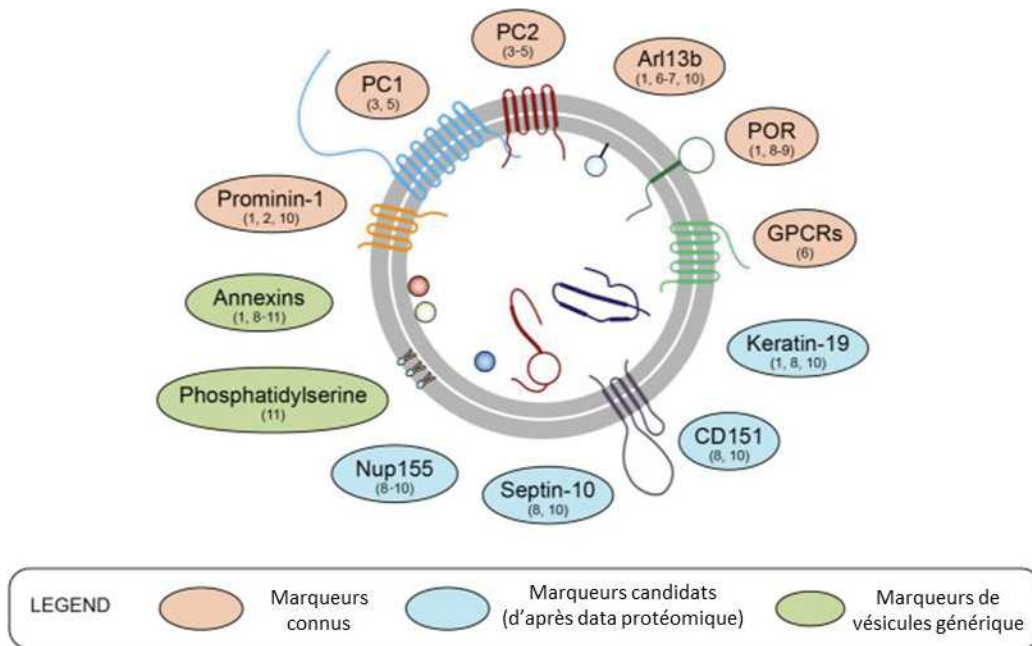


Figure 30 : Marqueurs et marqueurs candidats des VE ciliaires. La comparaison croisée des données protéomiques du cil primaire et des VE ciliaires a permis d'identifier plusieurs marqueurs potentiels, en plus de ceux déjà décrits dans la littérature. Références : ishikawa,2012 ; Dubreuil,2007 ; Yoder,2002 ; Pazour,2002 ; Hogan,2009 ; Nager,2017 ; Phua,2017 ; Mohieldin,2021 ; Volz,2021 ; Mick,2015 ; Théry,2018. D'après Vinay, 2022.

Enfin, chez *C. reinhardtii*, les VE ciliaires contiennent l'enzyme peptidylglycine α -amidating monooxygenase (PAM) et d'autres composants de la machinerie de signalisation peptidergique, y compris un produit peptidique amidé qui agit comme un modulateur chimiotactique pour les gamètes (Luxmi, 2019). La PAM a également été identifiée dans les cils primaires et motiles des vertébrés et une altération de son expression a des impacts majeurs sur la ciliogénèse (Kumar, 2016). En revanche, leur implication dans les ciliopathies n'est pas encore confirmée.

Objectif du travail de thèse

Comme le résume ces études, de nouvelles protéines et de nouveaux rôles sont attribués à ces VEs ciliaires au fil du temps. Cependant, leur implication réelle dans le développement des pathologies reste encore incertaine et très mal documentée. C'est dans ce contexte que se base mon projet de thèse. En effet, il est maintenant parfaitement établi que le cil primaire entretient un lien étroit avec le développement de l'athérosclérose. De plus, comme discuté précédemment, les VEs sont également fortement impliquées dans le développement de cette pathologie. Les récentes études de Mohieldin (2020) démontrent une forte implication des VEs ciliaires dans le système cardiovasculaire. Néanmoins, les connaissances sur ces VEs issues du cil primaire sont encore sommaires et leur réelle implication dans les ciliopathies et dans d'autres maladies reste inconnue.

Ainsi, nous nous sommes demandé si les VEs issues du cil primaire pouvaient avoir un rôle dans le développement de l'athérosclérose, une pathologie qui peut survenir de manière précoce à la suite d'une ciliopathie mais qui est également une pathologie en forte expansion dans notre société.

Pour cela nous avons fixé plusieurs objectifs à l'étude :

1. Dans un premier temps, nous souhaitons caractériser les VEs issues du cil primaire à partir de CE en culture.
2. Par la suite, nous souhaitons analyser les effets de ces VEs sur des CE et des CML vasculaires en culture. La partie sur les CE sera abordée dans l'article en revanche la partie sur les cellules musculaires lisses sera discutée dans la rubrique discussion et perspectives.
3. Afin de complexifier le modèle, nous avons, par la suite, analysé les effets des VEs sur un modèle de souris présentant une prédisposition au développement d'athérosclérose.
4. Finalement, nous avons caractérisé des VEs issues d'une cohorte de patients afin d'évaluer la pertinence physiopathologique chez l'Homme.

Partie II : Résultats expérimentaux

Article: Extracellular vesicles derived from primary cilia induce oxidative stress in human endothelial cells

Megan Piquet^{1,2}, Sylvain Recoquillon², Ramaroson Andriantsitohaina,¹ Frédéric Gagnadoux,^{2,3}

M. Carmen Martinez¹

¹PhyMedExp, University of Montpellier, INSERM, CNRS, CHU, Montpellier, France

²INSERM, CNRS, MITOVASC, Equipe CarME, SFR ICAT, University of Angers, Angers, France

³Department of Respiratory and Sleep Medicine, Angers University Hospital, Angers, France

Correspondence to: MC Martinez, PhyMedExp, University of Montpellier, INSERM, CNRS, CHU, Montpellier, France. Email: carmen.martinez@inserm.fr

ABSTRACT

Endothelial cell function depends on the number and length of primary cilia existing in these cells. Primary cilia loss can be pharmacologically induced, and decapitation of primary cilia can take place by extracellular vesicle (EV) release. Here, we have characterized large and small EV from ciliated and deciliated human umbilical vein endothelial cells, and then, analyzed their effects on endothelial cell function. Loss of primary cilia induced the generation of both types of EVs (large and small) enriched on primary cilia markers. In addition, large EVs from deciliated cells did not modify nitric oxide release but increased cytosolic reactive oxygen species (ROS) production in cell and mesenteric arteries. These effects were not prevented by inhibition of ROS sources by allopurinol and apocynin in cells, but interestingly were in mesenteric arteries. Mitochondrial ROS production was not affected by EV treatment. Moreover, EVs from ciliated cells had protective effects on HUVEC, favoring endothelial cell migration and preventing the increase of endothelial cell permeability induced by TNF- α . Finally, large EVs from obstructive sleep apnea syndrome patients displaying endothelial dysfunction overexpressed primary cilia markers. Altogether, these results highlight the role of EVs from primary cilia in the impairment of endothelial function associated with an increased oxidative stress and in their potential use as biomarkers of cardiovascular diseases.

INTRODUCTION

Primary cilia are signaling organelles that protrude from the surface of many types of cells playing crucial roles as mechanosensors (Luu et al., 2018). This is especially relevant in endothelial cells since, in these cells, primary cilia project into the vessel lumen and detect shear stress modulating the nitric oxide (NO) production through the regulation of calcium entry into the cells (Nauli et al., 2008). Also, the reduction in the number or in the length of primary cilia in blood vessels has been associated with an impairment of the NO signaling pathway leading to an increased pro-inflammatory environment and vasocontraction (Luu et al., 2018). Thus, it has been described that primary cilia are found at the atherosclerotic predilection sites, where flow is no-laminar, in wild type mice and they occur on and around atherosclerotic lesions in ApoE-deficient mice (Van der Heiden et al., 2007). Also, removal of endothelial cilia increased atherosclerosis in ApoE-deficient mice fed a high-fat diet, suggesting a protective role of primary cilia against atherosclerosis (Dinsmore & Reiter, 2016). In this context, the length and/or loss of the primary cilia can be regulated by their disassembly involving several molecular mechanisms. Among these, the production and release of extracellular vesicles (EVs) can explain, at least partially, the decrease of primary cilia length. Primary cilia EV release, also called decapitation, is a phenomenon described mainly in *Caenorhabditis elegans* and *Chlamydomonas* (Pan et al., 2004; Maguire et al. 2015). In mammalian cells, cargo of EVs from cilia has been analyzed (Mick et al., 2015), but their role in cardiovascular diseases is not completely understood. An increase of EV release has been described in pathologies associated with cardiovascular events, including impairment of endothelial function (Agouni et al., 2008; Mallocci et al., 2019; Ali et al., 2021), but the potential origin of EVs from primary cilia has not been yet studied. Here, we obtained and characterized EVs from endothelial ciliated and deciliated cells, and then, analyzed their effects on cultured endothelial cells and on *ex vivo* aorta from mice. We described that the loss of the primary cilia by pharmacological treatments

is accompanied by EV release from primary cilia. These EVs impair endothelial function by increasing cytosolic ROS production and affecting endothelial cell migration and permeability. Finally, expression of primary cilia markers is increased in large EVs from obstructive sleep apnea syndrome displaying endothelial dysfunction. Altogether, these data highlight the potential role of EVs from primary cilia in the impairment of endothelial function.

MATERIAL AND METHODS

Cell culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were obtained from Promocell (Heidelberg, Germany) and cultured in endothelial cell growth medium MV2 (Promocell) consisting of endothelial basal medium supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS) and vascular endothelial growth. When cells were confluent, they were starved (0.2% FBS) to favor the cobblestone phase.

Immunolabelling of primary cilia

Cultured cells in cobblestone phase were fixed in 4% paraformaldehyde for 20 minutes, and permeabilized with 0.5% Triton X-100 for 5 minutes. Cells were incubated for 30 minutes with the blocking buffer containing 5% bovine serum albumin (Euromedex, Souffelweyersheim, France). Primary antibodies recognizing acetylated α -tubulin (1/1000, (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) or ARL13b (1/1000, Proteintech, Rosemont, IL) were diluted in blocking buffer and incubated with the samples overnight at 4°C. Finally, Alexa Fluor (488, 647)-conjugated goat anti-rabbit or goat anti-mouse antibodies, 1/10000 (Abcam, Cambridge, UK) were used for signal detection. Nuclei was counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI). Images were obtained with a LSM700 confocal microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) and analyzed with the software (ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA,).

Intracellular calcium measurement

Cells were cultured on glass slide under cobblestone phase. For Ca^{2+} imaging, cells were incubated with Fluo-4-AM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) for 30 minutes at 37°C. The cells were perfused using Elveflow microfluidics OB1 system at 650 $\mu\text{l}/\text{min}$ with medium,

chloral hydrate (4mM) or MLN4924 (0.3 μ M). Acquisitions were obtained with an LSM800 confocal microscope (Carl Zeiss) and analyzed with ImageJ software.

In face labelling of primary cilia in blood vessels

Sixteen-week-old ApoE knock-out males were fed with a standard diet. After sacrifice, the aortas were dissected and the adherent fat was gently removed. Whole aortas were opened longitudinally from the aortic arch to the iliac bifurcation. Then, aortas were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 minutes, and permeabilized with 0.5% Triton X-100 for 10 minutes. Aortas were incubated with the blocking buffer for 1 hour containing 5% bovine serum albumin., and then with the rabbit anti-ARL13b antibody (1/1000, Proteintech) diluted in the blocking buffer overnight at 4°C. Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit antibody (1/10000, Abcam) was used for signal detection. Nuclei was counterstained with DAPI for 10 minutes. Finally, aortas were mounted *en face* with fluoromount-G (Thermo Fisher Scientific) on glass slide, stored at 4°C and analyzed by confocal microscopy (LSM700, Carl Zeiss).

EV production

HUVECs were used at the second to the fourth passage. When HUVEC were confluent, they were starved (0.2% FBS) to favor the cobblestone phase. After three days, medium was recovered to obtain EVs from ciliated cells. Then, cells were treated with either 4 mM chloral hydrate or 0.3 μ M MLN4924 to remove cilia for three days and medium was recovered to obtain EVs from non-ciliated cells. Recovered media were centrifuged at 750 g for 15 minutes to remove cells, and then at 1,500 g for 5 minutes to remove large debris. The remaining large EV-containing supernatant was subjected to 17,000 g for 45 minutes to pellet the large EVs. Then, the supernatant was centrifuged two times at 200,000 g for 70 minutes to pellet small EV. Finally, the large EV and small EV pellets were respectively resuspended in 150 μ l and 400 μ l of 0.9% saline solution and stored at 4°C until use.

Determination of EV size by Zetasizer analysis

Size distribution of large EVs and small EVs was quantified through dynamic light scattering on a Zetasizer Nanoseries (Malver Instruments, Worcestershire, UK). Samples were diluted in 0.9% NaCl. Results were analyzed as a number weighted distribution curve for the evaluation of the size of EVs.

Transmission electronic microscopy

EV preparations were first fixed overnight at 4°C with glutaraldehyde (LFG Distribution, Lyon, France) in 0.1M phosphate-buffered saline solution (PBS) (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, pH=7.4). The, EVs were washed two times in PBS and recentrifuged at 21,000 g for 45 minutes or 100,000 g for 70 minutes. EV pellets were resuspended in milliQ water and 20 µl were deposited on Formwar®-coated copper grids for 2 min. EV were negatively stained with 20 µl of uranyl acetate 5% (diluted in ethanol 50%) for 30 seconds. Grids were rinsed briefly with milliQ water and left to air dry. Grids were then observed with a Jeol JEM 1400 microscope (Jeol, Croissy sur Seine, France) operated at 120 keV.

Western blotting

Purified EVs (20µg) from ciliated and non-ciliated cells were separated on 4-12% polyacrylamide gels and transferred on nitrocellulose blotting membrane (Bio-Rad, Hercules, CA). To characterize EVs, blots were probed with anti-acetylated α -tubulin (Santa Cruz Biotechnology), TSG101 (Santa Cruz Biotechnology), β -actin (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO) and GADPH (Abcam). Each membrane was then incubated with the corresponding fluorescent secondary antibody. Blots were visualized with Sapphire biomolecular imager (Azure Biosystems, Dublin, CA).

Flow cytometer labelling

Primary cilia large EVs were discriminated according to the expression of acetylated α -tubulin antigen. Five μ l of samples were incubated with 2% paraformaldehyde for 15 minutes. Then, samples were centrifuged at 200,000 g for 15 minutes and supernatant was removed. large EV pellet was resuspended in 0.1% saponin for permeabilized. Irrelevant human immunoglobulin G (200 μ g/ml IgG, Santa Cruz Biotechnology Dallas, TX) was used as an isotype-matched negative control for each sample. Cell were incubated with acetylated α -tubulin specific antibody at the same concentration than the IgG (Santa Cruz Biotechnology). After 30 minutes at room temperature, 150 μ l of 0.2 μ m filtered 0.9% NaCl were added in the sample. Then, an equal volume of sample and Flow-count beads (Beckman Coulter, Villepinte, France) was added, and samples were analyzed in a flow cytometer 500 MPL system (Beckman Coulter).

EV treatment

At 80% of confluence, HUVEC were incubated for 4 or 24 hours with EVs (3 μ g/ml of large EVs and 0.5 μ g/ml of small EVs). In another set of experiments, 45 minutes before EV treatment, cells were pretreated with the NADPH oxidase inhibitor, apocynin (100 μ M, Sigma-Aldrich) or the inhibitor of xanthine oxidase, allopurinol (50 μ M, Sigma-Aldrich). All products were used at concentrations at which no cytotoxicity was observed as previously described (Mostefai et al., 2008; Safiedeen et al. 2017), as deduced from trypan blue exclusion assay.

NO measurement

After treatment as described above, cells were incubated with ATP (10 μ M) for 10 minutes to induce an increase of NO production. Then, cells were loaded with 4,5-diaminofluorescein diacetate (10 μ M, Santa Cruz Biotechnology) for 30 minutes at 37°C, and fluorescence was measured.

ROS measurement by DHE and MitoSOX staining

Endothelial cells were grown on μ -slide 8 well (IBIDI GmbH, Gräfelfing, Germany), and after different treatments, they were washed and then incubated with either the oxidative fluorescent dye DHE (3 μ M, Sigma-Aldrich) for 30 minutes at 37°C or MitoSOX red (5 μ M, ThermoFisher Scientific) for 10 minutes at 37°C. Then, cells were fixed by 4% paraformaldehyde for 20 minutes at room temperature. DAPI was added for 5 minutes. Finally, cells were visualized with confocal microscopy (LMS 700, Carl Zeiss, ZEN Software). All images were acquired using a 20x objective. In some experiments, fluorescence was quantified using a fluorescent microplate reader (Infinite M200 PRO, TECAN, Männedorf, Suisse).

Mesenteric arteries ROS measurement by DHE

The mesenteric arteries were dissected and the adherent fat was gently removed. Then, there were incubated for 4 hours with large EVs (3 μ g/ml) in DMEM supplement with 1% penicillin/streptomycin. In another set of experiments, 45 minutes before EV treatment, arteries were pretreated with the NADPH oxidase inhibitor, apocynin (100 μ M, Sigma-Aldrich) or the inhibitor of xanthine oxidase, allopurinol (50 μ M, Sigma-Aldrich). Then, arteries were included in OCT mounting medium and frozen in dry ice. Sections of 12 μ m arteries were cut using Cryostat NX50 (Eprexia, Kalamazoo, MI) and analyzed by fluorescence microscopy (LSM800,ZEISS,ZEN).

Proliferation assay

Cell numbers were evaluated with the Proliferation Assay kit CyQUANT (Invitrogen, Carlsbad, CA). Briefly, 5x10³ HUVECs were seeded in a 96-well plate and allowed to attach for 24 hours. Cells were treated with EVs as indicated above for 24 hours. Then, the medium was removed, and the dye-binding solution was added. Cells were incubated at 37°C for 30 minutes. The fluorescence levels were read using TECAN reader.

Migration assay

Cells were seeded at 15×10^3 cells in 12-well plates. When the cells reached 90% of confluence, they were scratched with a sterile pipette tip, and the floating cells and debris were removed by washing with medium. Cells were then treated as described above. Images of the cells were taken at T=0 immediately after healing, and at T=24 hours using a MICROSCOPE EVOS XL Core (Invitrogen, Waltham, Massachusetts). The area of the scratch was quantified using Image J software. The cells migration was quantified as percentage of the surface recovery.

Trans epithelial electrical resistance (TEER)

HUVEC were seeded in 8 μm pore size Transwells (Corning, Corning, NY) in the upper chamber until 100% confluence. TEER measurement was performed before incubation with EVs and after 24 hours of EV treatment, using a Millicell ERS-2 Volt ohmmeter (Merck, Darmstadt, Germany) to assess the integrity of the cell barrier.

Clinical characteristics of obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) patients and EV isolation

Sixteen obstructive sleep apnea syndrome patients were recruited. Inclusion criteria were age over 18, presence of moderate ($30 < \text{AHI}$) to severe ($\text{AHI} \geq 30$) OSAS determined by polysomnography with the apnea-hypopnea index (AHI) measure, BMI over 30 kg/m^2 (i.e. obese patient), and written consent from patients. Endothelial function was assessed by peripheral arterial tonometry (PAT; EndoPAT, Itamar Medical Ltd) (Bonetti et al, 2004). Participants, who were lying down in a quiet room, had probes applied to both index fingers and a blood pressure cuff placed around the right arm above the elbow to test the reactive hyperemia response. The left finger was used as the control. The finger arterial pulse wave amplitude was recorded throughout the protocol, which comprises 3 consecutive 5 minute stages: (i) baseline recording, (ii) brachial artery occlusion by inflating the BP cuff to 50 mm Hg above the baseline systolic pressure, and (iii) post-occlusion recording after deflation of the cuff to measure the reactive hyperemia response. The hyperemic reactivity index (RHI) was

calculated as the ratio of the average amplitude of the post- to pre-occlusion PAT signal in the tested arm, normalized to the concomitant signal from the contralateral finger. A value >0.51 indicates the presence of endothelial dysfunction.

Baseline characteristics and clinical data of patients are summarized in Supplemental Table 1. Briefly, blood samples were centrifuged at 260 g for 15 minutes. Platelet-rich plasma was then centrifuged at 1,500 g for 20 minutes. Platelet-poor plasma was centrifuged at 17,000 g for 45 minutes. The EV pellets were recovered in 0.9% NaCl and centrifuged at 17,000 g for 45 minutes. The pellets were recovered in 0.9% NaCl and stored at 4°C.

Statistical analysis

Data normality was assessed using the Kolmogorov-Smirnov test. Statistical analysis was performed either by using Student's *t*-tests for single comparisons or ANOVA followed by Tukey post-hoc test for multiple comparisons. In cases where normality was not confirmed, statistical analysis from two groups and more than two groups were analyzed by Mann-Whitney *U* test, and ANOVA followed by Kruskal-Wallis test for multiple comparisons, respectively. Data are represented as mean \pm SEM, n represents the number of experiments. $P < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism (San Diego, CA).

RESULTS

Characterization of primary cilium *in vitro* and *in vivo*

In order to favor the presence of primary cilia in *in vitro* HUVEC, cells were cultured as cobblestone stage for three days under serum starvation (0.2% FBS). Under this condition, >90% of HUVEC were double-positive to the primary cilium markers such as acetylated α -tubulin and ARL13b (Figure 1A-1B). Treatment of HUVEC with either CH or MLN4924 removed primary cilia. Indeed, after these treatments, the number of cells displaying primary cilium significantly decreased when compared with untreated cells (~90% of reduction) (Figure 1B, Supplemental Figure 1A). The effect of treatment on primary cilia incidence was associated with a transitory increase in the intracellular calcium concentration (Figure 1C, Supplemental Figure 1B). We also visualized ciliated cells in the endothelium of mouse aorta. As shown in Figure 1D, primary cilia markers were detected in *in face* labelling of the endothelium surface from mouse aorta.

Characterization of the EVs from cultured endothelial cells

To determine whether disruption of the primary cilia affects the release of EVs and their cargo, we obtained EVs from three culture conditions, that is, from HUVEC having primary cilia (EV_{0.2%}), from HUVEC after primary cilia disassembly after pharmacological CH treatment (EV_{CH}) and from HUVEC after MLN4924 incubation (EV_{MLN}). No changes in size nor morphology were observed between three types of EVs (Figure 2A-2C, Supplemental Figure 1C-1E). As expected, large EVs were larger in size than small EVs being the range of size between 200-1,000 nm for large EVs and lesser than 200 nm for small EVs (Figure 2A-2B, Supplemental Figure 1C-1D). In addition, two populations of large EVs were observed.

Large EVs, but not small EVs, expressed the cytoskeletal protein β -actin, whereas small EVs were enriched in TSG101, commonly used as marker proteins for small EVs, compared with

large EVs (Figure 2D, Supplemental Figure 1F). Whereas EVs from ciliated cells weakly expressed acetylated α -tubulin, EVs from deciliated cells highly expressed this primary cilia marker (Figure 2D, Supplemental Figure 1F) suggesting that cilia disassembly induces the release of EVs from the cilia. This was confirmed by flow cytometry analysis of expression of acetylated α -tubulin in large EVs (Figure 2E, Supplemental Figure 1G).

Effects of EVs on endothelial NO production

To determine whether the EVs from deciliated cells modify endothelial function, we specifically analyzed the effects of EVs on NO release. For this, HUVEC were treated with EVs from ciliated and deciliated cells and after 24 hours of incubation with EVs, NO production was determined by measurement of DAF fluorescence. As illustrated in Figure 3A, ATP induced an increase on DAF fluorescence that was not significantly modified by EV treatments (Figure 3A-3B, Supplemental Figure 2A-2B).

Effects of EVs on endothelial reactive oxygen species (ROS) production

To establish the effects of EVs from deciliated cells on ROS production, time course (i.e. 4 and 24 hours) changes of ROS levels were measured. Analysis of cytosolic ROS levels, using DHE labeling, showed that treatment of HUVEC with either large EVs from ciliated cells (EV_{0.2%}) did not modify cytosolic ROS production (Figure 4A-4C). However, large EVs from cells treated with CH increased ROS production at both 4 and 24 hours (Figure 4A-4C), whereas large EVs from cells treated with MLN4924 had no effect (Supplemental Figure 3A-3B). To assess the intracellular enzymatic system with the capacity to generate ROS involved in the effects of EVs, allopurinol and apocynin which are inhibitors of xanthine oxidase and NADPH oxidase, respectively, were used. None of the ROS inhibitors modified the ROS level production in the absence of EVs (not shown). Interestingly, both inhibitors do not appear to reduce IEVCH-induced cytosolic ROS production. (Figure 4D). It should be noted that small

EVs did not modify cytosolic ROS production (Figure 4E, Supplemental Figure 3C). In the same way, mitochondrial ROS production monitored with MitoSOX probe was not modified by any treatment (Figure 4G-I, Supplemental Figure 3D-3E).

Effects of EVs on mesenteric arteries ROS production

To establish the effects of EVs from deciliated cells on mesenteric arteries ROS production, changes of ROS levels were measured after 4 hours of EV treatment. Analysis of cytosolic ROS levels, using DHE labeling, showed that treatment of arteries with large EVs from ciliated cells (EV_{0.2%}) induced a trend to the decrease of cytosolic ROS production (Figure 5A-B). However, large EVs from cells treated with CH increased ROS production when compared to EVs from ciliated cells (Figure 5A-B). Interestingly, inhibition of xanthine oxidase with allopurinol reduced the large EV_{CH}-induced cytosolic ROS production (Figure 5B). In contrast, inhibition of NADPH oxidase with apocynin did not affect ROS production induced by large EV_{CH} (Figure 5B).

Effects of EVs on endothelial cell proliferation and migration

Neither large EVs or small EVs from ciliated or deciliated cells modify cell proliferation (Supplemental Figure Fig 4A-4B). However, after 24 hours of incubation, large EVs from ciliated cells (EV_{0.2%}) induced a significant increase in cell migration, compared to the untreated cells (Figure 6A-6B). Interestingly, this effect was not present when HUVEC were incubated with large EVs for deciliated cells (Figure 6A-6B, Supplemental Figure 4C). As observed for ROS production, small EVs did not modify cell migration (Figure 6C, Supplemental Figure 4D).

Effects of EVs on endothelial cell permeability

Alterations of endothelial cell permeability lead to the changes in cell barrier integrity. We have analyzed the transendothelial electrical resistance (TEER) that is inversely proportional to the

endothelial permeability. As observed in the Figure 7A and 7B, large or small EVs did not affect the endothelial permeability; however, EVs from ciliated cells (EV_{0.2%}) were able to prevent the increase of endothelial permeability induced by TNF- α (Figure 7C-7D, Supplemental Figure 5A-5B). By contrast, EVs from deciliated cells did not modify the effect evoked by TNF- α (Figure 7C-7D, Supplemental Figure 5A-5B).

Pathophysiological relevance of EVs from primary cilia

Analysis of large EVs from OSAS patients showed a two-fold increase of the expression of acetylated α -tubulin in EVs from patients with endothelial dysfunction (Figure 8A-8B) suggesting that EVs from primary cilia may be considered as potential biomarkers of the endothelial function in these patients.

DISCUSSION

Here, we have shown that, in endothelial cells, disassembly of primary cilia is associated with an increase of EV release. These EVs were enriched in cilia markers. Interestingly, under these conditions, released EVs increased cytosolic ROS production in recipient cells without modifying the NO bioavailability. Also, EVs affect endothelial cell migration and permeability. Finally, EVs from OSAS patients having an endothelial dysfunction overexpressed cilia markers. Altogether, these findings suggest that, on the one hand, EVs released during primary cilia disassembly can be responsible, at least in part, of oxidative stress leading to the impairment of the endothelial function, and on the other hand, EVs from primary cilia can be considered as biological markers of endothelial dysfunction.

The protocol used in the present study shows that pharmacological treatment with CH or MLN4924 induced disassembly of primary cilia that was concomitant to the increase of EVs enriched with primary cilia markers. This suggest that primary cilia loss in HUVEC was partly evoked by EV release from cilia. The intracellular mechanisms of both pharmacological agents used to induce primary cilia loss are different that could explain the differences observed in EVs obtained under their treatments. Thus, CH is described as destabilizing microtubule organization by an unknown mechanism (Chakrabarti et al., 1998) whereas MLN4924 suppressed neddylation via pAKT-Ser⁴⁷³ activation (Mao et al., 2019).

Several reports have shown that decapitation of primary cilia can take place through the EV release. Thus, Wang et al. (2019) have shown that serum induction triggered the excision of cilia tips leading to the cilia disassembly and small EV release. Also, cells expressing mutants of BBsome proteins which regulate trafficking and ciliary signalling cascades, displayed increased release of small EVs (Volz et al., 2021). Interestingly, we have analyzed the two main subtypes of EVs released by cells, large and small EVs, and we have observed that,

independently of the same presence of cilia markers, these EVs induced differential effects on recipient cells depending on their size.

We and others have shown that EVs can be internalized by endothelial cells (Soleti et al., 2012; Durak-Kozica et al., 2018; Ali et al., 2021), and once internalized, EVs can affect endothelial function including both ROS and NO production (Ali et al., 2021). In the present study, we have described that large EVs from deciliated cells increased cytosolic, but not mitochondrial, oxidative stress. Indeed, large EV_{CH} induced an early increase of DHE fluorescence 4 hours after cell treatment that remained still increased after 24 hours of incubation with EV_{CH}. Although the bioavailability of NO depends, not only on its generation, but also on ROS production, EVs did not modify ATP-induced NO release. Among the main sources of ROS, xanthine oxidase and NADPH oxidase play a major role in endothelial cells (Konior et al., 2014). We have shown here that inhibition of these two ROS sources does not appear to alter the ability of large EV_{CH} to produce ROS. These results suggest that large EV_{CH} exert their effects on ROS production by a mechanism other than these cell enzymatic systems. Several studies show the presence of NADPH oxidase in EVs. In accordance with these data, we can suggest that EV_{CH} and EV_{MLN4924} contain pro-oxidant molecules. Taking this into account, we can assume that ROS are induced by the fusion of pro-oxidant EVs with endothelial cells. Thus, inhibition of NADPH oxidase and Xanthine oxidase at cellular level upstream of EV treatment would have no effect on EV-induced ROS production.

Remarkably, treatment of the mesenteric arteries shows that inhibition of xanthine oxidase significantly reduces the ROS induced by lEVs_{CH} treatment. These results suggest that the mechanisms initiated in isolated cells are not the same as those in whole tissue.

Although large EVs from deciliated cells (EV_{CH} and EV_{MLN}) had no effect on cell proliferation, those from cells displaying cilia induced cell migration. An increase on endothelial cell

migration might have beneficial effects in a damaged vessel to restore integrity of injured endothelium (Michaelis, 2014). Thus, changes on EV composition depending on their origin (ciliated or deciliated cells) suggest that primary cilia loss leads to a decrease of EV effectiveness in improving vessel integrity.

Proatherogenic stimuli such as diabetes, dyslipidemia, and oxidative stress destabilize the junctions causing the disruption of the endothelial barrier and increased endothelial permeability that could initiate endothelial dysfunction and lead to the development of atherosclerosis (Chistiakov et al., 2015). Diagbouga et al (2022) have shown that in absence of primary cilia, expression of proteins regulating endothelial junctions were reduced leading to a disorganization of the endothelial barrier associated with an increased endothelial permeability. Here, we showed that, although EV did not directly affect endothelial permeability, when they originated from ciliated cells (EV_{0.2%}) the increased permeability induced by the pro-inflammatory stimulation with TNF- α was prevented. This reinforces the notion that when produced by ciliated cells, EV displayed a protective effect under proinflammatory conditions.

Finally, the pathophysiological relevance of EV carrying primary cilia markers on endothelial function was demonstrated using large EV from OSAS patients having an endothelial dysfunction. A meta-analysis showed that among adults without overt cardiovascular diseases, severe obstructive sleep apnea is independently associated with an increased risk of endothelial dysfunction that may predispose to late cardiovascular events (Bironneau et al., 2020). We have observed a tendency towards an increase of markers of primary cilia in large EV from OSAS patients displaying endothelial dysfunction. Gupta et al (2022) have shown that plasma levels of cilia proteins were increased in patients with sickle cell disease when compared to healthy controls suggesting that cilia proteins can be biomarkers of altered blood flow. This agrees with the present study highlighting the potential role of EV overexpressing primary cilia proteins as biomarkers of cardiovascular diseases.

Taking together, these results reinforce that the primary cilia loss via the EV release can be associated with an increase in oxidative stress leading to endothelial dysfunction and, potentially, an increase in the cardiovascular risks.

Limitations

It should be noted that this study was performed under static conditions of cell culture. Since, in endothelial cells, primary cilia length has been described to depend on the shear stress (Goetz, et al. 2014), it is possible that the EV released by pharmacological treatments are of different composition if shear stress is applied to the cells.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the SCIAM platform, especially Florence Manero, for technical assistance for electron microscopy imaging. Also, we thank A. Charrabi for help on EV isolation, L. Albuquerque for taking care of animals and K Konate for Zetasizer measurements.

DATA AVAILABILITY

All data generated or analysed during this study are available on request from the authors.

FUNDING

This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université de Montpellier and Centre Hospitalo-Universitaire d'Angers. M Piquet was recipient of a doctoral fellowship from the French Ministry of Research.

COMPETING INTERESTS

The authors have declared that no competing interest exists.

CONTRIBUTION STATEMENT

MP and SR conducted experiments, acquired data and analysed data; FG provided human samples and clinical data; RA, critically contributed to discussion; RA and MCM conceived the study; MCM, supervised the study, designed the experiments and wrote the manuscript; all authors edited and approved the final version of the manuscript. MCM is responsible for the integrity of this work as a whole.

REFERENCES

- Agouni A, Lagrue-Lak-Hal AH, Ducluzeau PH, Mostefai HA, Draunet-Busson C, Leftheriotis G, Heymes C, Martinez MC, Andriantsitohaina R. Endothelial dysfunction caused by circulating microparticles from patients with metabolic syndrome. *Am J Pathol.* 2008;173:1210-9. doi: 10.2353/ajpath.2008.080228.
- Ali S, Mallocci M, Safiedeen Z, Soleti R, Vergori L, Vidal-Gómez X, Besnard C, Dubois S, Le Lay S, Boursier J, Chevrollier A, Gagnadoux F, Simard G, Andriantsitohaina R, Martinez MC; Metabol study Group. LPS-enriched small extracellular vesicles from metabolic syndrome patients trigger endothelial dysfunction by activation of TLR4. *Metabolism.* 2021;118:154727. doi: 10.1016/j.metabol.2021.154727.
- Bironneau V, Tamisier R, Trzepizur W, Andriantsitohaina R, Berger M, Goupil F, Joyeux-Faure M, Jullian-Desayes I, Launois S, Le Vaillant M, Martinez MC, Roche F, Pépin JL, Gagnadoux F. Sleep apnoea and endothelial dysfunction: An individual patient data meta-analysis. *Sleep Med Rev.* 2020;52:101309. doi: 10.1016/j.smr.2020.101309.
- Bonetti, Piero O., GERALYN M. PUMPER, STUART T. HIGANO, DAVID R. HOLMES, JEFFREY T. KUVIN, et AMIR LERMAN. Noninvasive identification of patients with early coronary atherosclerosis by assessment of digital reactive hyperemia. *Journal of the American College of Cardiology* 44, n° 11. 2137-41. doi : 10.1016/j.jacc.2004.08.062.
- Chakrabarti, A., H. Schatten, K. D. Mitchell, M. Crosser, et M. Taylor. 1998. Chloral Hydrate Alters the Organization of the Ciliary Basal Apparatus and Cell Organelles in Sea Urchin Embryos. *Cell and Tissue Research* 293 (3): 453-62. Doi:10.1007/s004410051137.
- Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Endothelial barrier and its abnormalities in cardiovascular disease. *Front Physiol* 2015;6:365. doi: 10.3389/fphys.2015.00365.
- Diagbouga MR, Morel S, Cayron AF, Haemmerli J, Georges M, Hierck BP, Allémann E, Lemeille S, Bijlenga P, Kwak BR. Primary cilia control endothelial permeability by regulating expression and location of junction proteins. *Cardiovasc Res* 2022;118:1583-1596. doi: 10.1093/cvr/cvab165.
- Dinsmore C, Reiter JF. Endothelial primary cilia inhibit atherosclerosis. *EMBO Rep* 2016;17:156-66. doi: 10.15252/embr.201541019.
- Durak-Kozica M, Baster Z, Kubat K, Stępień E. 3D visualization of extracellular vesicle uptake by endothelial cells. *Cell Mol Biol Lett.* 2018;23:57. doi: 10.1186/s11658-018-0123-z.
- Gupta A, Thirugnanam K, Thamilarasan M, Mohieldin AM, Zedan HT, Prabhudesai S, Griffin MR, Spearman AD, Pan A, Palecek SP, Yalcin HC, Nauli SM, Rarick KR, Zennadi R, Ramchandran R. Cilia proteins are biomarkers of altered flow in the vasculature. *JCI Insight* 2022;7:e151813. doi: 10.1172/jci.insight.151813.
- Kim CH, Jeung EB, Yoo YM. Combined fluid shear stress and melatonin enhances the ERK/Akt/mTOR signal in cilia-less MC3T3-E1 preosteoblast cells. *Int J Mol Sci* 2018;19:2929. doi: 10.3390/ijms19102929.

- Konior A, Schramm A, Czesnikiewicz-Guzik M, Guzik TJ. NADPH oxidases in vascular pathology. *Antioxid Redox Signal* 2014;20:2794-814. doi: 10.1089/ars.2013.5607.
- Goetz JG, Steed E, Ferreira RR, Roth S, Ramspacher C, Boselli F, Charvin G, Liebling M, Wyart C, Schwab Y, Vermot J. Endothelial cilia mediate low flow sensing during zebrafish vascular development. *Cell Rep* 2014;6:799-808. doi: 10.1016/j.celrep.2014.01.032.
- Luu VZ, Chowdhury B, Al-Omran M, Hess DA, Verma S. Role of endothelial primary cilia as fluid mechanosensors on vascular health. *Atherosclerosis* 2018;275:196-204. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.06.818.
- Maguire JE, Silva M, Nguyen KCQ, Hellen E, Kern AD, Hall DH, Barr MM. Myristoylated CIL-7 regulates ciliary extracellular vesicle biogenesis. *Mol Biol Cell* 2015;26:2823-32. doi: 10.1091/mbc.E15-01-0009.
- Mallici M, Perdomo L, Veerasamy M, Andriantsitohaina R, Simard G, Martínez MC. Extracellular vesicles: mechanisms in human health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 2019;30:813-856. doi: 10.1089/ars.2017.7265.
- Mao H, Tang Z, Li H, Sun B, Tan M, Fan S, Zhu Y, Sun Y. Neddylation inhibitor MLN4924 suppresses cilia formation by modulating AKT1. *Protein Cell* 2019;10:726-744. doi: 10.1007/s13238-019-0614-3.
- Michaelis UR. Mechanisms of endothelial cell migration. *Cell Mol Life Sci* 2014;71:4131-48. doi: 10.1007/s00018-014-1678-0.
- Mick DU, Rodrigues RB, Leib RD, Adams CM, Chien AS, Gygi SP, Nachury MV. Proteomics of primary cilia by proximity labeling. *Dev Cell* 2015;35:497-512. doi: 10.1016/j.devcel.2015.10.015.
- Nauli SM, Kawanabe Y, Kaminski JJ, Pearce WJ, Ingber DE, Zhou J. Endothelial cilia are fluid shear sensors that regulate calcium signaling and nitric oxide production through polycystin-1. *Circulation* 2008;117:1161-71. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.710111.
- Pan J, Wang Q, Snell WJ. An aurora kinase is essential for flagellar disassembly in *Chlamydomonas*. *Dev Cell* 2004;6:445-51. doi: 10.1016/s1534-5807(04)00064-4.
- Safiedeen Z, Rodríguez-Gómez I, Vergori L, Soleti R, Vaithilingam D, Douma I, Agouni A, Leiber D, Dubois S, Simard G, Zibara K, Andriantsitohaina R, Martínez MC. Temporal cross talk between endoplasmic reticulum and mitochondria regulates oxidative stress and mediates microparticle-induced endothelial dysfunction. *Antioxid Redox Signal* 2017;26:15-27. doi: 10.1089/ars.2016.6771.
- Soleti R, Lauret E, Andriantsitohaina R, Martínez MC. Internalization and induction of antioxidant messages by microvesicles contribute to the antiapoptotic effects on human endothelial cells. *Free Radic Biol Med*. 2012;53:2159-70. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.021.
- Van der Heiden K, Hierck BP, Krams R, de Crom R, Cheng C, Baiker M, Pourquie MJB, Alkemade FE, DeRuiter MC, Gittenberger-de Groot AC, Poelmann RE. Endothelial primary cilia in areas of disturbed flow are at the base of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2008;196:542-50. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2007.05.030.

Volz AK, Frei A, Kretschmer V, Domingues AMJ, Ketting RF, Ueffing M, Boldt K, Krämer-Albers EM, May-Simera HL Bardet-Biedl syndrome proteins modulate the release of bioactive extracellular vesicles. *Nat Commun* 2021;12:5671. doi: 10.1038/s41467-021-25929-1.

Wang G, Hu HB, Chang Y, Huang Y, Song ZQ, Zhou SB, Chen L, Zhang YC, Wu M, Tu HQ, Yuan JF, Wang N, Pan X, Li AL, Zhou T, Zhang XM, He K, Hui-Yan Li HY. Rab7 regulates primary cilia disassembly through cilia excision. *J Cell Biol* 2019;218:4030-4041. doi: 10.1083/jcb.201811136.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Primary cilia loss after pharmacological treatment with choral hydrate (CH).

(A) Primary cilia were identified by immunostaining for acetylated α -tubulin (red) and ARL13B (green) in HUVECs. Nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bars represent 5 μ m. (B) Quantification of primary cilia stained for ARL13B (green) in HUVECs in the absence or in the presence of 4mM CH. Red arrows indicate primary cilia. (C) Intracellular calcium measurement after CH exposure of HUVEC using Fluo-4 AM. (D) Primary cilia were identified by immunostaining for ARL13B (green) in mouse aorta. Scale bars represent 10 μ m. Data shown as mean \pm SEM. ***P<0.001.

Figure 2: Extracellular vesicle (EV) characterization.

(A, B) Particle size distribution of large EV (A) or small EV (B) assessed by Zetasizer analysis. (C) Transmission electron microscopy images of EV from ciliated cells (EV_{0.2%}) or cells treated with chloral hydrate (EV_{CH}). Horizontal bar = 50 nm. (D) Immunoblots using antibodies against β -actin, TSG101, acetylated α -tubulin and GADPH in large and small EV_{0.2%} or EV_{CH}. (E) Flow cytometer analysis of large EV_{0.2%} or EV_{CH} expressing acetylated α -tubulin.

Figure 3: Effects of large EV on nitric oxide production.

(A) Representative images illustrating the DAF-associated fluorescence corresponding to the nitric oxide production after incubation with large EV_{0.2%} or EV_{CH}. Scale bars represent 40 μ m. (B) Quantification of DAF fluorescence levels in HUVEC treated with large EV_{0.2%} or EV_{CH}, and then ATP stimulation.

Figure 4: Effects of EV from deciliated cells on ROS production in HUVEC.

(A) Cytosolic ROS production measured by DHE staining after large EV treatment. Scale bars represent 40 μ m. (B, C) Quantification of DHE fluorescence after 4 hours (B) and 24 hours (C) of large EV treatment. (D) Effects of treatment with inhibitors of ROS sources on DHE fluorescence in the absence or in the presence of large EV_{CH}. (E) Quantification of DHE fluorescence after small

EV treatment. (F) Mitochondrial ROS production measured by MitoSox staining after large EV treatment. Scale bars represent 10 μm . (G, H) Quantification of MitoSox fluorescence after 4 hours (G) and 24 hours (H) of large EV treatment. (I) Quantification of MitoSox fluorescence after small EV treatment.

Figure 5: Effects of EV from deciliated cells on ROS production in mouse arteries. (A) Confocal microscopy showing cytosolic ROS production measured by DHE staining after large EV treatment and inhibitors of ROS sources. Scale bars represent 40 μm . (B) Quantification of DHE fluorescence after 24 hours of large EV treatment and inhibitors of ROS sources.

Figure 6: Endothelial cell migration after EV treatment. (A) Phase contrast micrographs showing the effects of EV treatment on cell migration. (B, C) Cell migration was measured at T=0 and T=24 hours after large EV (B) or small EV (C) treatment and analyzed as described in Methods. Horizontal bar = 200 μm . Data are expressed as mean \pm SEM. *P<0.05.

Figure 7: Effects of EV treatment in endothelial cell permeability. (A, B) Changes on endothelial cell permeability measured by trans-endothelial electric resistance (TEER) induced by large EV (A) or small EV (B) treatment. (C, D) Changes on endothelial cell permeability measured by TEER induced by TNF- α , and then, treated with large EV (C) or small EV (D).

Figure 8: Expression of acetylated α -tubulin in large EV from obstructive sleep apnea syndrome patients. (A) Immunoblots using antibodies against acetylated α -tubulin in large EV. (B) Quantification of acetylated α -tubulin expression in large EV from obstructive sleep apnea syndrome patients displaying or not an endothelial dysfunction.

SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

Supplemental Figure 1: Primary cilia loss after pharmacological treatment with MLN4924. (A) Primary cilia were identified by immunostaining for acetylated α -tubulin (red) and ARL13B (green) in HUVECs. Nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bars represent 50 μ m. Quantification of primary cilia in HUVECs in the absence or in the presence of 0.3 μ M MLN4924. (B) Intracellular calcium measurement after MLN4924 exposure of HUVEC using Fluo-4 AM. (C, D) Particle size distribution of large EV (C) or small EV (D) assessed by Zetasizer analysis generated by MLN4924 treatment of HUVEC. (E) Transmission electron microscopy images of large EV from ciliated cells (EV_{0.2%}) or cells treated with MLN4924 (EV_{MLN4924}). (F) Immunoblots using antibodies against β -actin, TSG101, acetylated α -tubulin and GADPH in large and small EV_{0.2%} or EV_{MLN4924}. (G) Flow cytometer analysis of large EV_{0.2%} or EV_{MLN4924} expressing acetylated α -tubulin. ***P<0.001.

Supplemental Figure 2: Effects of large EV on nitric oxide production. (A) Representative images illustrating the DAF-associated fluorescence corresponding to the nitric oxide production after incubation with large EV_{0.2%} or EV_{MLN4924}. (B) Quantification of DAF fluorescence levels in HUVEC treated with large EV_{0.2%} or EV_{MLN4924}, and then ATP stimulation. Data are expressed as mean \pm SEM.

Supplemental Figure 3: Effects of EV from deciliated cells on ROS production in HUVEC. (A) Cytosolic ROS production measured by DHE staining after large EV treatment. (B, C) Quantification of DHE fluorescence after 4 hours (B) of large EV treatment. (C) Quantification of DHE fluorescence after small EV treatment. (D, E) Quantification of MitoSox fluorescence after 4 hours of large EV (D) or small EV (E) treatment. Data are expressed as mean \pm SEM.

Supplemental Figure 4: Endothelial cell proliferation and migration after EV treatment. (A, B) HUVEC proliferation assay after treatment with large EV (A) or small EV (B) from

ciliated (EV_{0.2%}) or deciliated (EV_{CH} or EV_{MLN4924}) cells. (C, D) Cell migration was measured at T=0 and T=24 hours after large EV (C) or small EV (D) treatment and analyzed as described in Methods. Data are expressed as mean ± SEM.

Supplemental Figure 5: Effects of EV treatment in endothelial cell permeability. (A, B) Changes on endothelial cell permeability measured by TEER induced by TNF- α , and then, treated with large EV (A) or small EV (B). Data are expressed as mean ± SEM. *P<0.05.

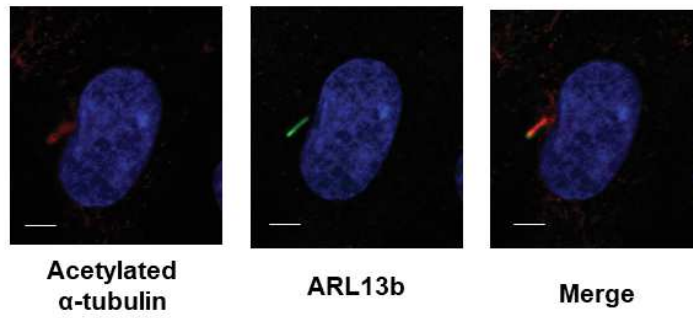
Supplemental Table 1

| | Without endothelial dysfunction | With endothelial dysfunction |
|--------------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| Number | 8 | 8 |
| Mean age (years) | 53 ± 4 | 47 ± 6 |
| Sex ratio (male/female) | 6/2 | 3/5 |
| Body mass index (kg/m ²) | 36 ± 1.4 | 39 ± 1.4 |
| Apnea–hypopnea index | 24.6 ± 2.8 | 39 ± 7.8 |
| Correct Reactive hyperemia index | 2.2 ± 0.09 | 1.5 ± 0.05 |
| Reactive hyperemia index | 0.80 ± 0.04 | 0.39 ± 0.03 |
| Hypertension (%) | 0 | 62.5 |
| Diabetes (%) | 0 | 25 |

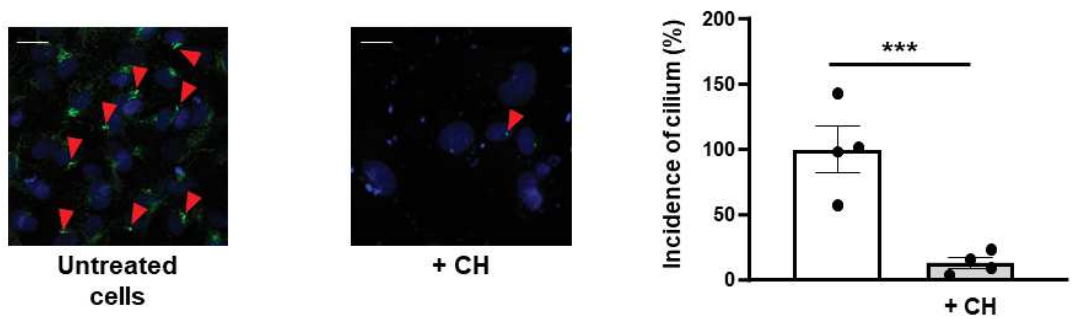
Data are expressed as median with SEM or %.

Figure 1

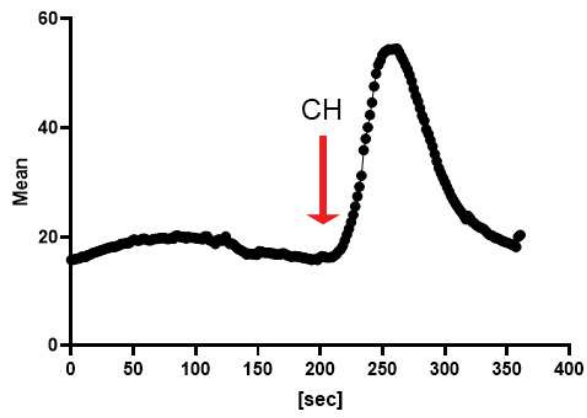
A



B



C



D

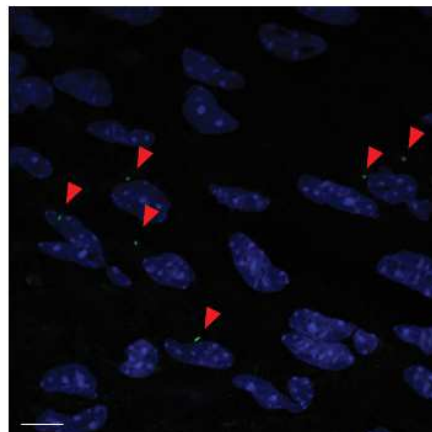


Figure 2

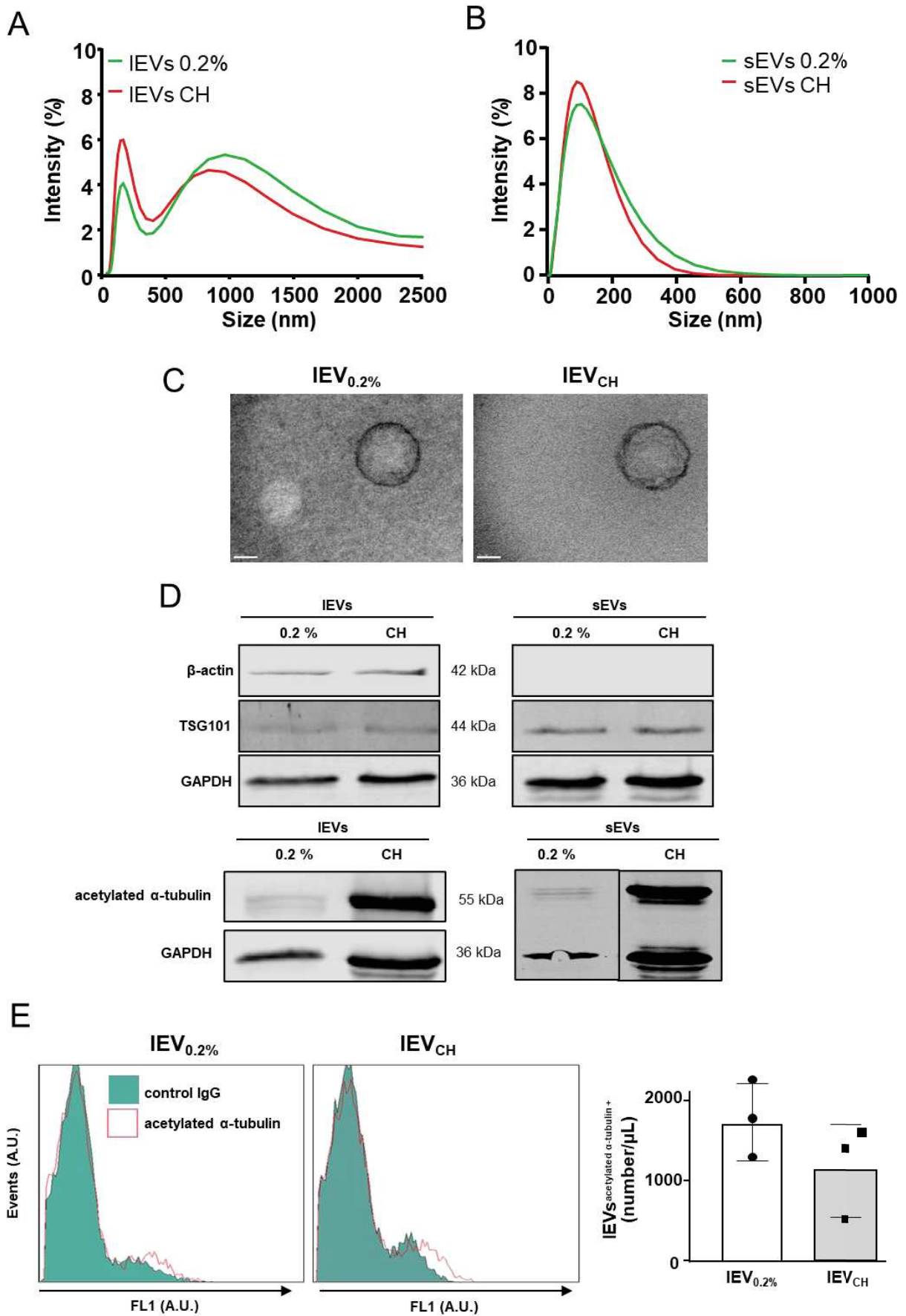


Figure 3

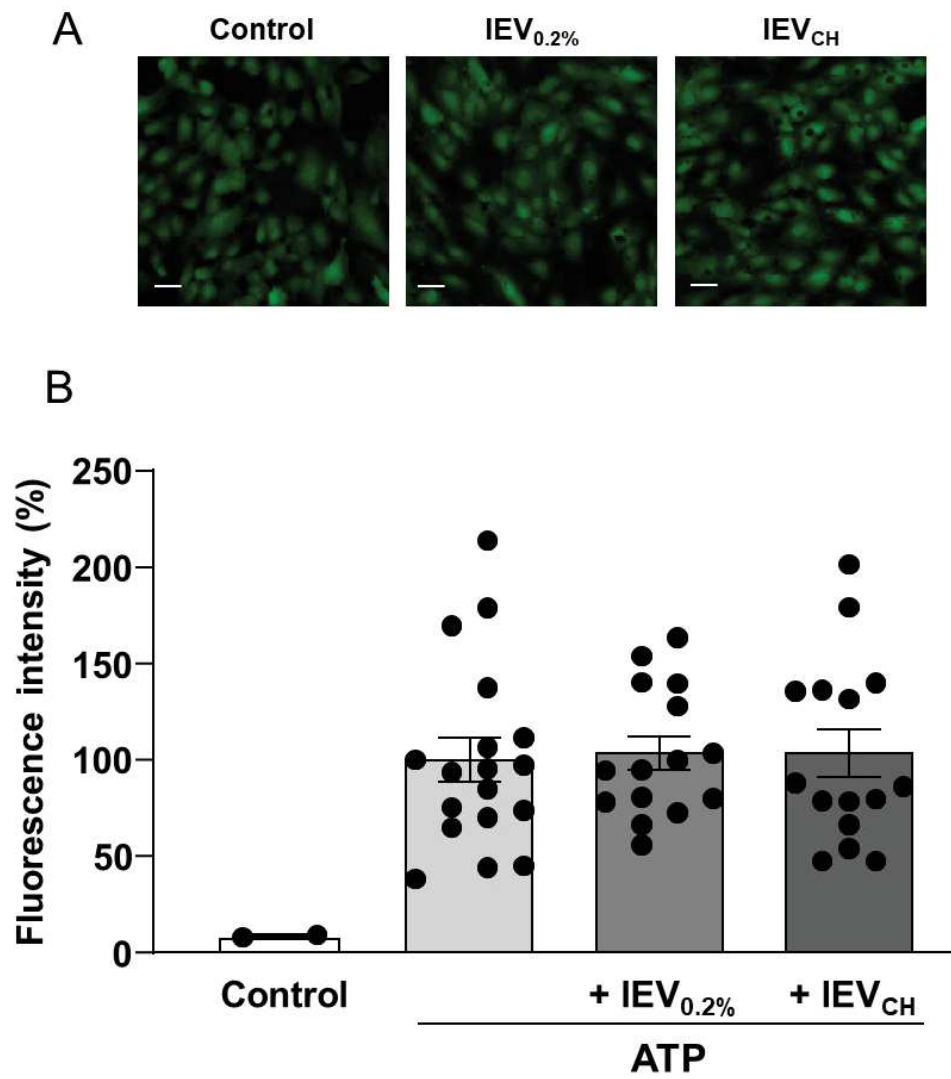


Figure 4

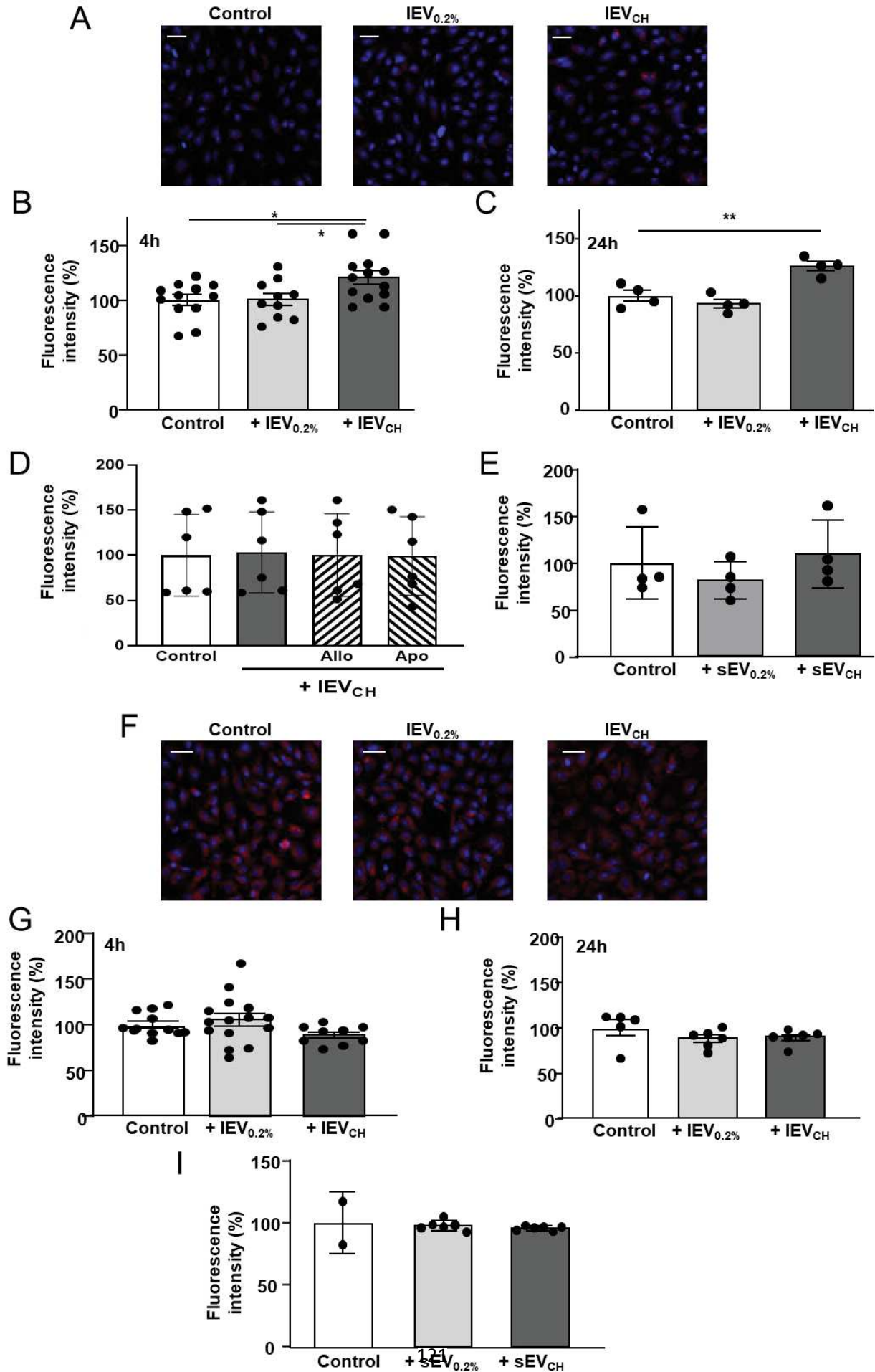
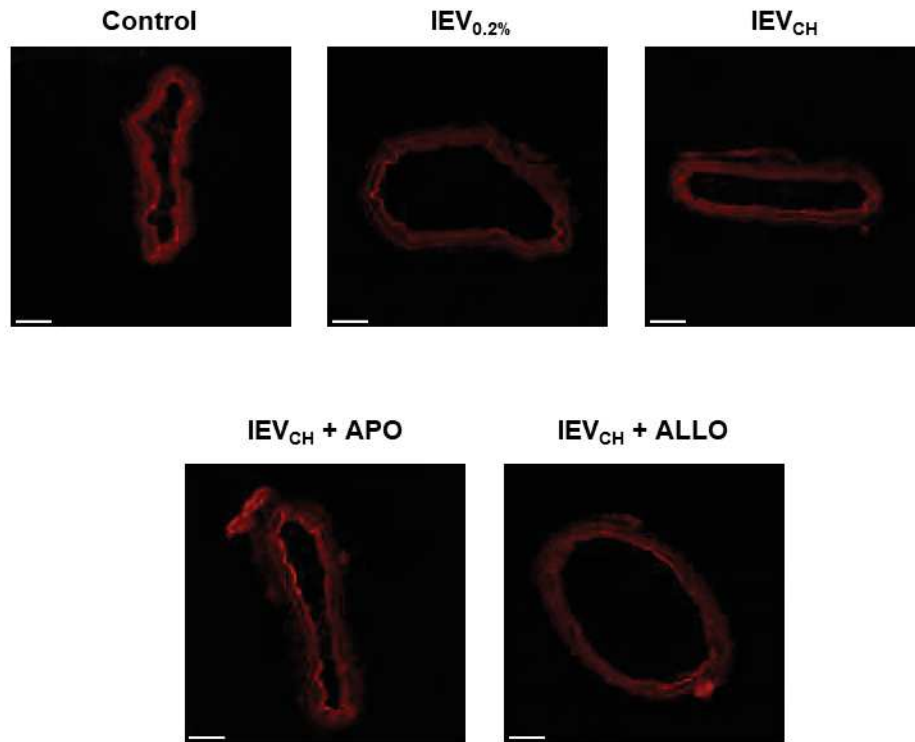


Figure 5

A



B

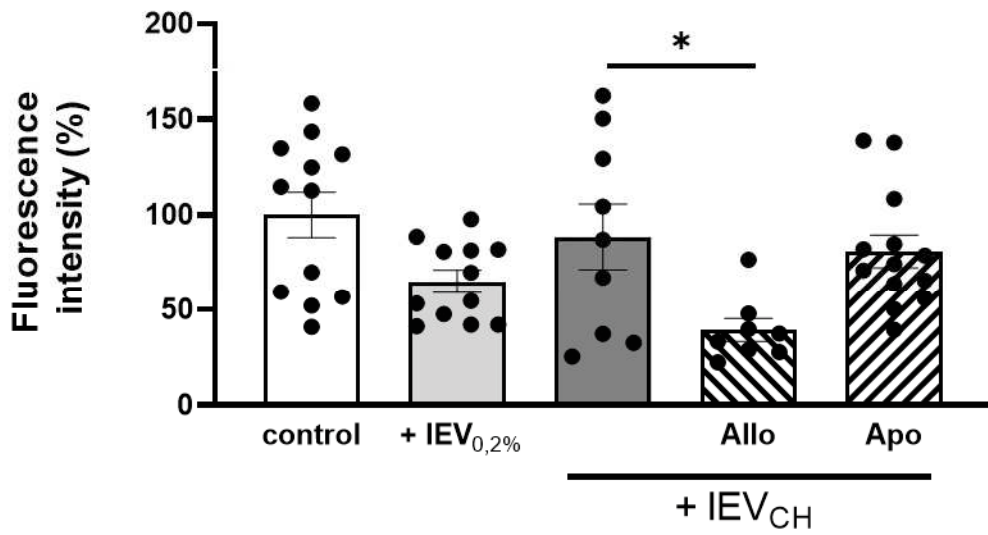
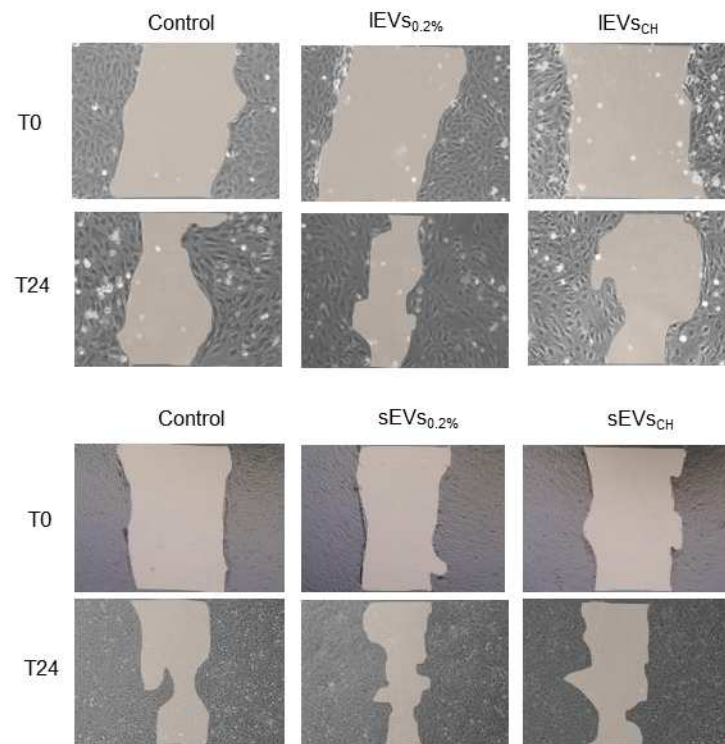
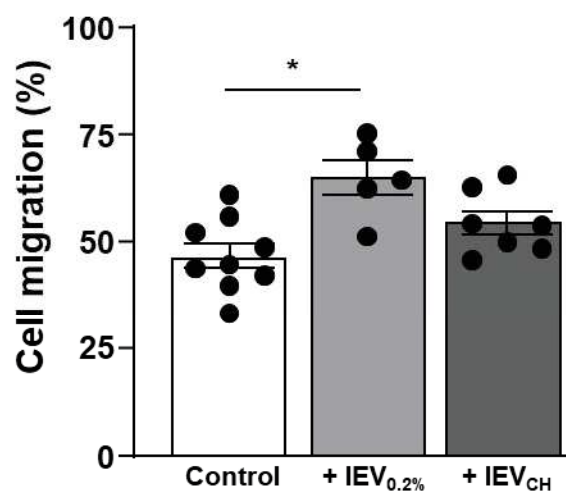


Figure 6

A



B



C

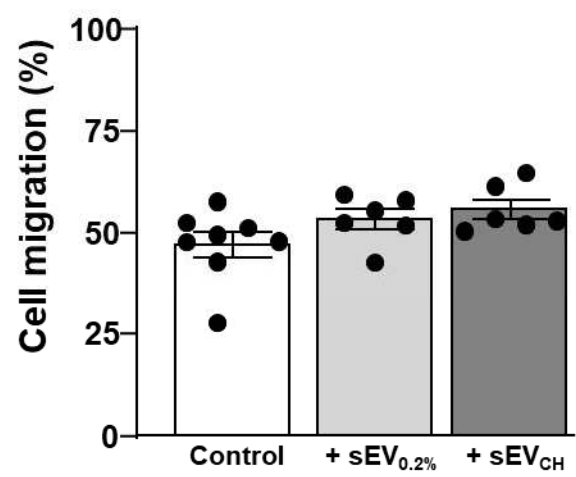


Figure 7

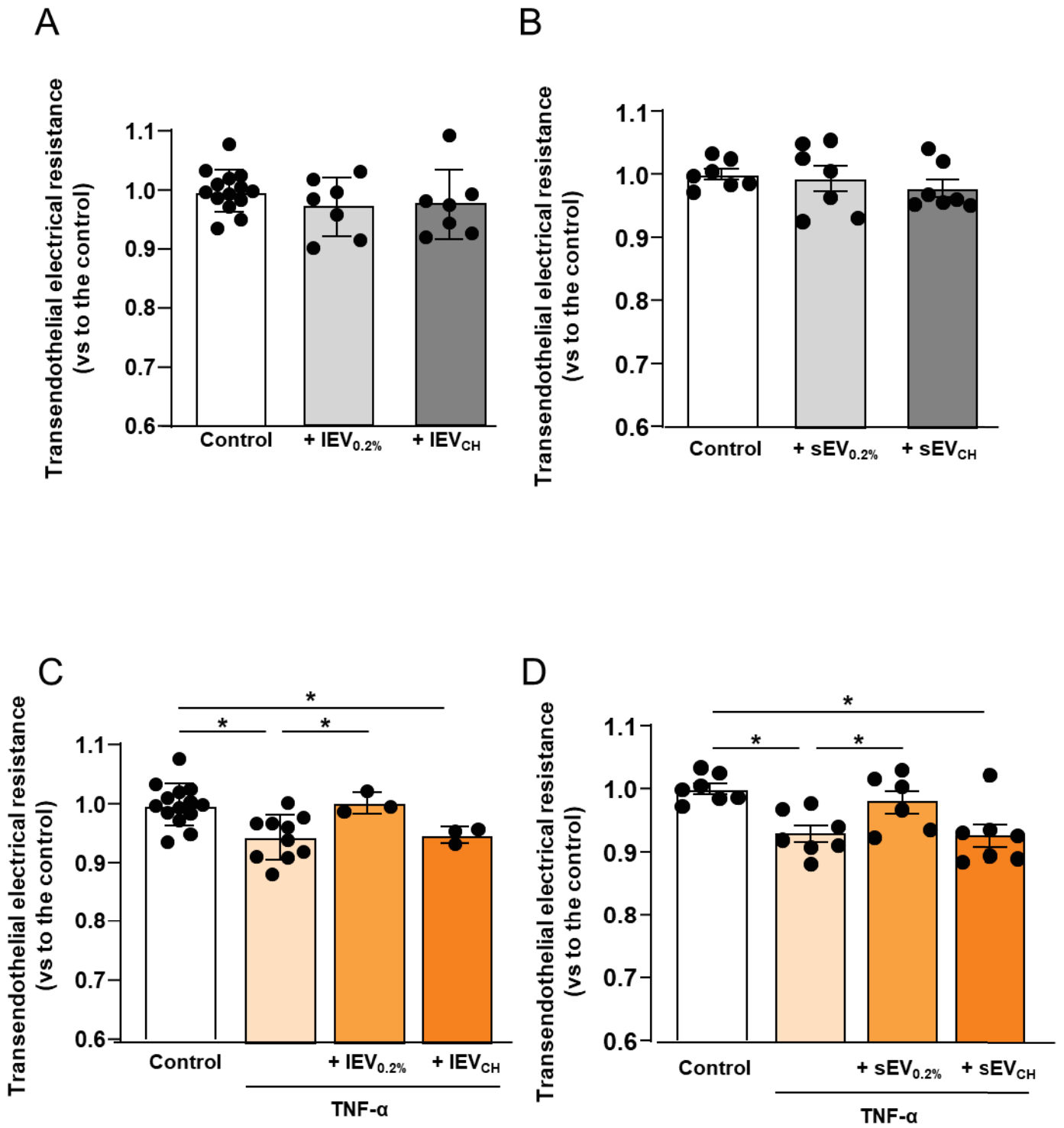
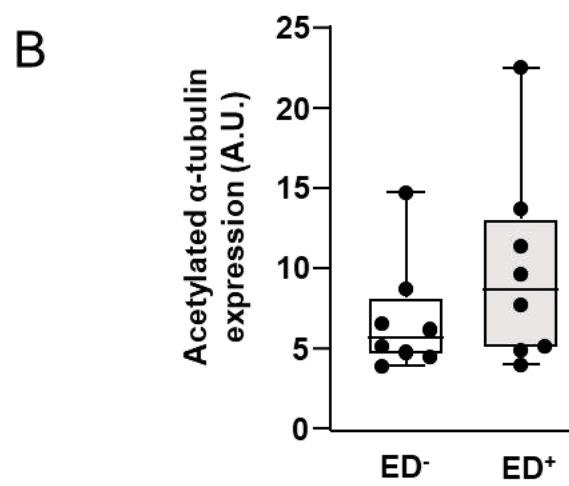
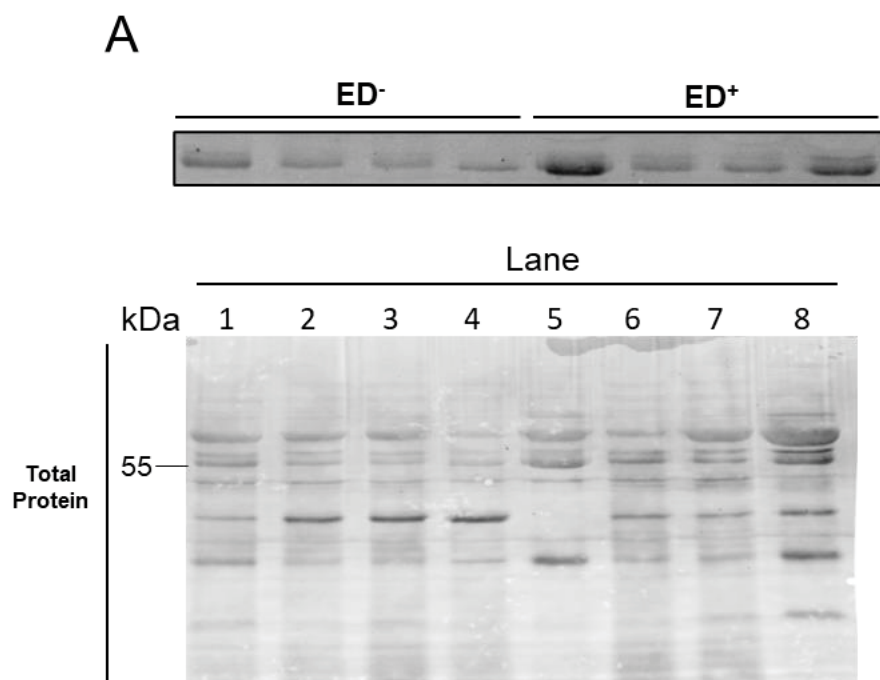
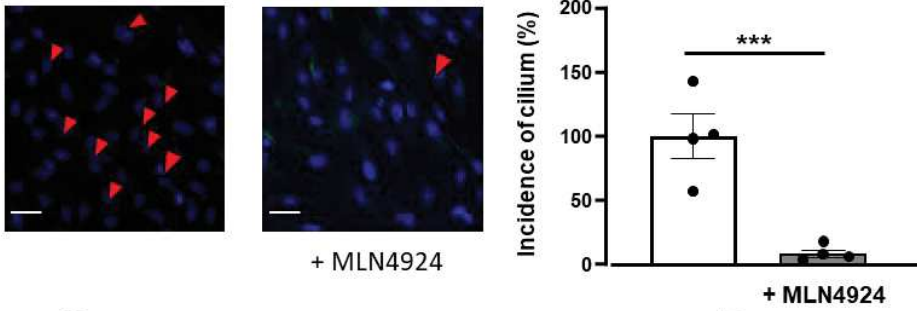


Figure 8

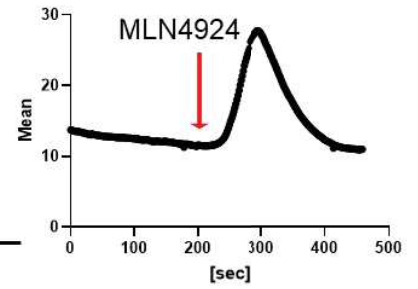


Supplemental Figure 1

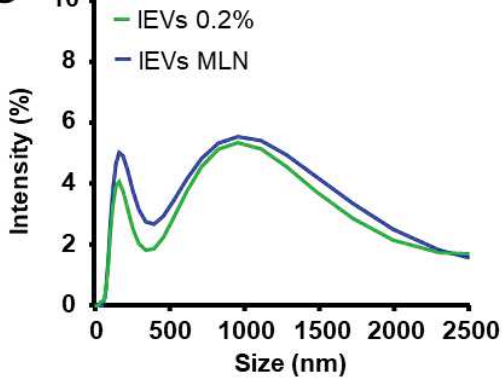
A



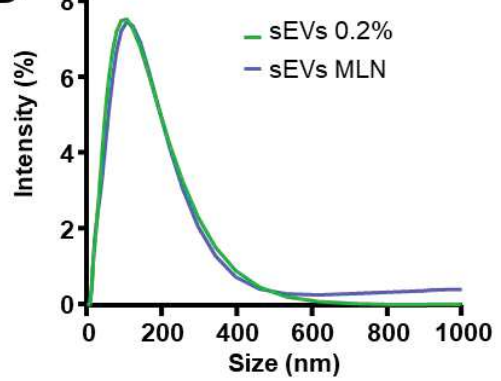
B



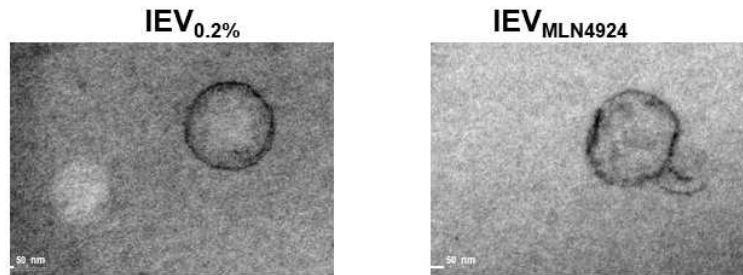
C



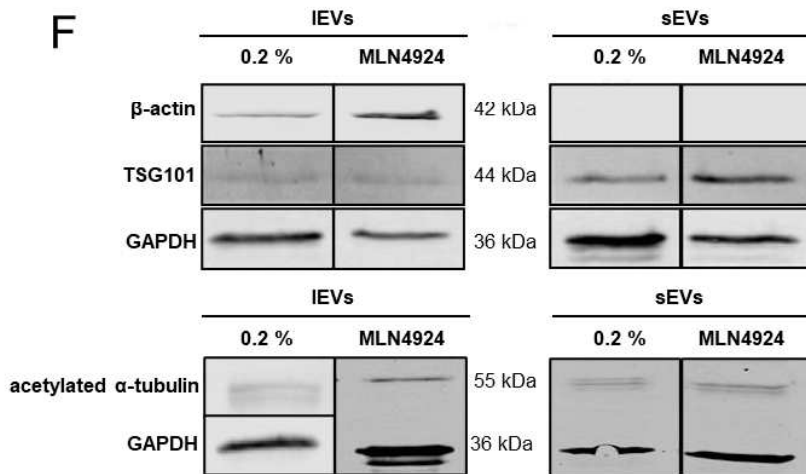
D



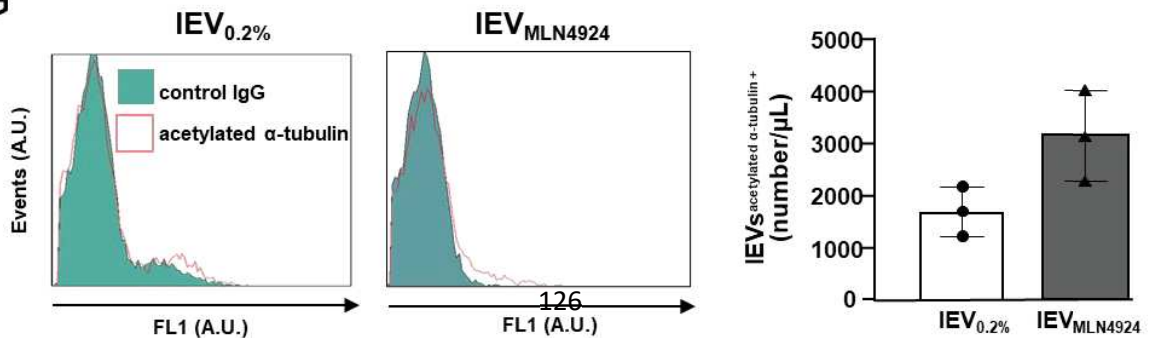
E



F

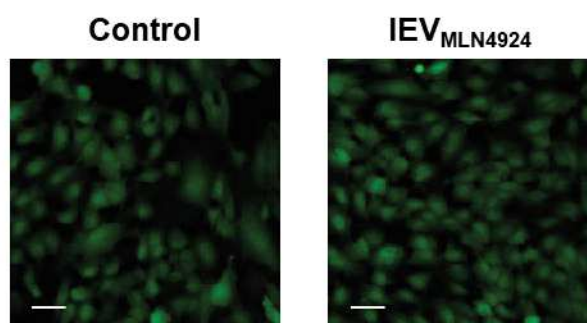


G

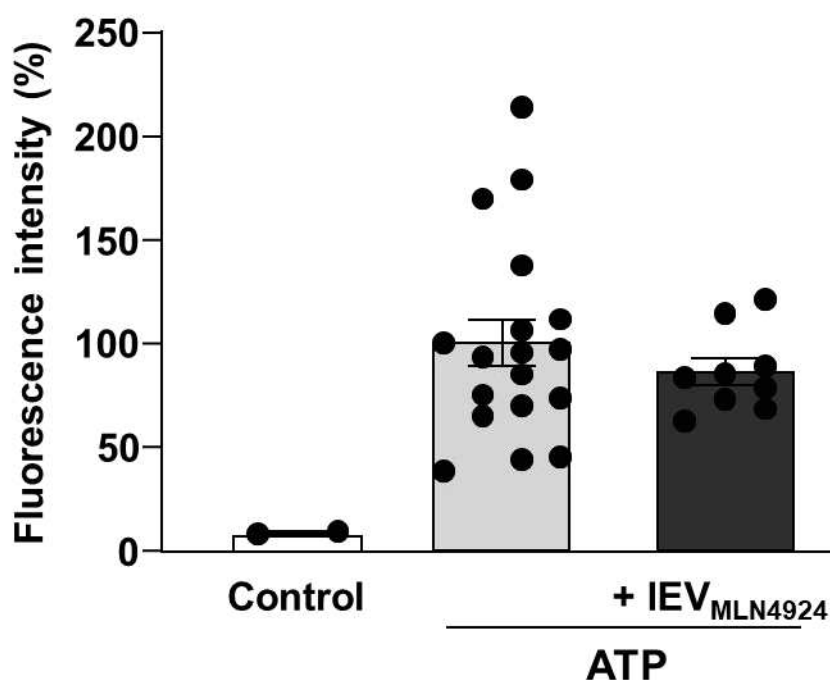


Supplemental Figure 2

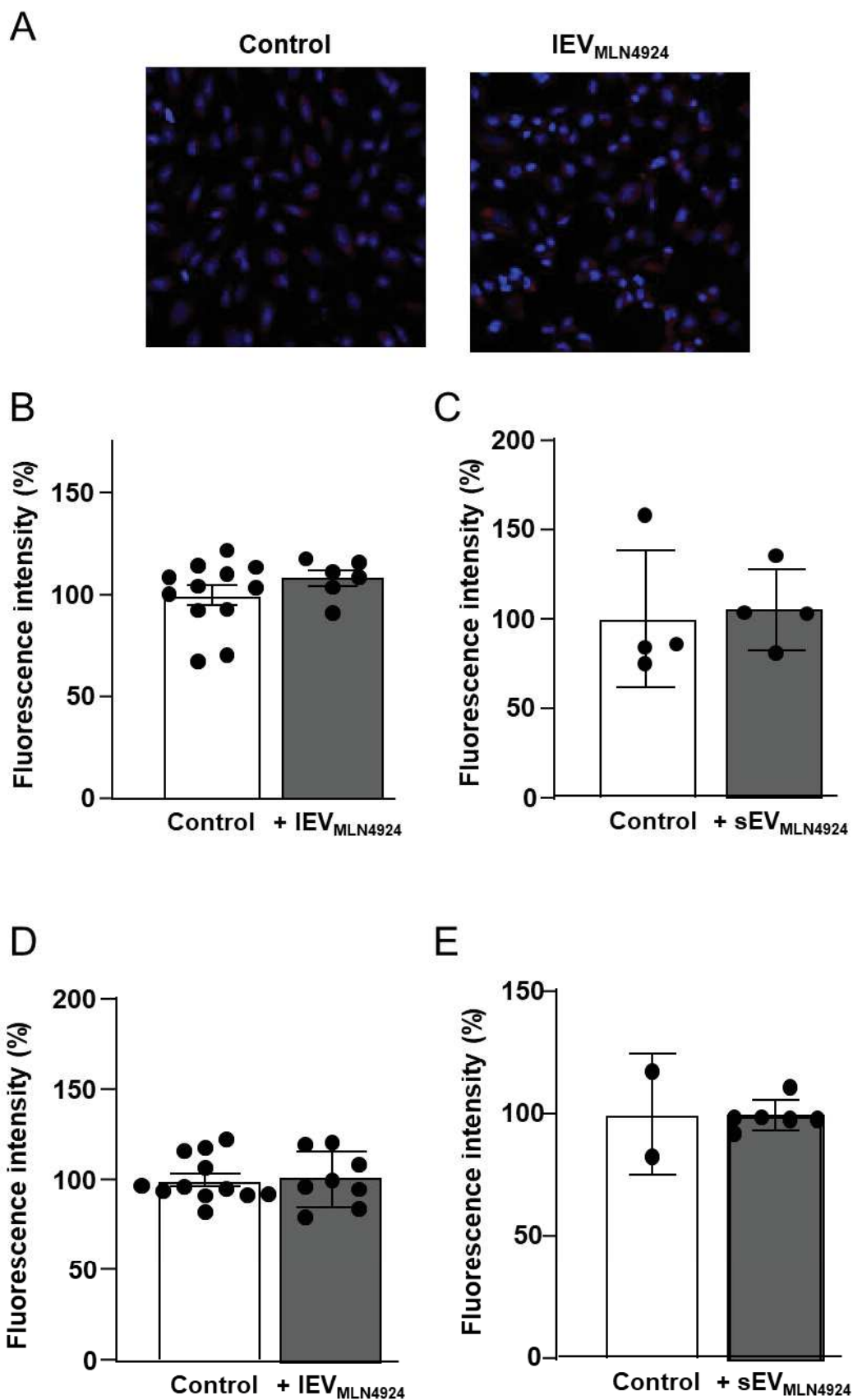
A



B

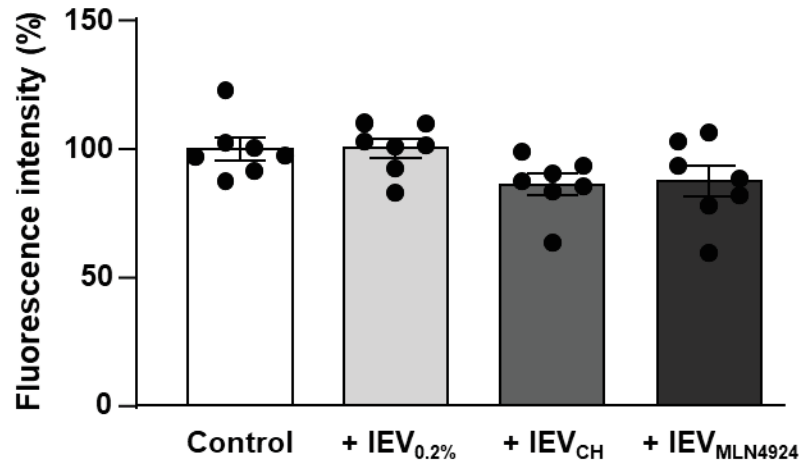


Supplemental Figure 3

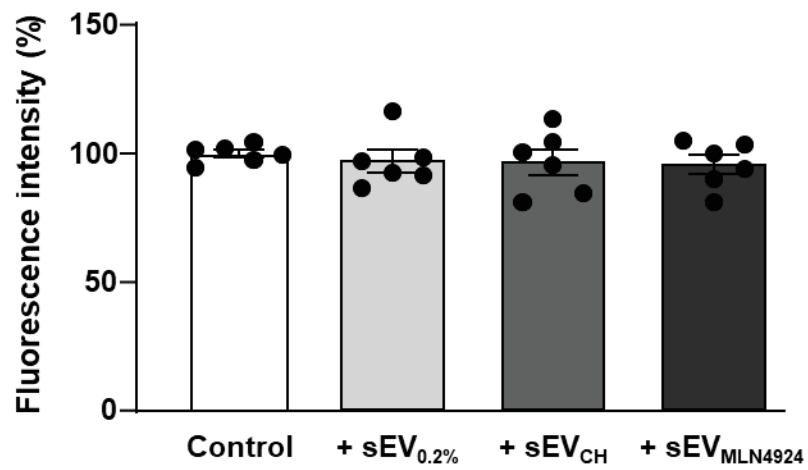


Supplemental Figure 4

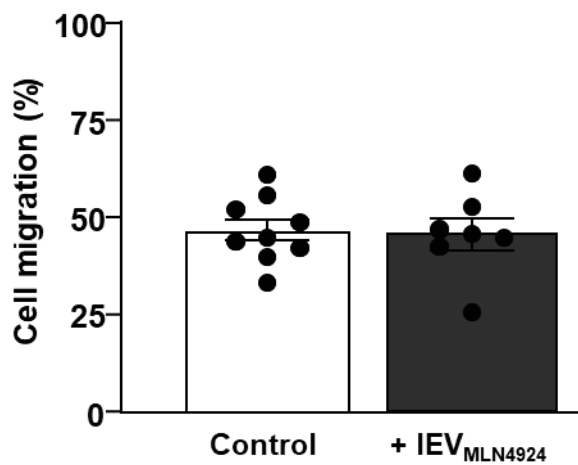
A



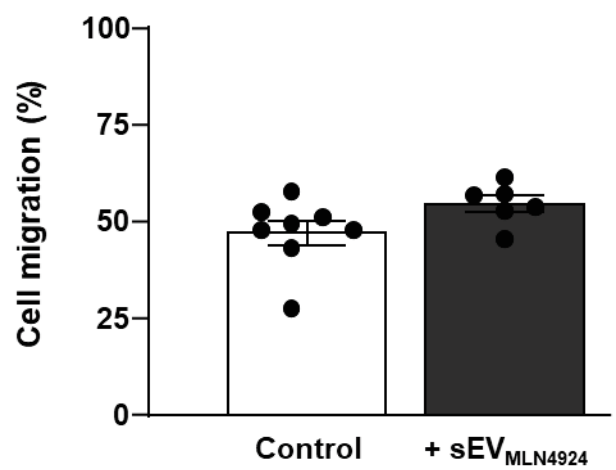
B



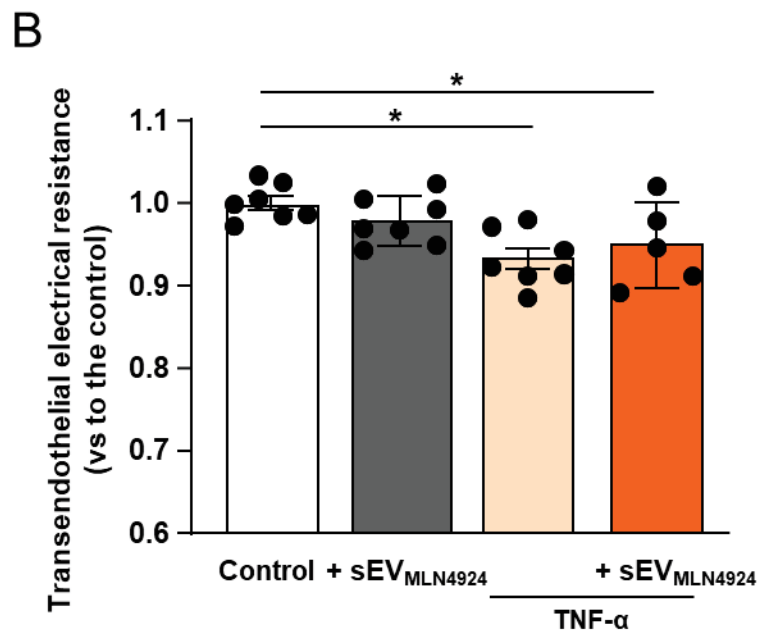
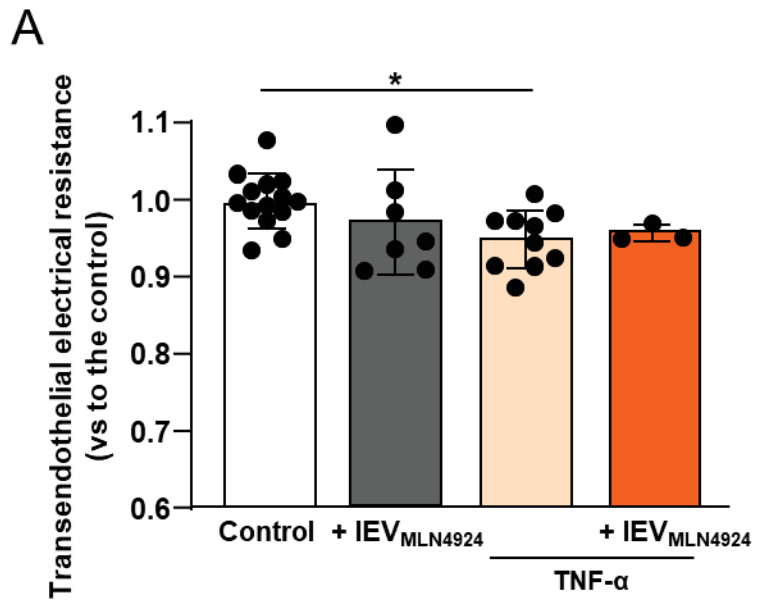
C



D



Supplemental Figure 5



Partie III : Discussion

Discussion

L'ensemble des résultats obtenus nous ont permis de montrer dans un premier temps que les traitements pharmacologiques, à savoir le CH et le MLN4924 induisaient bien un désassemblage du cil initié en partie par la production de VEs. Les mécanismes par lesquels ces deux molécules permettent le désassemblage du cil restent cependant inconnus. Les expériences que nous avons effectuées pour comprendre les voies de signalisations mises en place nous ont permis d'établir que l'augmentation importante et rapide des concentrations de Ca^{2+} intracellulaire est la première étape dans l'initiation du désassemblage initié par ces deux molécules. La voie de signalisation PI3K/AKT est une bonne candidate pour expliquer ce désassemblage. En effet, PI3K catalyse la production de PtdIns (3,4,5) P_3 situé à la surface du cil primaire. De plus, le Ca^{2+} régule fortement cette voie de signalisation ce qui suggère que le CH et/ou le MLN4924 entraînerait le désassemblage du cil par la modulation de cette voie de signalisation (Li, 2022 ; Danciu, 2003). Le CH est couramment utilisé pour entraîner le désassemblage du cil, c'est pourquoi le choix de cette molécule s'est avéré pertinent dans ce projet. Cependant, son inconvénient est qu'il n'est pas exclu qu'il agisse également sur la cellule et son architecture. Ainsi, nous avons choisi de le comparer au MLN4924 qui est, quant à elle, une molécule décrite pour entraîner le désassemblage du cil sans altérer la cellule (Mao, 2019). Cette description des molécules semble concorder avec les images des cellules que nous avons obtenues après les différents traitements (Figure 31).

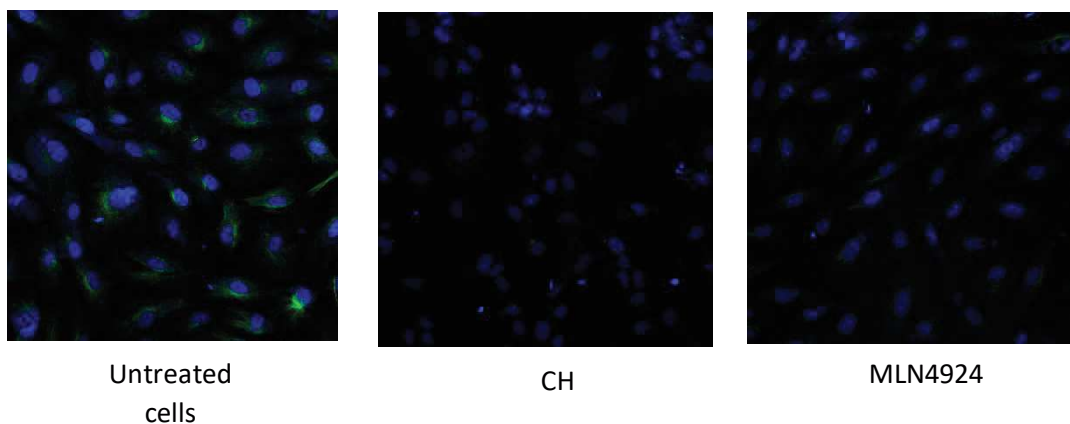


Figure 31: Effet du traitement avec le CH ou le MLN4924 sur l'architecture des cellules. Les images sont acquises par microscopie confocale après un marquage à l'alphatubuline acétylée (en vert) et au dapi (en bleu)

Cependant, l'analyse de la morphologie des VEs obtenues à partir de ces cellules traitées avec le CH ou le MLN4924 ne semble pas différer comme en témoigne les données détaillées dans l'article. En revanche, nous constatons des différences dans les effets observés après traitements des cellules avec les deux types de VEs. Par exemple, on constate que les VEs MLN4924 n'induisent pas d'augmentation significative des ROS. D'autres différences qui seront discutées par la suite sont également observées. Ces résultats témoignent donc d'une biogenèse ou d'un contenu différent des VEs produites avec les deux molécules. La comparaison des effets de ces deux populations de VEs est intéressante et novatrice dans le domaine. En effet, aucune étude ne s'est pour le moment intéressée à la caractérisation des VEs issues du cil primaire obtenue après traitement avec le MLN4924.

L'analyse des VEs issues du cil primaire n'est pas nouvelle, de plus en plus d'études portent sur la caractérisation de ces VEs et en particulier au niveau protéomique dans le but d'en faire de potentiels biomarqueurs des ciliopathies (Mohieldin, 2021a). De plus la plupart des équipes travaillant sur le sujet isolent les VEs issues du cil primaire par de hautes centrifugations à plus de 100 000g (Phua, 2017 ; Long, 2016). Dans le cas de ce projet de thèse, nous avons choisi d'isoler les VEs en fonction de leur densité par centrifugation différentielle avec une première population de VEs isolé à 17 000g qui correspondent au IVEs et une seconde population isolée à 100 000g correspondant au sVEs. Nos résultats montrent que nous obtenons des VEs issues du cil primaire dans les deux types de populations démontrant ainsi l'hétérogénéité de taille de ces VEs. Nous avons ensuite choisi d'orienter notre étude sur la caractérisation des ces IVEs et sVEs et d'en évaluer leurs effets dans le développement de l'athérosclérose. A ce jour, aucune donnée dans la littérature ne traite de cette aspect-là et encore moins en comparant les deux types de VEs. Nos données ont mis en évidence des effets différents des IVEs comparés aux sVEs. On constate ainsi que les IVEs_{0.2%} augmentent la migration des CE comparées aux sVEs_{0.2%} qui ne modifient pas ce paramètre. Ces résultats témoignent de l'intérêt d'étudier l'effet de ces vésicules de manière séparé.

Par la suite, nous avons étudié l'effet des VEs produites en condition physiologique (VEs_{0.2%}) et des VEs issues du désassemblage du cil (VEs_{CH} et VEs_{MLN}) dans différentes conditions. Nous avons mis en évidence un potentiel rôle protecteur des VEs produites par le cil en condition physiologique. En effet, les VE_{0.2%} ne modifient pas la production des ROS cytosoliques. De plus, le même traitement sur les artères mésentériques de souris a montré des résultats

intéressants avec une potentielle diminution de ces ROS. À cela s'ajoutent une augmentation significative de la migration des CE et une protection contre l'augmentation de la perméabilité induite par le TNF- α . Dans un contexte d'athérosclérose, ces propriétés sont intéressantes et pourraient démontrer la mise en place d'un système de protection à plusieurs niveaux, avec un pouvoir antioxydant de ces vésicules lors de l'initiation de la pathologie et de la dysfonction endothéliale et des mécanismes de réparation tissulaire sur des cas de pathologie plus avancée. Ces résultats intéressants et prometteurs pour la suite des études sur le cil primaire conduisent, cependant, à une discussion de certains points de ce manuscrit.

1. Protocole de culture cellulaire et production des VEs

La première problématique que nous avons rencontrée dans l'initiation de ce projet est la quantité de VEs récupérée. L'isolement de VEs à partir de cellules en culture est une technique pratiquée en routine au sein de mon équipe. Cependant, la plupart des VEs étudiées proviennent de cellules stimulées avec différentes molécules pour augmenter le rendement de production de VEs. C'est le cas par exemple des VEs portant le morphogène SHH ([Martínez, 2006](#)). Dans le cas des VEs issues du cil primaire, aucune molécule n'est connue pour augmenter la production de ce type de VEs, de plus la compréhension du désassemblage initié par les VEs est encore sommaire, la mise en place d'un protocole favorisant le rendement s'est donc avérée compliquée. Enfin, le but de l'étude était de se rapprocher des conditions physiologiques et physiopathologiques dans lequel se trouve le cil primaire au moment de l'initiation de l'athérosclérose, nous avons donc choisi des molécules décrites comme entraînant le désassemblage du cil et bien documentées dans la littérature. Conscients que ce mode de production de VEs par traitement chimique atteint rapidement ses limites dans l'étude des processus physiologiques, nous nous sommes intéressés à l'utilisation de siRNA pour entraîner le désassemblage du cil. INPP5E également appelé PMPCA s'est imposé comme une bonne cible. Cette protéine joue un rôle important dans le maintien du cil à la surface des cellules et son inhibition entraîne le désassemblage de celui-ci ([Phua, 2017](#)). Dans la plupart des études, les siRNA sont utilisés lorsque les cellules sont à une confluence de 70 à 80 % avec un métabolisme très actif. Les études portant sur le cil primaire utilisent pour la plupart cette technique pour empêcher la formation de celui-ci. Dans notre étude, l'objectif était de désassembler le cil lorsqu'il était déjà présent à la surface de la cellule. Cela nécessite d'utiliser ce procédé sur des cellules en phase cobblestone, c'est-à-dire quiescente et donc avec un

métabolisme réduit. Malgré de nombreuses tentatives et de nombreuses modifications dans le protocole de transfection nous ne sommes pas parvenus à démontrer l'efficacité de cette méthode pour entraîner le désassemblage du cil primaire comme en témoignent les résultats de western blot ci-dessous (Figure 32).

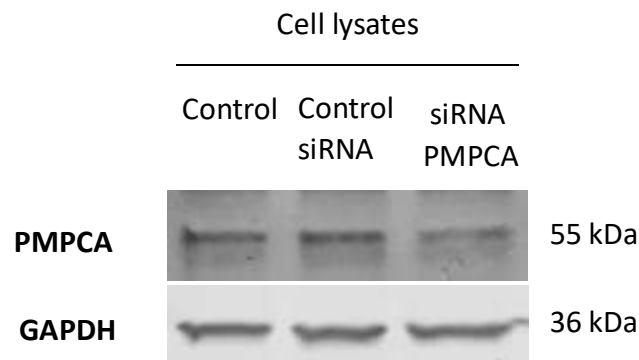


Figure 32: PMPCA ne semble pas être invalidé par siRNA.

Nous avons par la suite tenté de mettre en place un système de flux afin de se rapprocher des conditions physiologiques dans lesquelles se trouvent les CE au sein des vaisseaux sanguins. Ce procédé est intéressant car, comme décrit dans l'introduction bibliographique, les forces de cisaillement influencent grandement la biologie du cil primaire et, même si cela n'a pas été étudié, il est probable que celles-ci jouent également sur la biogenèse et la composition des VEs issues du cil primaire. Des études sur la biogenèse de VEs de CE en condition de shear stress on déjà été réalisées (Vion, 2013) et celles-ci montrent que les forces de cisaillement régulent la production de VEs. De plus, des études plus récentes ont déjà utilisé les forces de cisaillement pour caractériser et identifier les différences entre les VEs ciliaires et les VEs

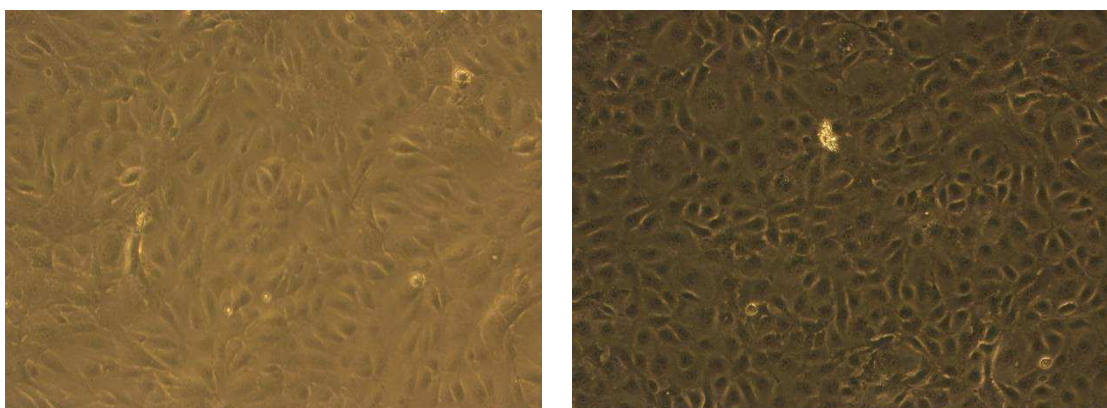


Figure 33: HUVECs soumises à une fore de cisaillement rotatoire. Cellules en condition statique (à gauche) et cellule en condition de force de cisaillement rotatoire après 4 heures (à droite)

issues de la cellule (Gupta, 2022 ; Mohieldin, 2021b). Les résultats que nous avons obtenus

après la mise en place d'un flux rotatoire appliqué à nos cellules pendant 4 heures sont un réarrangement morphologique et spatial des cellules dans le sens du flux (Figure 33).

Cependant, la production de VEs en quantité suffisante s'est avérée compliquée avec un tel système qui nécessitait l'utilisation d'une très faible concentration de cellules maintenues dans un faible volume de milieu. Ainsi, le rendement de VEs était trop faible pour réaliser des expériences. Ainsi, nous nous sommes dirigés vers un protocole de production de VEs en conditions statiques qui est déjà en routine au laboratoire. Il serait donc intéressant de complexifier le modèle par la suite et de caractériser les VEs qui en résultent afin de les comparer avec celles obtenues en condition statique.

Le modèle cellulaire utilisé peut être également discuté. Les HUVECs sont des cellules provenant de veines ayant la particularité de transporter le sang oxygéné. Ce modèle est très utilisé dans la littérature pour l'étude du cil primaire ; en effet ces cellules possèdent une capacité d'adhésion remarquable même lorsque la confluence est maintenue plusieurs jours. Nos essais sur d'autre type cellulaire plus pertinent, comme les HAOEC (Human Aortic Endothelial Cells), ont donné des résultats intéressants, notamment, sur l'incidence du cil ; cependant, le maintien des cellules dans la phase cobblestone s'est avéré compliqué et aléatoire, compromettant ainsi la reproductibilité des résultats (Figure 34).

Dans le développement de l'athérosclérose, les CML jouent également un rôle important au sein du développement de la pathologie. De plus, comme la plupart des cellules de l'organisme, celles-ci possèdent le cil primaire à leur surface, et ont la capacité de produire des VEs. Nous avons donc procédé de la même manière que précédemment et tenté de cultiver ces cellules (HASMC) dans les conditions permettant l'expression du cil à leur surface (Figure 34). Encore une fois, les résultats montrent un maintien compliqué des cellules en phase cobblestone et donc une impossibilité de poursuivre les expériences sur ce type cellulaire.

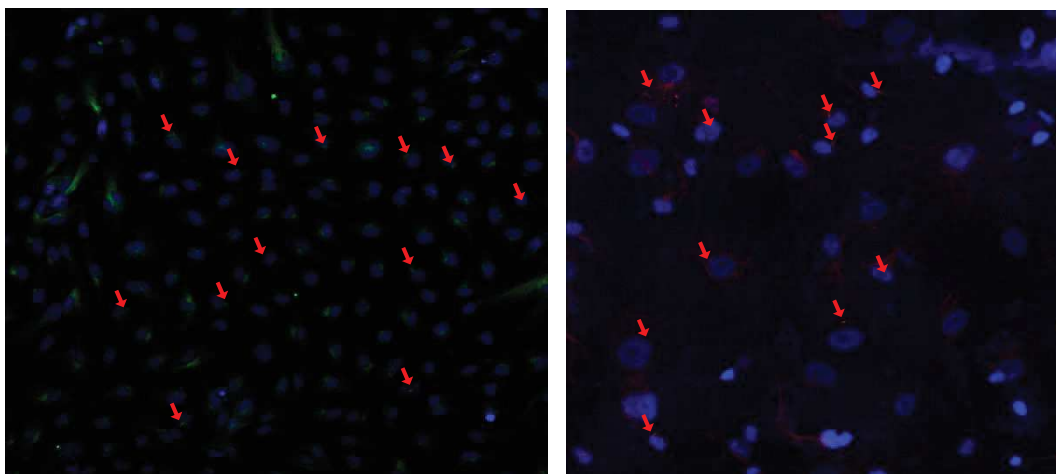


Figure 34 : Analyse par immunofluorescence de la présence des cils à la surface de différents types cellulaires. Les cellules HAoEC (à gauche) et les cellules HAMSC (à droite) en culture possèdent également un cil primaire

2. Caractérisation fonctionnelle des VEs issues du cil primaire

a. Biodisponibilité du NO

Dans les étapes précoces du développement de l'athérosclérose, l'un des éléments clé est la diminution de la biodisponibilité en NO et l'augmentation de la production de ROS. Nous avons étudié ces deux paramètres au niveau cellulaire pour le NO et à différents niveaux pour les ROS. Dans le contexte de cette pathologie, on pourrait s'attendre à une diminution de sa production induite par les VEs comme cela a déjà été démontré dans la littérature ([Martin, 2004](#)). Nos résultats montrent que les VEs provenant du désassemblage du cil ne semblent pas modifier la biodisponibilité du NO. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce résultat. Dans un premier temps la question de la concentration de VEs utilisée peut se poser. En effet, au sein de mon laboratoire, la concentration utilisée en routine est de 10 µg/ml or la concentration de VEs obtenue dans le contexte de cette étude ne permettait pas le traitement à une telle concentration. On peut donc se demander si celle-ci était suffisante pour obtenir un effet facilement quantifiable. La deuxième hypothèse concerne la présence de la signalisation SHH à la surface du cil primaire qui peut se retrouver dans les VEs lors du désassemblage du cil. Cette voie de signalisation est fortement impliquée dans la production de NO et notamment grâce à l'implication de la PI3-kinase et Akt ([Riobó, 2006](#)). De plus, l'équipe a déjà montré que les VEs porteuses de SHH pouvaient favoriser la production de NO ([Agouni, 2007](#)). Les vésicules issues du désassemblage pourraient donc dans un premier temps protéger le vaisseau en régulant la biodisponibilité du NO. Pour démontrer cette hypothèse,

il serait intéressant de confirmer dans un premier temps la présence de SHH dans les VEs et par la suite d'inhiber la voie de signalisation SHH dans les cellules cibles afin de valider l'hypothèse.

b. Production de ROS

Nos résultats démontrent une augmentation des ROS cytosoliques après traitement des cellules avec les VEs provenant du désassemblage du cil sans modification de la production des ROS mitochondriaux. Au vu des résultats, nous avons tenté d'identifier la source principale de ces ROS cytosoliques. Dans les CE, le NO est responsable du maintien de l'homéostasie vasculaire. La réduction de la biodisponibilité du NO, résultant d'une production réduite de NO et/ou d'une dégradation accrue du NO par l' O_2^- , marque l'apparition d'une dysfonction endothéliale. L' O_2^- est généré par plusieurs enzymes, telles que la NADPH oxydase, la xanthine oxydase et la eNOS non couplée. La NADPH oxydase a pour rôle de catalyser la réaction d'oxydation du NADPH par l' O_2 pour former l' O_2^- . Cette enzyme joue un rôle important dans l'inflammation puisqu'elle est particulièrement présente dans la membrane des cellules phagocytaires comme les macrophages. Dans le contexte de l'athérosclérose son étude est donc pertinente. La xanthine oxydase est quant à elle une enzyme fortement active en situation d'hypoxie et d'ischémie reperfusion où elle catalyse la dégradation de l'hypoxanthine en acide urique. Lors de la réoxygénation cette enzyme utilise l' O_2 comme accepteur d'électrons et induit ainsi la formation d' O_2^- . Ces phénomènes d'hypoxie et d'ischémie/reperfusion sont très courants dans la plaque d'athérome. De plus, la xanthine oxydase est particulièrement présente dans la paroi vasculaire, son étude dans le contexte de l'athérosclérose est donc pertinente (Förstermann, 2017). Enfin, la eNOS est la principale enzyme produisant le NO au niveau des CE. En condition physiopathologique, la eNOS peut être découplée entraînant une diminution accrue de la production de NO et favorisant au contraire la production d' O_2^- (Förstermann, 2012). Il a déjà été montré dans la littérature que, dans les CE, les LDL pouvaient entraîner le découplage de la eNOS (Stepp, 2002). Cette réaction est particulièrement intéressante dans le contexte de l'athérosclérose. En effet les LDL et les LDLox peuvent produire de la nitrotyrosine (en particulier via la NADPH oxydase) pouvant oxyder BH4, principal cofacteur de la eNOS. Son oxydation entraîne une forte diminution de la biodisponibilité du NO conduisant ainsi au découplage de la eNOS et à la production d' O_2^- (Li, 2013).

Nos données sur la production de NO après traitement avec les VEs ne montrent aucune modification de sa biodisponibilité nous permettant ainsi d'écartier l'implication du découplage de la eNOS dans l'augmentation de la production de ROS cytosoliques que nous avons observée. Nous nous sommes donc concentrés sur les deux principales enzymes pouvant expliquer nos résultats.

Ainsi, nous avons utilisé l'apocynine et l'allopurinol qui sont respectivement des inhibiteurs de la NADPH oxydase et de la xanthine oxydase pour déterminer l'implication d'une de ces deux enzymes dans l'augmentation des ROS que nous avons observée. De façon étonnante, nous ne constatons aucune modification dans la production des ROS après traitement des cellules avec ces inhibiteurs. L'une des hypothèses qui pourrait expliquer ce résultat serait le contenu que les VEs peuvent transporter et libérer au niveau de leur cellule cible. Plusieurs études démontrent que les VEs et les ROS sont étroitement liés. Ainsi, les VEs peuvent jouer un rôle important dans les mécanismes anti-inflammatoires avec le transport de molécules antioxydantes impliquées dans la capture des ROS tel que GPx, SOD2 ou encore la CAT (Soleti, 2012 ; Jin, 2005 ; Peterson, 2008). Une étude plus récente montre également que les VEs dérivés d'HUVEC possèdent la machinerie enzymatique nécessaire à la synthèse de NADPH (Bodega, 2018). D'un autre côté, la présence de la NADPH oxydase a également été démontrée dans les VEs (Burger, 2016 ; Leroyer, 2009). De plus, le contenu des VEs obtenus après traitement des cellules avec le CH ou le MLN4924 reste inconnu, il se peut donc que celles-ci contiennent des molécules pro-oxydantes. En tenant compte de cela, on peut supposer que les ROS sont induits par la fusion des VEs pro-oxydantes avec les CE. Ainsi, l'inhibition de la NADPH oxydase et de la xanthine oxydase au niveau cellulaire en amont du traitement avec les VEs n'aurait pas d'effet sur la production de ROS induite par les VEs.

En revanche, la même expérience sur les artères mésentériques de souris montre de façon très nette une diminution des ROS après traitement avec l'allopurinol démontrant que la xanthine oxydase, qui catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine au cours du métabolisme des purines, en est la source principale. De plus l'analyse des coupes par microscopie confocale, montre que les ROS ne sont pas présents uniquement au niveau de l'endothélium mais dans l'ensemble de l'artère. Ainsi, cette différence de mécanisme est surprenante et pourrait s'expliquer par la différence des méthodes utilisées pour l'analyse de la production des ROS ou par une signalisation différente dans un organe entier comparé aux

cellules en culture. L'une des explications peut être que le traitement avec les VEs est faite sur l'ensemble du vaisseau et pas par perfusion comme il aurait été intéressant de le faire. Ainsi, les VEs peuvent cibler différents types cellulaires et la réponse des ces cellules peut impacter les cellules voisines pouvant expliquer les différences d'effets observés.

c. Perméabilité endothéliale

La perméabilité endothéliale est un autre aspect de l'initiation de l'athérosclérose et de la dysfonction endothéliale. Nos résultats suggèrent que les VEs provenant du désassemblage du cil ne modifient pas la perméabilité endothéliale. Cependant, les VEs produites en conditions physiologiques, c'est-à-dire lorsque le cil est encore présent à la surface des cellules, protègent contre l'augmentation de la perméabilité induite par le TNF- α . Ces résultats sont également observés sur les artères mésentériques où le traitement avec les VEs 0.2 % semble diminuer la production de ROS cytosolique. L'ensemble de ces données confirme le rôle protecteur des VEs produites en conditions physiologiques (Njock, 2015) mais également l'importance du cil à la surface des cellules pour le maintien de l'homéostasie de l'organisme.

Pour approfondir nos recherches sur l'effet des VEs issues du désassemblage du cil sur les étapes initiatrices de l'athérosclérose, il aurait été intéressant d'étudier l'adhésion cellulaire dans des conditions d'inflammation, c'est-à-dire après traitement avec le TNF- α et les VEs afin de déterminer si celles-ci sont capables de moduler l'adhésion et donc favoriser l'infiltration monocytaire qui en découle.

d. Les VEs modulent les processus l'angiogénèse

Nous avons voulu déterminer si les VEs issues du cil primaire pouvaient moduler les processus d'angiogénèse. Pour cela, nous avons utilisé des cellules HUVECs que nous avons déposées sur Matrigel®. De façon spontanée, les cellules HUVECs forment des structures similaires à des capillaires, ce qui permet d'étudier les effets des différentes populations de VEs isolées sur la formation de capillaires. Ces résultats, bien que préliminaires, nous donnent une réponse sur le comportement des cellules après traitement avec les VEs. Nous constatons tout d'abord que les cellules non traitées forment un grand nombre de capillaires de petite taille. Les VEs produites en conditions physiologiques semblent favoriser cet effet. En revanche, les VEs provenant du désassemblage du cil primaire semblent diminuer le nombre de capillaires et, au contraire, favoriser la longueur de ceux déjà présents (Figure 35). Ces observations

pourraient concorder avec les événements se déroulant durant les stades plus tardifs de l'athérosclérose, c'est-à-dire lors la vascularisation de la plaque. En effet, durant l'angiogenèse, de nouveaux vaisseaux sont formés à partir du vasa vasorum et plongent dans la plaque pour la vasculariser. Ces vaisseaux sont bien souvent fins et mal formés, favorisant les brèches et les saignements intraplaque pouvant conduire à des thromboses (Dunmore, 2007 ; Sluimer, 2009). Les observations faites durant ces expériences suggèrent une tendance vers un phénotype physiopathologique des cellules traitées avec les VEs provenant du désassemblage du cil avec un nombre réduit de capillaires mais beaucoup plus longs.

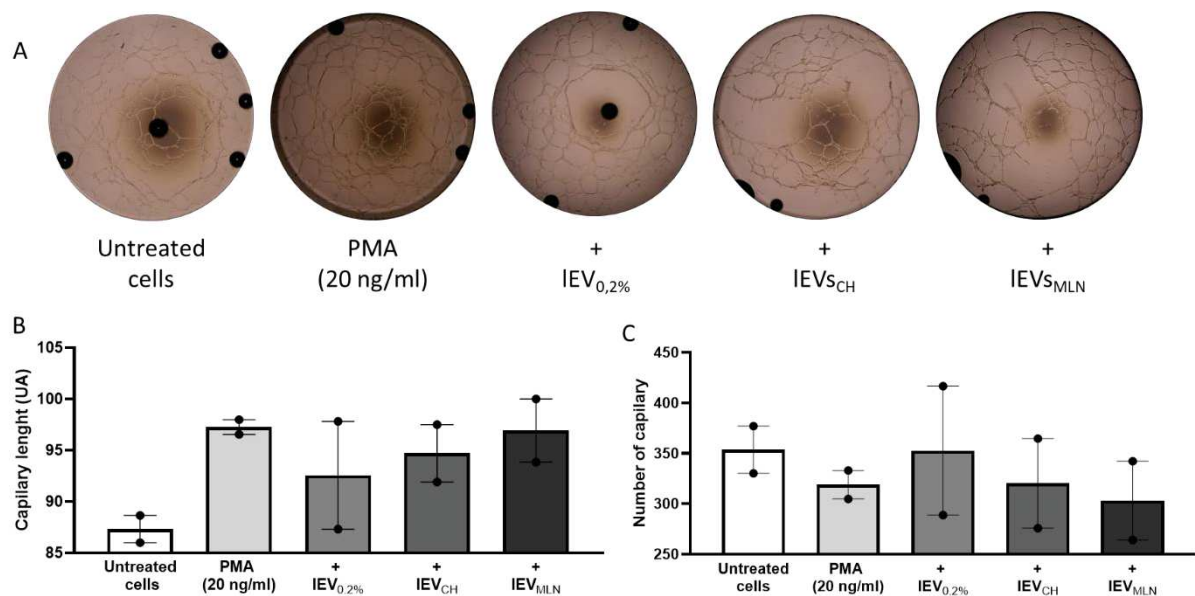


Figure 35: Effet des IVEs sur la formation de structures similaires à des capillaires. A : Images acquises au microscope de la formation des structures capillaires en fonction des différents traitements. B : Analyse de la taille des structures capillaires en fonction des différents traitements. C : Analyse du nombre de structures capillaires en fonction des différents traitements.

3. Les cellules musculaires dans le développement de l'athérosclérose

Comme il a été décrit précédemment dans l'introduction bibliographique, les CML ont un rôle prépondérant dans l'initiation de l'athérosclérose, en particulier, dans la migration et la prolifération des cellules pour former la chape fibreuse entourant le noyau nécrotique. Nous avons étudié l'effet des VEs provenant du désassemblage du cil sur ces processus. Ces résultats n'ont pas été présentés dans l'article mais seront discutés ici. Dans un premier temps, nous avons analysé la prolifération des HASMC après traitement avec les VEs (Figure 36).

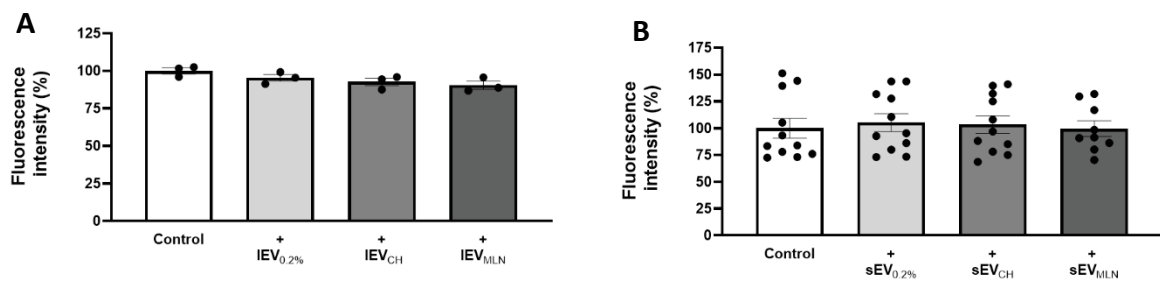


Figure 36: Effets des VEs sur la prolifération des CML. Analyse de la prolifération des CML après traitement avec les IVEs (A) et les sVEs (B).

Nous constatons qu'après traitement avec les IVEs (A) aucune modification de la prolifération n'est observée. Il en est de même après traitement avec les sVEs (B). Cela suggère que les VEs provenant du désassemblage du cil ne modifient pas la prolifération des CML. Cependant, certaines nuances sont à apporter à ces résultats. En effet, le traitement au PDGF, un facteur connu pour augmenter la prolifération des HASMC (García-Olivas, 2005), n'a pas modifié la prolifération des cellules (données non présentées), ce qui peut laisser penser un problème de la culture de ces cellules. De plus, la concentration de VEs utilisées n'est peut-être pas suffisante pour obtenir un effet.

Par la suite, nous avons analysé la migration des CML (Figure 37).

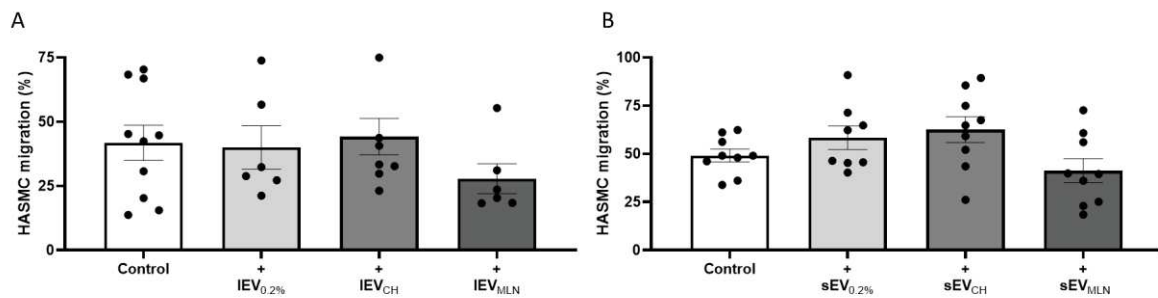


Figure 37: Effets des VE sur la migration des CML. Analyse de la migration des CML après traitement avec les IVEs (A) et les sVEs (B).

Nous constatons une tendance à la diminution de la migration des CML après traitement avec les IVEs MLN qui n'est pas retrouvé avec les autres traitements. Des résultats similaires sont obtenus avec les sVEs. Ces résultats témoignent, dans un premier temps, d'un mécanisme d'action différent des VEs provenant du désassemblage du cil après traitement avec le CH comparé aux VEs qui proviennent de cellules traitées au MLN4924. Ce phénomène a également été observé dans l'analyse de la production de ROS ce qui vient appuyer cette hypothèse. Ces résultats restent préliminaires.

L'absence d'effet au niveau musculaire suggère que les VEs provenant du désassemblage du cil agissent dans les prémisses de la pathologie lors de l'apparition de la dysfonction endothéliale.

4. Analyse de la réactivité vasculaire par artériographie après traitement avec les VEs

Dans le but d'avoir une approche globale sur l'effet des VEs dans le développement de l'athérosclérose, nous avons déterminé la réactivité vasculaire des artères mésentériques par traitement avec les VEs. Pour cela, nous avons isolé des artères de souris ApoE knock-out, avec une prédisposition au développement de la plaque d'athérome, âgées de 16 semaines nourries avec un régime standard. Les artères ont ensuite été isolées et nettoyées avant d'être incubées pendant 4 heures dans du milieu de culture DMEM et traitées ou non avec les VEs. Les artères ont été ensuite montées dans le sens du flux dans la cuve de l'artériographe et soumises à différents paliers de flux pour déterminer la dilatation au flux du vaisseau. Nous ne sommes pas parvenus à obtenir des acquisitions et ce malgré un temps d'incubation réduit. La réactivité vasculaire était totalement perdue après 2 heures d'incubation avec les VEs, ce délai étant insuffisant pour étudier les effets des VEs. Le protocole de cette expérience serait

donc à adapter afin d'obtenir des données permettant de confirmer l'implication de ces VEs dans le développement de la pathologie. Ainsi, notre hypothèse selon laquelle les VEs provenant du désassemblage du cil entraînent une diminution de la réactivité vasculaire reste à confirmer. Néanmoins, les résultats obtenus sur les ROS cytosolique tendent à confirmer cette hypothèse. En effet, comme indiqué précédemment, l'incubation des artères mésentériques avec les VEs induisent une augmentation des ROS cytosoliques dans tout le vaisseau, ce qui conforte cette hypothèse. Malgré la nécessité d'approfondir les expériences sur vaisseaux isolés, les données préliminaires concordent avec les données de la littérature. En effet, Cooke et son équipe (2003) ont démontré dans un modèle de souris $SOD^{-/-}$ que lorsque le niveau de ROS était élevé, la relaxation vasculaire était significativement diminuée. Les superoxydes dismutases (SOD) sont une famille d'enzyme qui catalysent la conversion de O_2^- en H_2O_2 . Une fois le H_2O_2 généré, il est pris en charge par des enzymes antioxydantes, notamment la CAT et les peroxydases, pour être réduit en O_2 et en H_2O . L'inhibition des SOD entraîne donc une augmentation des niveau de ROS (Brown, 2006). L'utilisation d'animaux déficients en SOD permet donc d'étudier l'effet des ROS sur de nombreux processus cellulaire et dans le cas de cette étude, leur effet sur la dysfonction endothéliale et la fonction vasculaire.

5. Caractérisation des VEs de patients SAOS atteints d'une dysfonction endothéliale

La dernière facette de cette étude est l'aspect clinique avec la caractérisation des IVEs de patients atteints d'un syndrome d'apnée obstructive du sommeil (SAOS). L'intérêt de cette cohorte dans le cadre de notre étude est que les patients sont discriminés sur la présence ou non d'une dysfonction endothéliale déterminée par la mesure de l'index de réactivité hyperémique par tonométrie artérielle périphérique. Nous avons ainsi obtenu des IVEs de patients SAOS sans dysfonction endothéliale (DE-) et avec dysfonction endothéliale (DE+) que nous avons caractérisées. Nos résultats montrent une augmentation de l'expression de l'alpha tubuline acétylée, une protéine spécifique du cil, dans les IVEs de patients DE+ comparé aux patients DE-. Ces résultats sont un pas vers la compréhension clinique de l'implication des VEs issues du cil primaire dans le développement de l'athérosclérose. En effet, cette analyse par western blot démontre une augmentation des VEs issues du cil primaire chez les patients DE+ ce qui suggère que le cil primaire produit plus de VEs ou qu'il s'est désassemblé au moins en partie par la production de VEs.

Pour la suite, il serait intéressant de déterminer la proportion des VEs en fonction de l'origine cellulaire. En effet, les VEs isolées proviennent du plasma des patients sans distinction de leur origine. Il est donc impossible de confirmer si ces VEs exprimant l'alpha tubuline acétylée proviennent d'endothélium vasculaire. La détermination du profil protéique de ces VEs par protéomique serait également intéressante afin d'identifier d'autres marqueurs ciliaires. Enfin, évaluer les effets de ces vésicules *in vitro* pourrait également nous renseigner sur leur potentiel profil pro inflammatoire ou anti-inflammatoire.

Partie IV : Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Cette thèse vient s'insérer dans un pool d'études encore jeune sur la compréhension des VEs issues du cil primaire aussi bien en conditions physiologiques que lors du développement de pathologies et de ciliopathies (Figure 38).

Nous démontrons pour la première fois un important rôle des VEs issues du cil primaire dans l'augmentation du stress oxydant responsable de la dysfonction endothéliale et les étapes précoces de développement de l'athérosclérose. De plus, nous montrons un rôle protecteur des VEs produites en conditions physiologiques, confirmant leurs multiples rôles aussi bien protecteurs que délétères.

Ces résultats ne sont cependant que partiels et de nombreuses autres expériences sont nécessaires afin de confirmer de façon certaine l'implication de ces VEs dans l'athérosclérose. De plus, l'ensemble de résultats présenté ici est obtenu à partir de VEs isolés de cellules en conditions statiques. Or dans la physiologie du vaisseau, l'endothélium est soumis à des forces de cisaillement qui peuvent influencer la composition des VEs, il serait donc intéressant dans la poursuite des études sur le sujet de mettre en place une production de VEs sous contrainte du flux afin de se rapprocher des conditions physiopathologiques observées *in vivo*.

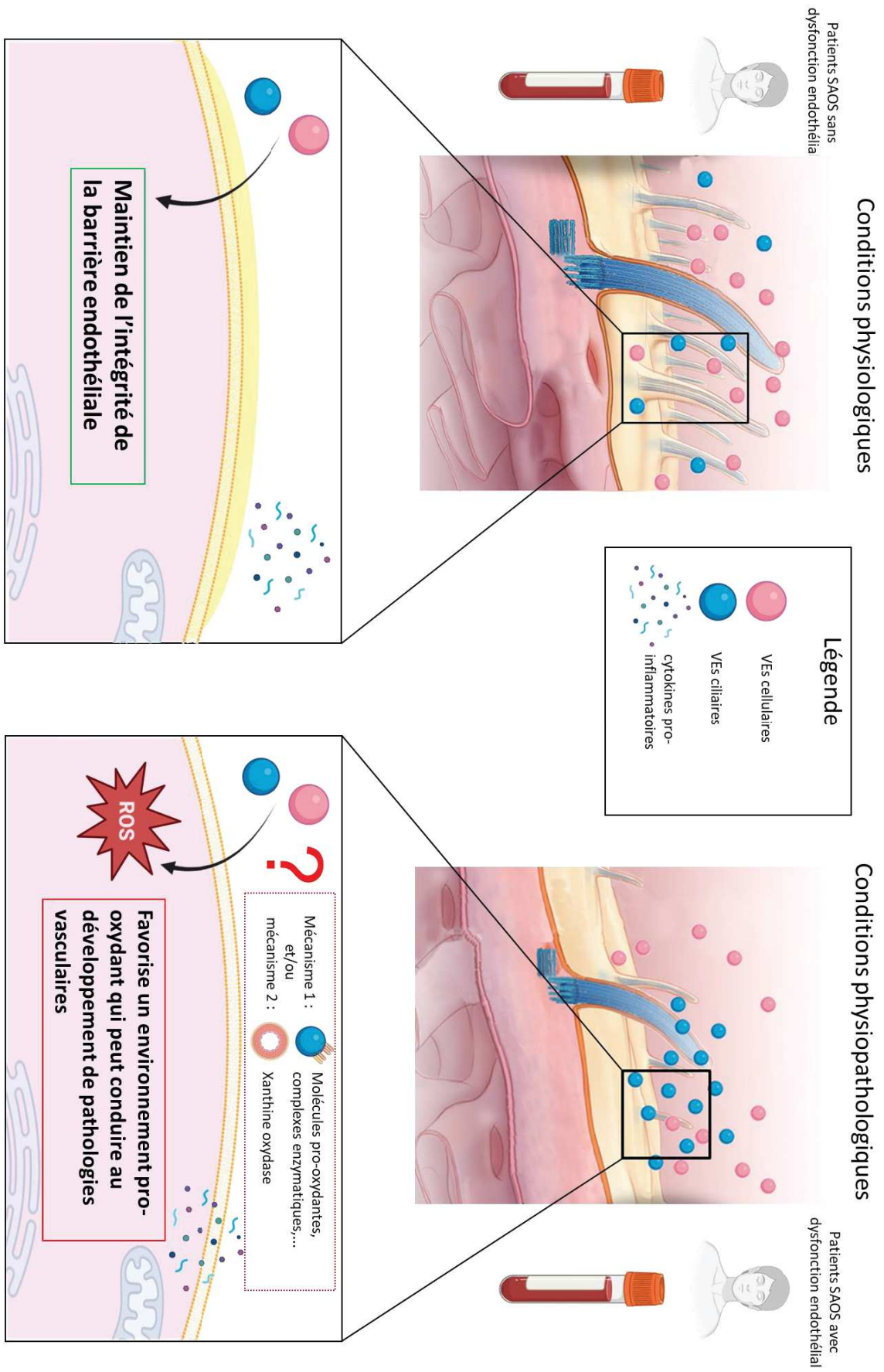


Figure 38 : Schéma récapitulatif des résultats expérimentaux

Bibliographie

- Aatonen MT, Öhman T, Nyman TA, Laitinen S, Grönholm M, Siljander PR-M (2014) Isolation and characterization of platelet-derived extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 3:10.3402/jev.v3.24692.
- Abbas M, Jesel L, Auger C, Amoura L, Messas N, Manin G, Rumig C, León-González AJ, Ribeiro TP, Silva GC, Abou-Merhi R, Hamade E, Hecker M, Georg Y, Chakfe N, Ohlmann P, Schini-Kerth VB, Toti F, Morel O (2017) Endothelial Microparticles From Acute Coronary Syndrome Patients Induce Premature Coronary Artery Endothelial Cell Aging and Thrombogenicity: Role of the Ang II/AT1 Receptor/NADPH Oxidase-Mediated Activation of MAPKs and PI3-Kinase Pathways. *Circulation* 135(3):280–296.
- AbouAlaiwi WA, Takahashi M, Mell BR, Jones TJ, Ratnam S, Kolb RJ, Nauli SM (2009) Ciliary Polycystin-2 Is a Mechanosensitive Calcium Channel Involved in Nitric Oxide Signaling Cascades. *Circ Res* 104(7):860–869.
- Adams RH, Alitalo K (2007) Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(6):464–478.
- AgouTii A, Ahmed Mostefai H, Porro C, Carusio N, Favre J, Richard V, Henrion D, Carmen Martinez M, Andriantsitohaina R (2007) Sonic hedgehog carried by microparticles corrects endothelial injury through nitric oxide release. *The FASEB Journal* 21(11):2735–2741.
- Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, Rak J (2008) Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol* 10(5):619–624.
- Ando J, Yamamoto K (2013) Flow detection and calcium signalling in vascular endothelial cells. *Cardiovascular Research* 99(2):260–268.
- Andrew PJ, Mayer B (1999) Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 43(3):521–531.
- Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA (2005) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)* 70(2):200–214.
- Anvarian Z, Mykytyn K, Mukhopadhyay S, Pedersen LB, Christensen ST (2019) Cellular signalling by primary cilia in development, organ function and disease. *Nat Rev Nephrol* 15(4):199–219.
- Archer FL, Wheatley DN (1971) Cilia in cell-cultured fibroblasts. II. Incidence in mitotic and post-mitotic BHK 21-C13 fibroblasts. *J Anat* 109(Pt 2):277–292
- Badgandi HB, Hwang S, Shimada IS, Lorient E, Mukhopadhyay S (2017) Tubby family proteins are adapters for ciliary trafficking of integral membrane proteins. *J Cell Biol* 216(3):743–760.
- Baker K, Beales PL (2009) Making sense of cilia in disease: The human ciliopathies. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics* 151C(4):281–295.
- Baker RW, Hughson FM (2016) Chaperoning SNARE assembly and disassembly. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17(8):465–479.
- Barger AC, Beeuwkes R, Lainey LL, Silverman KJ (1984) Hypothesis: vasa vasorum and neovascularization of human coronary arteries. A possible role in the pathophysiology of atherosclerosis. *N Engl J Med* 310(3):175–177.
- Baskurt OK, Yalcin O, Meiselman HJ (2004) Hemorheology and vascular control mechanisms. *Clin Hemorheol Microcirc* 30(3–4):169–178
- Beales P, Elcioglu N, Woolf A, Parker D, Flinter F (1999) New criteria for improved diagnosis of Bardet-Biedl syndrome: results of a population survey. *J Med Genet* 36(6):437–446

- Bedouhène S, Moulti-Mati F, Hurtado-Nedelec M, Dang PM-C, El-Benna J (2017) Luminol-amplified chemiluminescence detects mainly superoxide anion produced by human neutrophils. *Am J Blood Res* 7(4):41–48
- Benameur T, Soleti R, Porro C, Andriantsitohaina R, Martínez MC (2010a) Microparticles Carrying Sonic Hedgehog Favor Neovascularization through the Activation of Nitric Oxide Pathway in Mice. *PLOS ONE* 5(9):e12688.
- Benameur T, Tual-Chalot S, Andriantsitohaina R, Martínez MC (2010b) PPAR α Is Essential for Microparticle-Induced Differentiation of Mouse Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitor Cells and Angiogenesis. *PLOS ONE* 5(8):e12392.
- Berbari NF, O'Connor AK, Haycraft CJ, Yoder BK (2009) The Primary Cilium as a Complex Signaling Center. *Curr Biol* 19(13):R526.
- Berckmans RJ, Sturk A, van Tienen LM, Schaap MCL, Nieuwland R (2011) Cell-derived vesicles exposing coagulant tissue factor in saliva. *Blood* 117(11):3172–3180.
- Bhogaraju S, Cajanek L, Fort C, Blisnick T, Weber K, Taschner M, Mizuno N, Lamla S, Bastin P, Nigg EA, Lorentzen E (2013) Molecular Basis of Tubulin Transport Within the Cilium by IFT74 and IFT81. *Science* 341(6149):1009–1012.
- Blanchon S, Legendre M, Bottier M, Tamalet A, Montantin G, Collot N, Faucon C, Dastot F, Copin B, Clement A, Filoche M, Coste A, Amselem S, Escudier E, Papon J-F, Louis B (2020) Deep phenotyping, including quantitative ciliary beating parameters, and extensive genotyping in primary ciliary dyskinesia. *Journal of Medical Genetics* 57(4):237–244.
- Bobrie A, Colombo M, Krumeich S, Raposo G, Théry C (2012) Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation. *J Extracell Vesicles* 1:10.3402/jev.v1i0.18397.
- Bobrie A, Théry C (2013) Exosomes and communication between tumours and the immune system: are all exosomes equal? *Biochem Soc Trans* 41(1):263–267.
- Bodega G, Alique M, Bohórquez L, Morán M, Magro L, Puebla L, Ciordia S, Mena MC, Arza E, Ramírez MR (2018) Young and Especially Senescent Endothelial Microvesicles Produce NADPH: The Fuel for Their Antioxidant Machinery. *Oxid Med Cell Longev* 2018:3183794.
- Brown KA, Chu Y, Lund DD, Heistad DD, Faraci FM (2006) Gene transfer of extracellular superoxide dismutase protects against vascular dysfunction with aging. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 290(6):H2600–H2605.
- Buceta J, Ibañes M, Rasskin-Gutman D, Okada Y, Hirokawa N, Izpisúa-Belmonte JC (2005) Nodal Cilia Dynamics and the Specification of the Left/Right Axis in Early Vertebrate Embryo Development. *Biophysical Journal* 89(4):2199–2209.
- Burger D, Turner M, Munkonda MN, Touyz RM (2016) Endothelial Microparticle-Derived Reactive Oxygen Species: Role in Endothelial Signaling and Vascular Function. *Oxid Med Cell Longev* 2016:5047954.
- Byrd N, Grabel L (2004) Hedgehog signaling in murine vasculogenesis and angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 14(8):308–313.
- Canault M, Leroyer AS, Peiretti F, Lesèche G, Tedgui A, Bonardo B, Alessi M-C, Boulanger CM, Nalbone G (2007) Microparticles of Human Atherosclerotic Plaques Enhance the Shedding of the Tumor Necrosis

- Factor- α Converting Enzyme/ADAM17 Substrates, Tumor Necrosis Factor and Tumor Necrosis Factor Receptor-1. *The American Journal of Pathology* 171(5):1713–1723.
- Cao M, Ning J, Hernandez-Lara CI, Belzile O, Wang Q, Dutcher SK, Liu Y, Snell WJ Uni-directional ciliary membrane protein trafficking by a cytoplasmic retrograde IFT motor and ciliary ectosome shedding. *eLife* 4:e05242.
- Cardoso MA, Duarte AJ, Gonçalves HMR (2022) Carbon dots as Reactive Nitrogen Species nanosensors. *Analytica Chimica Acta* 1202:339654.
- Chapin HC, Rajendran V, Caplan MJ (2010) Polycystin-1 Surface Localization Is Stimulated by Polycystin-2 and Cleavage at the G Protein-coupled Receptor Proteolytic Site. *Mol Biol Cell* 21(24):4338–4348.
- Chávez M, Ena S, Van Sande J, de Kerchove d'Exaerde A, Schurmans S, Schiffmann SN (2015) Modulation of Ciliary Phosphoinositide Content Regulates Trafficking and Sonic Hedgehog Signaling Output. *Developmental Cell* 34(3):338–350.
- Chawan V, Yevate S, Gajbhiye R, Kulkarni V, Parte P (2020) Acetylation/deacetylation and microtubule associated proteins influence flagellar axonemal stability and sperm motility. *Biosci Rep* 40(12):BSR20202442.
- Chen C, Hu J, Ling K (2022) The Role of Primary Cilia-Associated Phosphoinositide Signaling in Development. *Journal of Developmental Biology* 10(4).
- Chen X, Gays D, Milia C, Santoro MM (2017) Cilia Control Vascular Mural Cell Recruitment in Vertebrates. *Cell Reports* 18(4):1033–1047.
- Chiu J-J, Chien S (2011) Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiol Rev* 91(1):327–387.
- Choi D-S, Kim D-K, Kim Y-K, Gho YS (2015) Proteomics of extracellular vesicles: Exosomes and ectosomes. *Mass Spectrom Rev* 34(4):474–490.
- Claesson-Welsh L (2015) Vascular permeability--the essentials. *Ups J Med Sci* 120(3):135–143.
- Clague MJ, Coulson JM, Urbé S (2012) Cellular functions of the DUBs. *J Cell Sci* 125(Pt 2):277–286.
- Colombo M, Moita C, van Niel G, Kowal J, Vigneron J, Benaroch P, Manel N, Moita LF, Théry C, Raposo G (2013) Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J Cell Sci* 126(Pt 24):5553–5565.
- Cooke C-LM, Davidge ST (2003) Endothelial-dependent vasodilation is reduced in mesenteric arteries from superoxide dismutase knockout mice. *Cardiovascular Research* 60(3):635–642.
- Cornec-Le Gall E, Torres VE, Harris PC (2018) Genetic Complexity of Autosomal Dominant Polycystic Kidney and Liver Diseases. *J Am Soc Nephrol* 29(1):13–23.
- Danciu TE, Adam RM, Naruse K, Freeman MR, Hauschka PV (2003) Calcium regulates the PI3K-Akt pathway in stretched osteoblasts. *FEBS Letters* 536(1–3):193–197.
- Davies MJ, Thomas A (1984) Thrombosis and Acute Coronary-Artery Lesions in Sudden Cardiac Ischemic Death. *New England Journal of Medicine* 310(18):1137–1140.
- Deatherage BL, Cookson BT (2012) Membrane Vesicle Release in Bacteria, Eukaryotes, and Archaea: a Conserved yet Underappreciated Aspect of Microbial Life. *Infect Immun* 80(6):1948–1957.

- Dejana E, Bazzoni G, Lampugnani MG (1999) Vascular endothelial (VE)-cadherin: only an intercellular glue? *Exp Cell Res* 252(1):13–19.
- Delling M, Indzhukulian AA, Liu X, Li Y, Xie T, Corey DP, Clapham DE (2016) Primary cilia are not calcium-responsive mechanosensors. *Nature* 531(7596):656–660.
- Dessalles CA, Leclech C, Castagnino A, Barakat AI (2021) Integration of substrate- and flow-derived stresses in endothelial cell mechanobiology. *Commun Biol* 4(1):764.
- Dewey CF, Bussolari SR, Gimbrone MA, Davies PF (1981) The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. *J Biomech Eng* 103(3):177–185.
- Diagbouga MR, Morel S, Cayron AF, Haemmerli J, Georges M, Hierck BP, Allémann E, Lemeille S, Bijlenga P, Kwak BR (2021) Primary cilia control endothelial permeability by regulating expression and location of junction proteins. *Cardiovasc Res* 118(6):1583–1596.
- DiNello E, Bovo E, Thuo P, Martin TG, Kirk JA, Zima AV, Cao Q, Kuo IY (2020) Deletion of cardiac polycystin 2/PC2 results in increased SR calcium release and blunted adrenergic reserve. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 319(5):H1021–H1035.
- Dinsmore C, Reiter JF (2016) Endothelial primary cilia inhibit atherosclerosis. *EMBO Rep* 17(2):156–166.
- Domigan CK, Iruela-Arispe ML (2012) Recent advances in vascular development. *Curr Opin Hematol* 19(3):176–183.
- Downing KH, Sui H (2007) Structural insights into microtubule doublet interactions in axonemes. *Current Opinion in Structural Biology* 17(2):253–259.
- Dubreuil V, Marzesco A-M, Corbeil D, Huttner WB, Wilsch-Bräuninger M (2007) Midbody and primary cilium of neural progenitors release extracellular membrane particles enriched in the stem cell marker prominin-1. *J Cell Biol* 176(4):483–495.
- Dunmore BJ, McCarthy MJ, Naylor AR, Brindle NPJ (2007) Carotid plaque instability and ischemic symptoms are linked to immaturity of microvessels within plaques. *J Vasc Surg* 45(1):155–159.
- Dvorak HF, Quay SC, Orenstein NS, Dvorak AM, Hahn P, Bitzer AM, Carvalho AC (1981) Tumor shedding and coagulation. *Science* 212(4497):923–924.
- Egorova AD, Khedoe PPSJ, Goumans M-JTH, Yoder BK, Nauli SM, Dijke P ten, Poelmann RE, Hierck BP (2011) Lack of primary cilia primes shear-induced Endothelial-to-Mesenchymal Transition. *Circ Res* 108(9):1093–1101.
- Egorova AD, van der Heiden K, Poelmann RE, Hierck BP (2012) Primary cilia as biomechanical sensors in regulating endothelial function. *Differentiation* 83(2):S56–S61.
- El-Benna J, Dang PM-C, Gougerot-Pocidallo M-A, Elbim C (2005) Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 53(3):199–206
- Engelhardt B, Wolburg H (2004) Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *Eur J Immunol* 34(11):2955–2963.
- Feng C, Chen Q, Fan M, Guo J, Liu Y, Ji T, Zhu J, Zhao X (2019) Platelet-derived microparticles promote phagocytosis of oxidized low-density lipoprotein by macrophages, potentially enhancing foam cell formation. *Annals of Translational Medicine* 7(18):477–477.

- Fernández-Friera L, Peñalvo JL, Fernández-Ortiz A, Ibañez B, López-Melgar B, Laclaustra M, Oliva B, Mocoroa A, Mendiguren J, Martínez de Vega V, García L, Molina J, Sánchez-González J, Guzmán G, Alonso-Farto JC, Guallar E, Civeira F, Sillesen H, Pocock S, Ordovás JM, Sanz G, Jiménez-Borreguero LJ, Fuster V (2015) Prevalence, Vascular Distribution, and Multiterritorial Extent of Subclinical Atherosclerosis in a Middle-Aged Cohort: The PESA (Progression of Early Subclinical Atherosclerosis) Study. *Circulation* 131(24):2104–2113.
- Ferrante MI, Zullo A, Barra A, Bimonte S, Messaddeq N, Studer M, Dollé P, Franco B (2006) Oral-facial-digital type I protein is required for primary cilia formation and left-right axis specification. *Nat Genet* 38(1):112–117.
- Förstermann U, Sessa WC (2012) Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 33(7):829–837.
- Förstermann U, Xia N, Li H (2017) Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circulation Research* 120(4):713–735.
- Forsythe E, Beales PL (2013) Bardet–Biedl syndrome. *Eur J Hum Genet* 21(1):8–13.
- Friedl P, Vischer P, Freyberg MA (2002) The role of thrombospondin-1 in apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 59(8):1347–1357.
- Fu S, Gebicki S, Jessup W, Gebicki JM, Dean RT (1995) Biological fate of amino acid, peptide and protein hydroperoxides. *Biochem J* 311 (Pt 3)(Pt 3):821–827.
- Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288(5789):373–376.
- Gadadhar S, Dadi H, Bodakuntla S, Schnitzler A, Bièche I, Rusconi F, Janke C (2017) Tubulin glycylation controls primary cilia length. *J Cell Biol* 216(9):2701–2713.
- García-Gonzalo FR, Phua SC, Roberson EC, García G, Abedin M, Schurmans S, Inoue T, Reiter JF (2015) Phosphoinositides Regulate Ciliary Protein Trafficking to Modulate Hedgehog Signaling. *Dev Cell* 34(4):400–409.
- García-Olivas R, Vilaró S, Reina M, Castel S (2007) PDGF-stimulated cell proliferation and migration of human arterial smooth muscle cells: Colocalization of PDGF isoforms with glycosaminoglycans. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39(10):1915–1929.
- Géminard C, De Gassart A, Blanc L, Vidal M (2004) Degradation of AP2 during reticulocyte maturation enhances binding of hsc70 and Alix to a common site on TFR for sorting into exosomes. *Traffic* 5(3):181–193.
- Geng Y-J, Libby P (2002) Progression of atheroma: a struggle between death and procreation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22(9):1370–1380.
- Gerakopoulos V, Ngo P, Tsiokas L (2020) Loss of polycystins suppresses deciliation via the activation of the centrosomal integrity pathway. *Life Sci Alliance* 3(9):e202000750.
- Ghaleh B, Thireau J, Cazorla O, Soleti R, Scheuermann V, Bizé A, Sambin L, Roubille F, Andriantsitohaina R, Martinez MC, Lacampagne A (2020) Cardioprotective effect of sonic hedgehog ligand in pig models of ischemia reperfusion. *Theranostics* 10(9):4006–4016.
- Ghossoub R, Molla-Herman A, Bastin P, Benmerah A (2011) The ciliary pocket: a once-forgotten membrane domain at the base of cilia. *Biology of the Cell* 103(3):131–144.

- Givens C, Tzima E (2016) Endothelial Mechanosignaling: Does One Sensor Fit All? *Antioxid Redox Signal* 25(7):373–388.
- Goetz JG, Steed E, Ferreira RR, Roth S, Ramspacher C, Boselli F, Charvin G, Liebling M, Wyart C, Schwab Y, Vermot J (2014) Endothelial Cilia Mediate Low Flow Sensing during Zebrafish Vascular Development. *Cell Reports* 6(5):799–808.
- Gonçalves J, Pelletier L (2017) The Ciliary Transition Zone: Finding the Pieces and Assembling the Gate. *Mol Cells* 40(4):243–253.
- Goswami D, Vestweber D (2016) How leukocytes trigger opening and sealing of gaps in the endothelial barrier. *F1000Res* 5:F1000 Faculty Rev-2321.
- Gradinaru D, Borsa C, Ionescu C, Prada GI (2015) Oxidized LDL and NO synthesis--Biomarkers of endothelial dysfunction and ageing. *Mech Ageing Dev* 151:101–113.
- Guescini M, Genedani S, Stocchi V, Agnati LF (2010) Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *J Neural Transm (Vienna)* 117(1):1–4.
- Gulinelli S, Salaro E, Vuerich M, Bozzato D, Pizzirani C, Bolognesi G, Idzko M, Di Virgilio F, Ferrari D (2012) IL-18 associates to microvesicles shed from human macrophages by a LPS/TLR-4 independent mechanism in response to P2X receptor stimulation. *Eur J Immunol* 42(12):3334–3345.
- Gupta A, Thirugnanam K, Thamilarasan M, Mohieldin AM, Zedan HT, Prabhudesai S, Griffin MR, Spearman AD, Pan A, Palecek SP, Yalcin HC, Nauli SM, Rarick KR, Zennadi R, Ramchandran R Cilia proteins are biomarkers of altered flow in the vasculature. *JCI Insight* 7(6):e151813.
- Haas MJ, Feng V, Gonzales K, Onstead-Haas L, Mooradian AD (2020) High-throughput analysis identifying drugs that reduce oxidative and ER stress in human coronary artery endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 879:173119.
- Hasegawa H, Thomas HJ, Schooley K, Born TL (2011) Native IL-32 is released from intestinal epithelial cells via a non-classical secretory pathway as a membrane-associated protein. *Cytokine* 53(1):74–83.
- Headlam HA, Davies MJ (2003) Cell-mediated reduction of protein and peptide hydroperoxides to reactive free radicals. *Free Radic Biol Med* 34(1):44–55.
- Herrington W, Lacey B, Sherliker P, Armitage J, Lewington S (2016) Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease. *Circ Res* 118(4):535–546.
- Hirokawa N, Noda Y, Tanaka Y, Niwa S (2009) Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(10):682–696.
- Hoang-Minh LB, Dutra-Clarke M, Breunig JJ, Sarkisian MR (2018) Glioma cell proliferation is enhanced in the presence of tumor-derived cilia vesicles. *Cilia* 7:6.
- Hoffmann U, Brady TJ, Muller J (2003) Cardiology patient page. Use of new imaging techniques to screen for coronary artery disease. *Circulation* 108(8):e50-53.
- Hogan MC, Manganelli L, Woollard JR, Masyuk AI, Masyuk TV, Tammachote R, Huang BQ, Leontovich AA, Beito TG, Madden BJ, Charlesworth MC, Torres VE, LaRusso NF, Harris PC, Ward CJ (2009) Characterization of PKD Protein-Positive Exosome-Like Vesicles. *J Am Soc Nephrol* 20(2):278–288.
- Hopkins PN (2013) Molecular biology of atherosclerosis. *Physiol Rev* 93(3):1317–1542.

- Horibe S, Tanahashi T, Kawauchi S, Murakami Y, Rikitake Y (2018) Mechanism of recipient cell-dependent differences in exosome uptake. *BMC Cancer* 18(1):47.
- Hoshino A, Costa-Silva B, Shen T-L, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, Molina H, Kohsaka S, Di Giannatale A, Ceder S, Singh S, Williams C, Soplol N, Uryu K, Pharmer L, King T, Bojmar L, Davies AE, Ararso Y, Zhang T, Zhang H, Hernandez J, Weiss JM, Dumont-Cole VD, Kramer K, Wexler LH, Narendran A, Schwartz GK, Healey JH, Sandstrom P, Labori KJ, Kure EH, Grandgenett PM, Hollingsworth MA, de Sousa M, Kaur S, Jain M, Mallya K, Batra SK, Jarnagin WR, Brady MS, Fodstad O, Muller V, Pantel K, Minn AJ, Bissell MJ, Garcia BA, Kang Y, Rajasekhar VK, Ghajar CM, Matei I, Peinado H, Bromberg J, Lyden D (2015) Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 527(7578):329–335.
- Hou Y, Pazour GJ, Witman GB (2004) A dynein light intermediate chain, D1bLIC, is required for retrograde intraflagellar transport. *Mol Biol Cell* 15(10):4382–4394.
- Huang X, Yuan T, Tschannen M, Sun Z, Jacob H, Du M, Liang M, Dittmar RL, Liu Y, Liang M, Kohli M, Thibodeau SN, Boardman L, Wang L (2013) Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics* 14:319.
- Huangfu D, Liu A, Rakeman AS, Murcia NS, Niswander L, Anderson KV (2003) Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins. *Nature* 426(6962):83–87.
- Hugel B, Martínez MC, Kunzelmann C, Freyssinet J-M (2005) Membrane Microparticles: Two Sides of the Coin. *Physiology* 20(1):22–27.
- Huotari J, Helenius A (2011) Endosome maturation. *EMBO J* 30(17):3481–3500.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(24):9265–9269.
- Imakita M, Yutani C, Strong JP, Sakurai I, Sumiyoshi A, Watanabe T, Mitsumata M, Kusumi Y, Katayama S, Mano M, Baba S, Mannami T, Masuda J, Sueishi K, Tanaka K (2001) Second nation-wide study of atherosclerosis in infants, children and young adults in Japan. *Atherosclerosis* 155(2):487–497.
- Ishikawa H, Thompson J, Yates JR, Marshall WF (2012) Proteomic Analysis of Mammalian Primary Cilia. *Curr Biol* 22(5):414–419.
- Jacoby M, Cox JJ, Gayral S, Hampshire DJ, Ayub M, Blockmans M, Pernot E, Kisseleva MV, Compère P, Schiffmann SN, Gergely F, Riley JH, Pérez-Morga D, Woods CG, Schurmans S (2009) INPP5E mutations cause primary cilium signaling defects, ciliary instability and ciliopathies in human and mouse. *Nat Genet* 41(9):1027–1031.
- Jeppesen DK, Fenix AM, Franklin JL, Higginbotham JN, Zhang Q, Zimmerman LJ, Liebler DC, Ping J, Liu Q, Evans R, Fissell WH, Patton JG, Rome LH, Burnette DT, Coffey RJ (2019) Reassessment of Exosome Composition. *Cell* 177(2):428-445.e18.
- Jiang J, Reho JJ, Bhattarai S, Cherascu I, Hedberg-Buenz A, Meyer KJ, Tayyari F, Rauckhorst AJ, Guo DF, Morgan DA, Taylor EB, Anderson MG, Drack AV, Rahmouni K (2021) Endothelial BBSome is essential for vascular, metabolic, and retinal functions. *Mol Metab* 53:101308.
- Jin H, White SR, Shida T, Schulz S, Aguiar M, Gygi SP, Bazan JF, Nachury MV (2010) The conserved Bardet-Biedl Syndrome proteins assemble a coat that traffics membrane proteins to cilia. *Cell* 141(7):1208–1219.

- Jin M, Drwal G, Bourgeois T, Saltz J, Wu HM (2005) Distinct proteome features of plasma microparticles. *Proteomics* 5(7):1940–1952.
- Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C (1987) Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *Journal of Biological Chemistry* 262(19):9412–9420.
- Jones TJ, Adapala RK, Geldenhuys WJ, Bursley C, AbouAlaiwi WA, Nauli SM, Thodeti CK (2012) Primary cilia regulates the directional migration and barrier integrity of endothelial cells through the modulation of hsp27 dependent actin cytoskeletal organization. *J Cell Physiol* 227(1):70–76.
- Jordan MA, Diener DR, Stepanek L, Pigino G (2018) The cryo-EM structure of intraflagellar transport trains reveals how dynein is inactivated to ensure unidirectional anterograde movement in cilia. *Nat Cell Biol* 20(11):1250–1255.
- Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, Bond VC, Borràs FE, Breakefield X, Budnik V, Buzas E, Camussi G, Clayton A, Cocucci E, Falcon-Perez JM, Gabrielsson S, Gho YS, Gupta D, Harsha HC, Hendrix A, Hill AF, Inal JM, Jenster G, Krämer-Albers E-M, Lim SK, Llorente A, Lötvall J, Marcilla A, Mincheva-Nilsson L, Nazarenko I, Nieuwland R, Nolte-'t Hoen ENM, Pandey A, Patel T, Piper MG, Pluchino S, Prasad TSK, Rajendran L, Raposo G, Record M, Reid GE, Sánchez-Madrid F, Schiffelers RM, Siljander P, Stensballe A, Stoorvogel W, Taylor D, Thery C, Valadi H, van Balkom BWM, Vázquez J, Vidal M, Wauben MHM, Yáñez-Mó M, Zoeller M, Mathivanan S (2012) Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol* 10(12):e1001450.
- Kamsteeg E-J, Hendriks G, Boone M, Konings IBM, Oorschot V, van der Sluijs P, Klumperman J, Deen PMT (2006) Short-chain ubiquitination mediates the regulated endocytosis of the aquaporin-2 water channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(48):18344–18349.
- Kaneshiro ES (1987) Lipids of Paramecium. *J Lipid Res* 28(11):1241–1258
- Kanno K, Sasaki S, Hirata Y, Ishikawa S, Fushimi K, Nakanishi S, Bichet DG, Marumo F (1995) Urinary excretion of aquaporin-2 in patients with diabetes insipidus. *N Engl J Med* 332(23):1540–1545.
- Kapourchali FR, Surendiran G, Chen L, Uitz E, Bahadori B, Moghadasian MH (2014) Animal models of atherosclerosis. *World J Clin Cases* 2(5):126–132.
- Keyel PA, Tkacheva OA, Larregina AT, Salter RD (2012) Coordinate Stimulation of Macrophages by Microparticles and TLR Ligands Induces Foam Cell Formation. *The Journal of Immunology* 189(9):4621–4629.
- Kim D-K, Kang B, Kim OY, Choi D, Lee J, Kim SR, Go G, Yoon YJ, Kim JH, Jang SC, Park K-S, Choi E-J, Kim KP, Desiderio DM, Kim Y-K, Lötvall J, Hwang D, Gho YS (2013) EVpedia: an integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 2:10.3402/jev.v2i0.20384.
- Kim HK, Song KS, Chung J-H, Lee KR, Lee S-N (2004) Platelet microparticles induce angiogenesis in vitro. *Br J Haematol* 124(3):376–384.
- Kim S, Piao S, Lee I, Nagar H, Choi S-J, Shin N, Kim DW, Shong M, Jeon BH, Kim C-S (2020) CR6 interacting factor 1 deficiency induces premature senescence via SIRT3 inhibition in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 150:161–171.
- Kim S, Zaghoul NA, Bubenshchikova E, Oh EC, Rankin S, Katsanis N, Obara T, Tsiokas L (2011) Nde1-mediated inhibition of ciliogenesis affects cell cycle re-entry. *Nat Cell Biol* 13(4):351–360.

- Kleene SJ, Kleene NK (2021) Inward Ca²⁺ current through the polycystin-2-dependent channels of renal primary cilia. *Am J Physiol Renal Physiol* 320(6):F1165–F1173.
- Kobayashi T, Tsang WY, Li J, Lane W, Dynlacht BD (2011) Centriolar Kinesin Kif24 Interacts with CP110 to Remodel Microtubules and Regulate Ciliogenesis. *Cell* 145(6):914–925.
- Kogure T, Yan IK, Lin W-L, Patel T (2013) Extracellular Vesicle–Mediated Transfer of a Novel Long Noncoding RNA TUC339. *Genes Cancer* 4(7–8):261–272.
- Komarova YA, Kruse K, Mehta D, Malik AB (2017) Protein Interactions at Endothelial Junctions and Signaling Mechanisms Regulating Endothelial Permeability. *Circulation Research* 120(1):179–206.
- Kozminski KG, Beech PL, Rosenbaum JL (1995) The Chlamydomonas kinesin-like protein FLA10 is involved in motility associated with the flagellar membrane. *Journal of Cell Biology* 131(6):1517–1527.
- Kozminski KG, Johnson KA, Forscher P, Rosenbaum JL (1993) A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90(12):5519–5523.
- Kubo T, Hirono M, Aikawa T, Kamiya R, Witman GB (2015) Reduced tubulin polyglutamylation suppresses flagellar shortness in Chlamydomonas. *Mol Biol Cell* 26(15):2810–2822.
- Kubo T, Kaida S, Abe J, Saito T, Fukuzawa H, Matsuda Y (2009) The Chlamydomonas Hatching Enzyme, Sporangin, is Expressed in Specific Phases of the Cell Cycle and is Localized to the Flagella of Daughter Cells Within the Sporangial Cell Wall. *Plant and Cell Physiology* 50(3):572–583.
- Kuhlencordt PJ, Gyurko R, Han F, Scherrer-Crosbie M, Aretz TH, Hajjar R, Picard MH, Huang PL (2001) Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice. *Circulation* 104(4):448–454.
- Kumar D, Blaby-Haas CE, Merchant SS, Mains RE, King SM, Eipper BA (2016) Early eukaryotic origins for cilia-associated bioactive peptide-amidating activity. *J Cell Sci* 129(5):943–956.
- Kunzelmann-Marche C, Freyssinet J-M, Martínez MC (2001) Regulation of Phosphatidylserine Transbilayer Redistribution by Store-operated Ca²⁺ Entry: ROLE OF ACTIN CYTOSKELETON*. *Journal of Biological Chemistry* 276(7):5134–5139.
- Laclaustra M, Casasnovas JA, Fernández-Ortiz A, Fuster V, León-Latre M, Jiménez-Borreguero LJ, Pocovi M, Hurtado-Roca Y, Ordovas JM, Jarauta E, Guallar E, Ibañez B, Civeira F (2016) Femoral and Carotid Subclinical Atherosclerosis Association With Risk Factors and Coronary Calcium: The AWHs Study. *Journal of the American College of Cardiology* 67(11):1263–1274.
- Lambacher NJ, Bruel A-L, van Dam TJP, Szymańska K, Slaats GG, Kuhns S, McManus GJ, Kennedy JE, Gaff K, Wu KM, van der Lee R, Burglen L, Doummar D, Rivière J-B, Faivre L, Attié-Bitach T, Saunier S, Curd A, Peckham M, Giles RH, Johnson CA, Huynen MA, Thauvin-Robinet C, Blacque OE (2016) TMEM107 recruits ciliopathy proteins to subdomains of the ciliary transition zone and causes Joubert syndrome. *Nat Cell Biol* 18(1):122–131.
- Lehman JM, Michaud EJ, Schoeb TR, Aydin-Son Y, Miller M, Yoder BK (2008) The Oak Ridge Polycystic Kidney Mouse: Modeling Ciliopathies of Mice and Men. *Dev Dyn* 237(8):1960–1971.
- Leroyer AS, Ebrahimian TG, Cochain C, Récalde A, Blanc-Brude O, Mees B, Vilar J, Tedgui A, Levy BI, Chimini G, Boulanger CM, Silvestre J-S (2009) Microparticles from ischemic muscle promotes postnatal vasculogenesis. *Circulation* 119(21):2808–2817.

- Leroyer AS, Isobe H, Lesèche G, Castier Y, Wassef M, Mallat Z, Binder BR, Tedgui A, Boulanger CM (2007) Cellular Origins and Thrombogenic Activity of Microparticles Isolated From Human Atherosclerotic Plaques. *Journal of the American College of Cardiology* 49(7):772–777.
- Leroyer AS, Rautou P-E, Silvestre J-S, Castier Y, Lesèche G, Devue C, Duriez M, Brandes RP, Lutgens E, Tedgui A, Boulanger CM (2008) CD40 Ligand+ Microparticles From Human Atherosclerotic Plaques Stimulate Endothelial Proliferation and Angiogenesis: A Potential Mechanism for Intraplaque Neovascularization. *Journal of the American College of Cardiology* 52(16):1302–1311.
- Li B, Yan Y-P, Liang C, He Y-Y, Wang Y, Li M-Y, Chen S-T, Li Y, Liu A-X, Yan G-J, Yang Z-M (2022) Primary Cilia Restrain PI3K-AKT Signaling to Orchestrate Human Decidualization. *Int J Mol Sci* 23(24):15573.
- Li H, Förstermann U (2013) Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. *Curr Opin Pharmacol* 13(2):161–167.
- Li L, Zhu D, Huang L, Zhang J, Bian Z, Chen X, Liu Y, Zhang C-Y, Zen K (2012) Argonaute 2 Complexes Selectively Protect the Circulating MicroRNAs in Cell-Secreted Microvesicles. *PLoS One* 7(10):e46957.
- Li S, Butler P, Wang Y, Hu Y, Han DC, Usami S, Guan J-L, Chien S (2002) The role of the dynamics of focal adhesion kinase in the mechanotaxis of endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(6):3546–3551.
- Libby P (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420(6917):868–874.
- Lillis AP, Muratoglu SC, Au DT, Migliorini M, Lee M-J, Fried SK, Mikhailenko I, Strickland DK (2015) LDL Receptor-Related Protein-1 (LRP1) Regulates Cholesterol Accumulation in Macrophages. *PLoS One* 10(6):e0128903.
- Long H, Zhang F, Xu N, Liu G, Diener DR, Rosenbaum JL, Huang K (2016) Comparative analysis of ciliary membranes and ectosomes. *Curr Biol* 26(24):3327–3335.
- Lu Q, Insinna C, Ott C, Stauffer J, Pintado PA, Rahajeng J, Baxa U, Walia V, Cuenca A, Hwang Y-S, Daar IO, Lopes S, Lippincott-Schwartz J, Jackson PK, Caplan S, Westlake CJ (2015) Early steps in primary cilium assembly require EHD1- and EHD3-dependent ciliary vesicle formation. *Nat Cell Biol* 17(3):228–240.
- Luo N, Kumar A, Conwell M, Weinreb RN, Anderson R, Sun Y (2013) Compensatory Role of Inositol 5-Phosphatase INPP5B to OCRL in Primary Cilia Formation in Oculocerebrorenal Syndrome of Lowe. *PLoS One* 8(6):e66727.
- Luo N, West CC, Murga-Zamalloa CA, Sun L, Anderson RM, Wells CD, Weinreb RN, Travers JB, Khanna H, Sun Y (2012) OCRL localizes to the primary cilium: a new role for cilia in Lowe syndrome. *Hum Mol Genet* 21(15):3333–3344.
- Luu VZ, Chowdhury B, Al-Omran M, Hess DA, Verma S (2018) Role of endothelial primary cilia as fluid mechanosensors on vascular health. *Atherosclerosis* 275:196–204.
- Luxmi R, Kumar D, Mains RE, King SM, Eipper BA (2019) Cilia-based peptidergic signaling. *PLOS Biology* 17(12):e3000566.
- Mackenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A (2001) Rapid Secretion of Interleukin-1 β by Microvesicle Shedding. *Immunity* 15(5):825–835.
- MacRae Dell K, Nemo R, Sweeney WE, Avner ED (2004) EGF-related growth factors in the pathogenesis of murine ARPKD. *Kidney Int* 65(6):2018–2029.

- Mageswaran SK, Dixon MG, Curtiss M, Keener JP, Babst M (2014) Binding to Any ESCRT Can Mediate Ubiquitin-Independent Cargo Sorting. *Traffic* 15(2):212–229.
- Maguire JE, Silva M, Nguyen KCQ, Hellen E, Kern AD, Hall DH, Barr MM (2015) Myristoylated CIL-7 regulates ciliary extracellular vesicle biogenesis. *Mol Biol Cell* 26(15):2823–2832.
- Malek AM, Alper SL, Izumo S (1999b) Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *JAMA* 282(21):2035–2042.
- Malek AM, Jiang L, Lee I, Sessa WC, Izumo S, Alper SL (1999a) Induction of nitric oxide synthase mRNA by shear stress requires intracellular calcium and G-protein signals and is modulated by PI 3 kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 254(1):231–242.
- Malicki JJ, Johnson CA (2017) The Cilium: Cellular Antenna and Central Processing Unit. *Trends in Cell Biology* 27(2):126–140.
- Mao H, Tang Z, Li H, Sun B, Tan M, Fan S, Zhu Y, Sun Y (2019) Neddylation inhibitor MLN4924 suppresses cilia formation by modulating AKT1. *Protein Cell* 10(10):726–744.
- Marquitan M, Clausmeyer J, Actis P, Córdoba AL, Korchev Y, Mark MD, Herlitz S, Schuhmann W (2016) Intracellular Hydrogen Peroxide Detection with Functionalised Nanoelectrodes. *ChemElectroChem* 3(12):2125–2129.
- Martin S, Tesse A, Hugel B, Martínez MC, Morel O, Freyssinet J-M, Andriantsitohaina R (2004) Shed Membrane Particles From T Lymphocytes Impair Endothelial Function and Regulate Endothelial Protein Expression. *Circulation* 109(13):1653–1659.
- Martinez MC, Andriantsitohaina R, Christian W, Sebastian M (2011) Microparticles in Angiogenesis. *Circulation Research* 109(1):110–119.
- Martínez MC, Freyssinet J-M (2001) Deciphering the plasma membrane hallmarks of apoptotic cells: Phosphatidylserine transverse redistribution and calcium entry. *BMC Cell Biol* 2:20.
- Martínez MC, Larbret F, Zobairi F, Coulombe J, Debili N, Vainchenker W, Ruat M, Freyssinet J-M (2006) Transfer of differentiation signal by membrane microvesicles harboring hedgehog morphogens. *Blood* 108(9):3012–3020.
- Maskey D, Marlin MC, Kim S, Kim S, Ong E-C, Li G, Tsiokas L (2015) Cell cycle-dependent ubiquitylation and destruction of NDE1 by CDK5-FBW7 regulates ciliary length. *The EMBO Journal* 34(19):2424–2440.
- May SR, Ashique AM, Karlen M, Wang B, Shen Y, Zarbalis K, Reiter J, Ericson J, Peterson AS (2005) Loss of the retrograde motor for IFT disrupts localization of Smo to cilia and prevents the expression of both activator and repressor functions of Gli. *Dev Biol* 287(2):378–389.
- Mensà E, Guescini M, Giuliani A, Bacalini MG, Ramini D, Corleone G, Ferracin M, Fulgenzi G, Graciotti L, Prattichizzo F, Sorci L, Battistelli M, Monsurrò V, Bonfigli AR, Cardelli M, Recchioni R, Marcheselli F, Latini S, Maggio S, Fanelli M, Amatori S, Storci G, Ceriello A, Stocchi V, De Luca M, Magnani L, Rippo MR, Procopio AD, Sala C, Budimir I, Bassi C, Negrini M, Garagnani P, Franceschi C, Sabbatinelli J, Bonafè M, Olivieri F (2020) Small extracellular vesicles deliver miR-21 and miR-217 as pro-senescence effectors to endothelial cells. *J Extracell Vesicles* 9(1):1725285.
- Merchant JL (2012) Hedgehog signalling in gut development, physiology and cancer. *J Physiol* 590(Pt 3):421–432.

- Mick DU, Rodrigues RB, Leib RD, Adams CM, Chien AS, Gygi SP, Nachury MV (2015) Proteomics of Primary Cilia by Proximity Labeling. *Dev Cell* 35(4):497–512.
- Mickleit M, Schmid B, Weber M, Fahrbach FO, Hombach S, Reischauer S, Huisken J (2014) High-resolution reconstruction of the beating zebrafish heart. *Nat Methods* 11(9):919–922.
- Mirvis M, Siemers KA, Nelson WJ, Stearns TP (2019) Primary cilium loss in mammalian cells occurs predominantly by whole-cilium shedding. *PLoS Biol* 17(7):e3000381.
- Mittelbrunn M, Gutiérrez-Vázquez C, Villarroya-Beltri C, González S, Sánchez-Cabo F, González MÁ, Bernad A, Sánchez-Madrid F (2011) Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun* 2:282.
- Mittler R, Zandalinas SI, Fichman Y, Van Breusegem F (2022) Reactive oxygen species signalling in plant stress responses. *Nat Rev Mol Cell Biol* 23(10):663–679.
- Miyamoto T, Hosoba K, Ochiai H, Royba E, Izumi H, Sakuma T, Yamamoto T, Dynlacht BD, Matsuura S (2015) The Microtubule-Depolymerizing Activity of a Mitotic Kinesin Protein KIF2A Drives Primary Cilia Disassembly Coupled with Cell Proliferation. *Cell Rep* 10(5):664–673.
- Mockel A, Perdomo Y, Stutzmann F, Letsch J, Marion V, Dollfus H (2011) Retinal dystrophy in Bardet–Biedl syndrome and related syndromic ciliopathies. *Progress in Retinal and Eye Research* 30(4):258–274.
- Mohieldin AM, Alachkar A, Yates J, Nauli SM (2021a) Novel biomarkers of ciliary extracellular vesicles interact with ciliopathy and Alzheimer’s associated proteins. *Commun Integr Biol* 14(1):264–269.
- Mohieldin AM, Pala R, Beuttler R, Moresco JJ, Yates JR, Nauli SM (2021b) Ciliary extracellular vesicles are distinct from the cytosolic extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 10(6):e12086.
- Mohieldin AM, Pala R, Sherpa RT, Alanazi M, Alanazi A, Shamloo K, Ahsan A, AbouAlaiwi WA, Moresco JJ, Yates III JR, Nauli SM (2020) Proteomic Identification Reveals the Role of Ciliary Extracellular-Like Vesicle in Cardiovascular Function. *Advanced Science* 7(16):1903140.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43(2):109–142
- Morelli AE, Larregina AT, Shufesky WJ, Sullivan MLG, Stolz DB, Papworth GD, Zahorchak AF, Logar AJ, Wang Z, Watkins SC, Falo LD, Thomson AW (2004) Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood* 104(10):3257–3266.
- Mulcahy LA, Pink RC, Carter DRF (2014) Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles* 3.
- Muralidharan-Chari V, Clancy J, Plou C, Romao M, Chavrier P, Raposo G, D’Souza-Schorey C (2009) ARF6-regulated shedding of tumor-cell derived plasma membrane microvesicles. *Curr Biol* 19(22):1875–1885
- Myklebust R, Engedal H, Sætersdal TS, Ulstein M (1977) Primary 9+0 cilia in the embryonic and the adult human heart. *Anat Embryol* 151(2):127–139.
- Nabhan JF, Hu R, Oh RS, Cohen SN, Lu Q (2012) Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(11):4146–4151.

- Nager AR, Goldstein JS, Herranz-Pérez V, Portran D, Ye F, Garcia-Verdugo JM, Nachury MV (2017) An Actin Network Dispatches Ciliary GPCRs into Extracellular Vesicles to Modulate Signaling. *Cell* 168(1–2):252–263.e14.
- Naito H, Iba T, Wakabayashi T, Tai-Nagara I, Suehiro J-I, Jia W, Eino D, Sakimoto S, Muramatsu F, Kidoya H, Sakurai H, Satoh T, Akira S, Kubota Y, Takakura N (2019) TAK1 Prevents Endothelial Apoptosis and Maintains Vascular Integrity. *Dev Cell* 48(2):151–166.e7.
- Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, Williams E, Vassilev P, Li X, Elia AEH, Lu W, Brown EM, Quinn SJ, Ingber DE, Zhou J (2003) Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet* 33(2):129–137.
- Njock M-S, Cheng HS, Dang LT, Nazari-Jahantigh M, Lau AC, Boudreau E, Roufaiel M, Cybulsky MI, Schober A, Fish JE (2015) Endothelial cells suppress monocyte activation through secretion of extracellular vesicles containing antiinflammatory microRNAs. *Blood* 125(20):3202–3212.
- Nonaka S, Tanaka Y, Okada Y, Takeda S, Harada A, Kanai Y, Kido M, Hirokawa N (1998) Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell* 95(6):829–837.
- Ogawa Y, Miura Y, Harazono A, Kanai-Azuma M, Akimoto Y, Kawakami H, Yamaguchi T, Toda T, Endo T, Tsubuki M, Yanoshita R (2011) Proteomic analysis of two types of exosomes in human whole saliva. *Biol Pharm Bull* 34(1):13–23.
- Ojeda Naharros I, Nachury MV (2022) Shedding of ciliary vesicles at a glance. *Journal of Cell Science* 135(19):jcs246553.
- Orsenigo F, Giampietro C, Ferrari A, Corada M, Galaup A, Sigismund S, Ristagno G, Maddaluno L, Young Koh G, Franco D, Kurtcuoglu V, Poulidakos D, Baluk P, McDonald D, Grazia Lampugnani M, Dejana E (2012) Phosphorylation of VE-cadherin is modulated by haemodynamic forces and contributes to the regulation of vascular permeability in vivo. *Nat Commun* 3:1208.
- Ou G, E. Blacque O, Snow JJ, Leroux MR, Scholey JM (2005) Functional coordination of intraflagellar transport motors. *Nature* 436(7050):583–587.
- Ousmaal MEF, Gaceb A, Khene MA, Ainouz L, Giaimis J, Andriantsitohaina R, Martínez MC, Baz A (2020) Circulating microparticles released during dyslipidemia may exert deleterious effects on blood vessels and endothelial function. *Journal of Diabetes and its Complications* 34(10):107683.
- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327(6122):524–526.
- Park K-H, Park WJ (2015) Endothelial Dysfunction: Clinical Implications in Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches. *J Korean Med Sci* 30(9):1213–1225.
- Parolini I, Federici C, Raggi C, Lugini L, Palleschi S, De Milito A, Coscia C, Iessi E, Logozzi M, Molinari A, Colone M, Tatti M, Sargiacomo M, Fais S (2009) Microenvironmental pH Is a Key Factor for Exosome Traffic in Tumor Cells. *J Biol Chem* 284(49):34211–34222.
- Pazour GJ, Dickert BL, Vucica Y, Seeley ES, Rosenbaum JL, Witman GB, Cole DG (2000) Chlamydomonas IFT88 and Its Mouse Homologue, Polycystic Kidney Disease Gene Tg737, Are Required for Assembly of Cilia and Flagella. *J Cell Biol* 151(3):709–718

- Pazour GJ, San Agustin JT, Follit JA, Rosenbaum JL, Witman GB (2002) Polycystin-2 localizes to kidney cilia and the ciliary level is elevated in orpk mice with polycystic kidney disease. *Curr Biol* 12(11):R378-380.
- Pazour GJ, Wilkerson CG, Witman GB (1998) A Dynein Light Chain Is Essential for the Retrograde Particle Movement of Intraflagellar Transport (IFT). *Journal of Cell Biology* 141(4):979–992.
- Pedersen LB, Veland IR, Schrøder JM, Christensen ST (2008) Assembly of primary cilia. *Developmental Dynamics* 237(8):1993–2006.
- Perdomo L, Vidal-Gómez X, Soleti R, Vergori L, Duluc L, Chwastyniak M, Bissierier M, Lay SL, Villard A, Simard G, Meilhac O, Lezoualc'h F, Khantaline I, Veerapen R, Dubois S, Boursier J, Henni S, Gagnadoux F, Pinet F, Andriantsitohaina R, Martínez MC (2020) Large Extracellular Vesicle-Associated Rap1 Accumulates in Atherosclerotic Plaques, Correlates With Vascular Risks and Is Involved in Atherosclerosis. *Circ Res* 127(6):747–760.
- Peterson DB, Sander T, Kaul S, Wakim BT, Halligan B, Twigger S, Pritchard KA, Oldham KT, Ou J-S (2008) Comparative proteomic analysis of PAI-1 and TNF-alpha-derived endothelial microparticles. *Proteomics* 8(12):2430–2446.
- Pfister KK, Fisher EMC, Gibbons IR, Hays TS, Holzbaur ELF, McIntosh JR, Porter ME, Schroer TA, Vaughan KT, Witman GB, King SM, Vallee RB (2005) Cytoplasmic dynein nomenclature. *J Cell Biol* 171(3):411–413.
- Phua SC, Chiba S, Suzuki M, Su E, Roberson EC, Pusapati GV, Setou M, Rohatgi R, Reiter JF, Ikegami K, Inoue T (2017) Dynamic remodeling of membrane composition drives cell cycle through primary cilia excision. *Cell* 168(1–2):264-279.e15.
- Pigino G (2021) Intraflagellar transport. *Current Biology* 31(10):R530–R536.
- Piquet M, Martínez MC, Romacho T (2022) Inter-Organ Crosstalk in the Development of Obesity-Associated Insulin Resistance. *Handb Exp Pharmacol* 274:205–226.
- Pisitkun T, Shen R-F, Knepper MA (2004) Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(36):13368–13373.
- Pitaval A, Senger F, Letort G, Gidrol X, Guyon L, Sillibourne J, Théry M (2017) Microtubule stabilization drives 3D centrosome migration to initiate primary ciliogenesis. *J Cell Biol* 216(11):3713–3728.
- Pletcher MJ, Tice JA, Pignone M, Browner WS (2004) Using the coronary artery calcium score to predict coronary heart disease events: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med* 164(12):1285–1292.
- Pober JS, Sessa WC (2007) Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol* 7(10):803–815.
- Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P (2011) Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* 146(6):873–887.
- Praetorius HA, Spring KR (2005) A physiological view of the primary cilium. *Annu Rev Physiol* 67:515–529.
- Prosseda PP, Luo N, Wang B, Alvarado JA, Hu Y, Sun Y (2017) Loss of OCRL increases ciliary PI(4,5)P2 in Lowe oculocerebrorenal syndrome. *J Cell Sci* 130(20):3447–3454.
- Pugacheva EN, Jablonski SA, Hartman TR, Henske EP, Golemis EA (2007) HEF1-dependent Aurora A activation induces disassembly of the primary cilium. *Cell* 129(7):1351–1363.

- Radomski MW, Moncada S (1993) The biological and pharmacological role of nitric oxide in platelet function. *Adv Exp Med Biol* 344:251–264.
- Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, Ratajczak MZ (2006) Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* 20(5):847–856.
- Record M, Carayon K, Poirot M, Silvente-Poirot S (2014) Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiological processes. *Biochim Biophys Acta* 1841(1):108–120.
- Reho JJ, Guo D-F, Morgan DA, Rahmouni K (2019) Smooth Muscle Cell-Specific Disruption of the BBSome Causes Vascular Dysfunction. *Hypertension* 74(4):817–825.
- Reiter JF, Blacque OE, Leroux MR (2012) The base of the cilium: roles for transition fibres and the transition zone in ciliary formation, maintenance and compartmentalization. *EMBO Rep* 13(7):608–618.
- Reiter JF, Leroux MR (2017) Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18(9):533–547.
- Remuzzi A, Dewey CF, Davies PF, Gimbrone MA (1984) Orientation of endothelial cells in shear fields in vitro. *Biorheology* 21(4):617–630.
- Ren L, Han F, Xuan L, Lv Y, Gong L, Yan Y, Wan Z, Guo L, Liu H, Xu B, Sun Y, Yang S, Liu L (2019) Clusterin ameliorates endothelial dysfunction in diabetes by suppressing mitochondrial fragmentation. *Free Radic Biol Med* 145:357–373.
- Ribeiro-Rodrigues TM, Laundos TL, Pereira-Carvalho R, Batista-Almeida D, Pereira R, Coelho-Santos V, Silva AP, Fernandes R, Zuzarte M, Enguita FJ, Costa MC, Pinto-do-Ó P, Pinto MT, Gouveia P, Ferreira L, Mason JC, Pereira P, Kwak BR, Nascimento DS, Girão H (2017) Exosomes secreted by cardiomyocytes subjected to ischaemia promote cardiac angiogenesis. *Cardiovascular Research* 113(11):1338–1350.
- Riobó NA, Lu K, Ai X, Haines GM, Emerson CP (2006) Phosphoinositide 3-kinase and Akt are essential for Sonic Hedgehog signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(12):4505–4510.
- Rocha C, Papon L, Cacheux W, Marques Sousa P, Lascano V, Tort O, Giordano T, Vacher S, Lemmers B, Mariani P, Meseure D, Medema JP, Bièche I, Hahne M, Janke C (2014) Tubulin glycosylases are required for primary cilia, control of cell proliferation and tumor development in colon. *EMBO J* 33(19):2247–2260.
- Rome S (2019) Biological properties of plant-derived extracellular vesicles. *Food Funct* 10(2):529–538.
- Rowe I, Chiaravalli M, Mannella V, Ulisse V, Quilici G, Pema M, Song XW, Xu H, Mari S, Qian F, Pei Y, Musco G, Boletta A (2013) Defective Glucose Metabolism in Polycystic Kidney Disease Identifies A Novel Therapeutic Paradigm. *Nat Med* 19(4):488–493.
- Saksena S, Wahlman J, Teis D, Johnson AE, Emr SD (2009) Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly. *Cell* 136(1):97–109.
- Sánchez I, Dynlacht BD (2016) Cilium assembly and disassembly. *Nat Cell Biol* 18(7):711–717.
- Sánchez-Duffhues G, de Vinuesa AG, Lindeman JH, Mulder-Stapel A, DeRuiter MC, Van Munsteren C, Goumans M-J, Hierck BP, Ten Dijke P (2015) SLUG is expressed in endothelial cells lacking primary cilia to promote cellular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35(3):616–627.

- Sastry SK, Horwitz AF (1993) Integrin cytoplasmic domains: mediators of cytoskeletal linkages and extra- and intracellular initiated transmembrane signaling. *Curr Opin Cell Biol* 5(5):819–831.
- Satir P, Christensen ST (2007) Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annu Rev Physiol* 69:377–400.
- Schermer B, Benzing T (2016) Endothelial cilia protect against atherosclerosis. *EMBO Rep* 17(2):125–126.
- Schlienger S, Campbell S, Claing A (2014) ARF1 regulates the Rho/MLC pathway to control EGF-dependent breast cancer cell invasion. *Mol Biol Cell* 25(1):17–29.
- Schöneberg J, Lee I-H, Iwasa JH, Hurley JH (2017) Reverse-topology membrane scission by the ESCRT complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18(1):5–17.
- Schulz E, Wenzel P, Münzel T, Daiber A (2014) Mitochondrial redox signaling: Interaction of mitochondrial reactive oxygen species with other sources of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 20(2):308–324.
- Schwartz SM, Virmani R, Rosenfeld ME (2000) The good smooth muscle cells in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2(5):422–429.
- Seo S, Baye LM, Schulz NP, Beck JS, Zhang Q, Slusarski DC, Sheffield VC (2010) BBS6, BBS10, and BBS12 form a complex with CCT/TRiC family chaperonins and mediate BBSome assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(4):1488–1493.
- Seo S, Guo D-F, Bugge K, Morgan DA, Rahmouni K, Sheffield VC (2009) Requirement of Bardet-Biedl syndrome proteins for leptin receptor signaling. *Hum Mol Genet* 18(7):1323–1331.
- Seo S, Zhang Q, Bugge K, Breslow DK, Searby CC, Nachury MV, Sheffield VC (2011) A Novel Protein LZTFL1 Regulates Ciliary Trafficking of the BBSome and Smoothed. *PLoS Genet* 7(11):e1002358.
- Shahraki K, Boroumand PG, Lotfi H, Radnia F, Shahriari H, Sargazi S, Mortazavi SS, Shirvaliloo M, Shirvalilou S, Sheervalilou R (2023) An update in the applications of exosomes in cancer theranostics: from research to clinical trials. *J Cancer Res Clin Oncol* 149(10):8087–8116.
- Shang F, Wang S-C, Hsu C-Y, Miao Y, Martin M, Yin Y, Wu C-C, Wang Y-T, Wu G, Chien S, Huang H-D, Tarng D-C, Shiu Y-T, Cheung AK, Huang P-H, Chen Z, Shyy JY-J (2017) MicroRNA-92a Mediates Endothelial Dysfunction in CKD. *J Am Soc Nephrol* 28(11):3251–3261.
- Sheffield VC (2010) The Blind Leading the Obese: The Molecular Pathophysiology of a Human Obesity Syndrome. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 121:172–182
- Shelke GV, Lässer C, Gho YS, Lötvall J (2014) Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum. *J Extracell Vesicles* 3:10.3402/jev.v3.24783.
- Silva M, Morsci N, Nguyen KCQ, Rizvi A, Rongo C, Hall DH, Barr MM (2017) Cell-specific α -tubulin isotype regulates ciliary microtubule ultrastructure, intraflagellar transport, and extracellular vesicle biology. *Curr Biol* 27(7):968–980.
- Sinauridze EI, Kireev DA, Popenko NY, Pichugin AV, Panteleev MA, Krymskaya OV, Ataulakhanov FI (2007) Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb Haemost* 97(3):425–434
- Skriner K, Adolph K, Jungblut PR, Burmester GR (2006) Association of citrullinated proteins with synovial exosomes. *Arthritis Rheum* 54(12):3809–3814.

- Sluijmer JC, Kolodgie FD, Bijnens APJJ, Maxfield K, Pacheco E, Kutys B, Duimel H, Frederik PM, van Hinsbergh VWM, Virmani R, Daemen MJAP (2009) Thin-walled microvessels in human coronary atherosclerotic plaques show incomplete endothelial junctions: relevance of compromised structural integrity for intraplaque microvascular leakage. *J Am Coll Cardiol* 53(17):1517–1527.
- Soleti R, Benameur T, Porro C, Panaro MA, Andriantsitohaina R, Martínez MC (2009) Microparticles harboring Sonic Hedgehog promote angiogenesis through the upregulation of adhesion proteins and proangiogenic factors. *Carcinogenesis* 30(4):580–588.
- Soleti R, Lauret E, Andriantsitohaina R, Carmen Martínez M (2012) Internalization and induction of antioxidant messages by microvesicles contribute to the antiapoptotic effects on human endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 53(11):2159–2170.
- Sorokin S (1962) CENTRIOLES AND THE FORMATION OF RUDIMENTARY CILIA BY FIBROBLASTS AND SMOOTH MUSCLE CELLS. *J Cell Biol* 15(2):363–377
- Sorokin SP (1968) Reconstructions of centriole formation and ciliogenesis in mammalian lungs. *Journal of Cell Science* 3(2):207–230.
- STEINMAN RM, MELLMAN IS, MULLER WA, COHN ZA (1983) Endocytosis and the recycling of plasma membrane. *J Cell Biol* 96(1):1–27
- Stepanek L, Pigino G (2016) Microtubule doublets are double-track railways for intraflagellar transport trains. *Science* 352(6286):721–724.
- Steff DW, Ou J, Ackerman AW, Welak S, Klick D, Pritchard KA (2002) Native LDL and minimally oxidized LDL differentially regulate superoxide anion in vascular endothelium in situ. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 283(2):H750–H759.
- Stojanović SD, Fiedler J, Bauersachs J, Thum T, Sedding DG (2020) Senescence-induced inflammation: an important player and key therapeutic target in atherosclerosis. *Eur Heart J* 41(31):2983–2996.
- Strijdom H, Lochner A (2009) Cardiac endothelium: More than just a barrier. *SA Heart Journal* 6(3):174–185.
- Stuehr DJ (1997) Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:339–359.
- Stuffers S, Sem Wegner C, Stenmark H, Brech A (2009) Multivesicular Endosome Biogenesis in the Absence of ESCRTs. *Traffic* 10(7):925–937.
- Su X, Driscoll K, Yao G, Raed A, Wu M, Beales PL, Zhou J (2014) Bardet–Biedl syndrome proteins 1 and 3 regulate the ciliary trafficking of polycystic kidney disease 1 protein. *Hum Mol Genet* 23(20):5441–5451.
- Sun L, Liu Y-L, Ye F, Xie J-W, Zeng J-W, Qin L, Xue J, Wang Y-T, Guo K-M, Ma M-M, Tang Y-B, Li X-Y, Gao M (2019) Free fatty acid-induced H₂O₂ activates TRPM2 to aggravate endothelial insulin resistance via Ca²⁺-dependent PERK/ATF4/TRB3 cascade in obese mice. *Free Radic Biol Med* 143:288–299.
- Takahashi A, Okada R, Nagao K, Kawamata Y, Hanyu A, Yoshimoto S, Takasugi M, Watanabe S, Kanemaki MT, Obuse C, Hara E (2017) Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells. *Nat Commun* 8:15287.
- Takao D, Yamamoto S, Kitagawa D (2019) A theory of centriole duplication based on self-organized spatial pattern formation. *J Cell Biol* 218(11):3537–3547.

- Takizawa F, Tsuji S, Nagasawa S (1996) Enhancement of macrophage phagocytosis upon iC3b deposition on apoptotic cells. *FEBS Lett* 397(2–3):269–272.
- Taschner M, Bhogaraju S, Lorentzen E (2012) Architecture and function of IFT complex proteins in ciliogenesis. *Differentiation* 83(2):S12–S22.
- Tedgui A, Mallat Z (2001) Apoptosis as a determinant of atherothrombosis. *Thromb Haemost* 86(1):420–426
- Thakur BK, Zhang H, Becker A, Matei I, Huang Y, Costa-Silva B, Zheng Y, Hoshino A, Brazier H, Xiang J, Williams C, Rodriguez-Barrueco R, Silva JM, Zhang W, Hearn S, Elemento O, Paknejad N, Manova-Todorova K, Welte K, Bromberg J, Peinado H, Lyden D (2014) Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Research* 24(6):766.
- Théry C, Boussac M, Véron P, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Garin J, Amigorena S (2001) Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol* 166(12):7309–7318.
- Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, Antoniou A, Arab T, Archer F, Atkin-Smith GK, Ayre DC, Bach J-M, Bachurski D, Baharvand H, Balaj L, Baldacchino S, Bauer NN, Baxter AA, Bebawy M, Beckham C, Bedina Zavec A, Benmoussa A, Berardi AC, Bergese P, Bielska E, Blenkiron C, Bobis-Wozowicz S, Boilard E, Boireau W, Bongiovanni A, Borràs FE, Bosch S, Boulanger CM, Breakefield X, Breglio AM, Brennan MÁ, Brigstock DR, Brisson A, Broekman ML, Bromberg JF, Bryl-Górecka P, Buch S, Buck AH, Burger D, Busatto S, Buschmann D, Bussolati B, Buzás EI, Byrd JB, Camussi G, Carter DR, Caruso S, Chamley LW, Chang Y-T, Chen C, Chen S, Cheng L, Chin AR, Clayton A, Clerici SP, Cocks A, Cocucci E, Coffey RJ, Cordeiro-da-Silva A, Couch Y, Coumans FA, Coyle B, Crescitelli R, Criado MF, D'Souza-Schorey C, Das S, Datta Chaudhuri A, de Candia P, De Santana EF, De Wever O, Del Portillo HA, Demaret T, Deville S, Devitt A, Dhondt B, Di Vizio D, Dieterich LC, Dolo V, Dominguez Rubio AP, Dominici M, Dourado MR, Driedonks TA, Duarte FV, Duncan HM, Eichenberger RM, Ekström K, El Andaloussi S, Elie-Caille C, Erdbrügger U, Falcón-Pérez JM, Fatima F, Fish JE, Flores-Bellver M, Försonits A, Frelet-Barrand A, Fricke F, Fuhrmann G, Gabrielsson S, Gámez-Valero A, Gardiner C, Gärtner K, Gaudin R, Gho YS, Giebel B, Gilbert C, Gimona M, Giusti I, Goberdhan DC, Görgens A, Gorski SM, Greening DW, Gross JC, Gualerzi A, Gupta GN, Gustafson D, Handberg A, Haraszi RA, Harrison P, Hegyesi H, Hendrix A, Hill AF, Hochberg FH, Hoffmann KF, Holder B, Holthofer H, Hosseinkhani B, Hu G, Huang Y, Huber V, Hunt S, Ibrahim AG-E, Ikezu T, Inal JM, Isin M, Ivanova A, Jackson HK, Jacobsen S, Jay SM, Jayachandran M, Jenster G, Jiang L, Johnson SM, Jones JC, Jong A, Jovanovic-Talisman T, Jung S, Kalluri R, Kano S-I, Kaur S, Kawamura Y, Keller ET, Khamari D, Khomyakova E, Khvorova A, Kierulf P, Kim KP, Kislinger T, Klingeborn M, Klinker DJ, Kornek M, Kosanović MM, Kovács ÁF, Krämer-Albers E-M, Krasemann S, Krause M, Kurochkin IV, Kusuma GD, Kuypers S, Laitinen S, Langevin SM, Languino LR, Lannigan J, Lässer C, Laurent LC, Lavieu G, Lázaro-Ibáñez E, Le Lay S, Lee M-S, Lee YXF, Lemos DS, Lenassi M, Leszczynska A, Li IT, Liao K, Libregts SF, Ligeti E, Lim R, Lim SK, Linē A, Linnemannstöns K, Llorente A, Lombard CA, Lorenowicz MJ, Lörincz ÁM, Lötvall J, Lovett J, Lowry MC, Loyer X, Lu Q, Lukomska B, Lunavat TR, Maas SL, Malhi H, Marcilla A, Mariani J, Mariscal J, Martens-Uzunova ES, Martin-Jaular L, Martinez MC, Martins VR, Mathieu M, Mathivanan S, Maugeri M, McGinnis LK, McVey MJ, Meckes DG, Meehan KL, Mertens I, Minciacci VR, Möller A, Møller Jørgensen M, Morales-Kastresana A, Morhayim J, Mullier F, Muraca M, Musante L, Mussack V, Muth DC, Myburgh KH, Najrana T, Nawaz M, Nazarenko I, Nejsum P, Neri C, Neri T, Nieuwland R, Nimrichter L, Nolan JP, Nolte-'t Hoen EN, Noren Hooten N, O'Driscoll L, O'Grady T, O'Loughlin A, Ochiya T, Olivier M, Ortiz A, Ortiz LA, Osteikoetxea X, Østergaard O, Ostrowski M, Park J, Pegtel DM, Peinado H, Perut F, Pfaffl MW, Phinney DG, Pieters BC, Pink RC, Pisetsky DS, Pogge von Strandmann E, Polakovicova I, Poon IK, Powell BH, Prada I, Pulliam L, Quesenberry P, Radeghieri A, Raffai RL, Raimondo S, Rak J, Ramirez MI, Raposo G,

Rayyan MS, Regev-Rudzki N, Ricklefs FL, Robbins PD, Roberts DD, Rodrigues SC, Rohde E, Rome S, Rouschop KM, Rughetti A, Russell AE, Saá P, Sahoo S, Salas-Huenuleo E, Sánchez C, Saugstad JA, Saul MJ, Schiffelers RM, Schneider R, Schøyen TH, Scott A, Shahaj E, Sharma S, Shatnyeva O, Shekari F, Shelke GV, Shetty AK, Shiba K, Siljander PR-M, Silva AM, Skowronek A, Snyder OL, Soares RP, Sódar BW, Soekmadji C, Sotillo J, Stahl PD, Stoorvogel W, Stott SL, Strasser EF, Swift S, Tahara H, Tewari M, Timms K, Tiwari S, Tixeira R, Tkach M, Toh WS, Tomasini R, Torrecilhas AC, Tosar JP, Toxavidis V, Urbanelli L, Vader P, van Balkom BW, van der Grein SG, Van Deun J, van Herwijnen MJ, Van Keuren-Jensen K, van Niel G, van Royen ME, van Wijnen AJ, Vasconcelos MH, Vechetti IJ, Veit TD, Vella LJ, Velot É, Verweij FJ, Vestad B, Viñas JL, Visnovitz T, Vukman KV, Wahlgren J, Watson DC, Wauben MH, Weaver A, Webber JP, Weber V, Wehman AM, Weiss DJ, Welsh JA, Wendt S, Wheelock AM, Wiener Z, Witte L, Wolfram J, Xagorari A, Xander P, Xu J, Yan X, Yáñez-Mó M, Yin H, Yuana Y, Zappulli V, Zarubova J, Žekas V, Zhang J-Y, Zhao Z, Zheng L, Zheutlin AR, Zickler AM, Zimmermann P, Zivkovic AM, Zocco D, Zuba-Surma EK (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(1):1535750.

Tkach M, Kowal J, Zucchetti AE, Enserink L, Jouve M, Lankar D, Saitakis M, Martin-Jaular L, Théry C (2017) Qualitative differences in T-cell activation by dendritic cell-derived extracellular vesicle subtypes. *EMBO J* 36(20):3012–3028.

Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, Schwille P, Brügger B, Simons M (2008) Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes. *Science* 319(5867):1244–1247.

Tucker RW, Pardee AB, Fujiwara K (1979) Centriole ciliation is related to quiescence and DNA synthesis in 3T3 cells. *Cell* 17(3):527–535.

Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9(6):654–659.

van der Goot FG, Gruenberg J (2006) Intra-endosomal membrane traffic. *Trends Cell Biol* 16(10):514–521.

Van der Heiden K, Groenendijk BCW, Hierck BP, Hogers B, Koerten HK, Mommaas AM, Gittenberger-de Groot AC, Poelmann RE (2006) Monocilia on chicken embryonic endocardium in low shear stress areas. *Developmental Dynamics* 235(1):19–28.

Van der Heiden K, Hierck BP, Krams R, de Crom R, Cheng C, Baiker M, Pourquie MJBM, Alkemade FE, DeRuiter MC, Gittenberger-de Groot AC, Poelmann RE (2008) Endothelial primary cilia in areas of disturbed flow are at the base of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 196(2):542–550.

van Niel G, Charrin S, Simoes S, Romao M, Rochin L, Saftig P, Marks MS, Rubinstein E, Raposo G (2011) The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Dev Cell* 21(4):708–721.

van Niel G, D'Angelo G, Raposo G (2018) Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19(4):213–228.

Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martíásek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, Pritchard KA (1998) Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(16):9220–9225.

Vietri M, Radulovic M, Stenmark H (2020) The many functions of ESCRTs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21(1):25–42.

- Villalpando-Rodriguez GE, Gibson SB (2021) Reactive Oxygen Species (ROS) Regulates Different Types of Cell Death by Acting as a Rheostat. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2021:e9912436.
- Vinay L, Belleannée C (2022) EV duty vehicles: Features and functions of ciliary extracellular vesicles. *Front Genet* 13:916233.
- Vion A-C, Ramkhelawon B, Loyer X, Chironi G, Devue C, Loirand G, Tedgui A, Lehoux S, Boulanger CM (2013) Shear Stress Regulates Endothelial Microparticle Release. *Circulation Research* 112(10):1323–1333.
- Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Finn AV, Gold HK, Tulenko TN, Wrenn SP, Narula J (2005) Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(10):2054–2061.
- Volz A-K, Frei A, Kretschmer V, de Jesus Domingues AM, Ketting RF, Ueffing M, Boldt K, Krämer-Albers E-M, May-Simera HL (2021) Bardet-Biedl syndrome proteins modulate the release of bioactive extracellular vesicles. *Nat Commun* 12:5671.
- Walczak CE, Gayek S, Ohi R (2013) Microtubule-depolymerizing kinesins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 29:417–441.
- Walker RV, Keynton JL, Grimes DT, Sreekumar V, Williams DJ, Esapa C, Wu D, Knight MM, Norris DP (2019) Ciliary exclusion of Polycystin-2 promotes kidney cystogenesis in an autosomal dominant polycystic kidney disease model. *Nat Commun* 10:4072.
- Wan KY (2018) Coordination of eukaryotic cilia and flagella. *Essays Biochem* 62(6):829–838.
- Wang G, Hu H-B, Chang Y, Huang Y, Song Z-Q, Zhou S-B, Chen L, Zhang Y-C, Wu M, Tu H-Q, Yuan J-F, Wang N, Pan X, Li A-L, Zhou T, Zhang X-M, He K, Li H-Y (2019) Rab7 regulates primary cilia disassembly through cilia excision. *Journal of Cell Biology* 218(12):4030–4041.
- Wang J, Silva M, Haas L, Morsci N, Nguyen KCQ, Hall DH, Barr MM (2014a) *C. elegans* ciliated sensory neurons release extracellular vesicles that function in animal communication. *Curr Biol* 24(5):519–525.
- Wang Q, Lu Q (2017) Plasma membrane-derived extracellular microvesicles mediate non-canonical intercellular NOTCH signaling. *Nat Commun* 8:709.
- Wang S, Zhang M, Liang B, Xu J, Xie Z, Liu C, Viollet B, Yan D, Zou M-H (2010) AMPK α 2 deletion causes aberrant expression and activation of NAD(P)H oxidase and consequent endothelial dysfunction in vivo: role of 26S proteasomes. *Circ Res* 106(6):1117–1128.
- Wang W, Wu T, Kirschner MW (2014b) The master cell cycle regulator APC-Cdc20 regulates ciliary length and disassembly of the primary cilium. *eLife* 3:e03083.
- Wang W-J, Tay HG, Soni R, Perumal GS, Goll MG, Macaluso FP, Asara JM, Amack JD, Tsou M-FB (2013) CEP162 is an axoneme-recognition protein promoting ciliary transition zone assembly at the cilia base. *Nat Cell Biol* 15(6):591–601.
- Watanabe T, Tokunaga O, Fan JL, Shimokama T (1989) Atherosclerosis and macrophages. *Acta Pathol Jpn* 39(8):473–486.
- Wei Q, Zhang Y, Li Y, Zhang Q, Ling K, Hu J (2012) The BBSome controls IFT assembly and turnaround in cilia. *Nat Cell Biol* 14(9):950–957.
- Wilson KF, Erickson JW, Antonyak MA, Cerione RA (2013) Rho GTPases and their roles in cancer metabolism. *Trends Mol Med* 19(2):74–82.

- Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvall J, Nolte-t Hoen EN, Piper MG, Sivaraman S, Skog J, Théry C, Wauben MH, Hochberg F (2013) Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles* 2:10.3402/jev.v2i0.20360.
- Wloga D, Dave D, Meagley J, Rogowski K, Jerka-Dziadosz M, Gaertig J (2010) Hyperglutamylolation of Tubulin Can either Stabilize or Destabilize Microtubules in the Same Cell. *Eukaryot Cell* 9(1):184–193.
- Wloga D, Joachimiak E, Louka P, Gaertig J (2017) Posttranslational Modifications of Tubulin and Cilia. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9(6):a028159.
- Wloga D, Webster DM, Rogowski K, Bré M-H, Levilliers N, Jerka-Dziadosz M, Janke C, Dougan ST, Gaertig J (2009) TTLL3 Is a tubulin glycine ligase that regulates the assembly of cilia. *Dev Cell* 16(6):867–876.
- Wood CR, Huang K, Diener DR, Rosenbaum JL (2013) The Cilium Secretes Bioactive Ectosomes. *Current Biology* 23(10):906–911.
- Xiao Y, Xia J, Cheng J, Huang H, Zhou Y, Yang X, Su X, Ke Y, Ling W (2019) Inhibition of S-Adenosylhomocysteine Hydrolase Induces Endothelial Dysfunction via Epigenetic Regulation of p66shc-Mediated Oxidative Stress Pathway. *Circulation* 139(19):2260–2277.
- Xu S, Xu Y, Liu P, Zhang S, Liu H, Slavin S, Kumar S, Koroleva M, Luo J, Wu X, Rahman A, Pelisek J, Jo H, Si S, Miller CL, Jin ZG (2019) The novel coronary artery disease risk gene JCAD/KIAA1462 promotes endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Eur Heart J* 40(29):2398–2408.
- Xu Y, Jiang W, Zhong L, Li H, Bai L, Chen X, Lin Y, Zheng D (2020) miR-195-5p alleviates acute kidney injury through repression of inflammation and oxidative stress by targeting vascular endothelial growth factor A. *Aging (Albany NY)* 12(11):10235–10245.
- Yalcin Enis I, Gok Sadikoglu T (2018) Design parameters for electrospun biodegradable vascular grafts. *Journal of Industrial Textiles* 47(8):2205–2227.
- Yang H, Huang K (2020) Dissecting the Vesicular Trafficking Function of IFT Subunits. *Front Cell Dev Biol* 7:352.
- Yang Y, Tian T, Wang Y, Li Z, Xing K, Tian G (2019) SIRT6 protects vascular endothelial cells from angiotensin II-induced apoptosis and oxidative stress by promoting the activation of Nrf2/ARE signaling. *Eur J Pharmacol* 859:172516.
- Yee LE, Garcia-Gonzalo FR, Bowie RV, Li C, Kennedy JK, Ashrafi K, Blacque OE, Leroux MR, Reiter JF (2015) Conserved Genetic Interactions between Ciliopathy Complexes Cooperatively Support Ciliogenesis and Ciliary Signaling. *PLoS Genet* 11(11):e1005627.
- Yoder BK, Hou X, Guay-Woodford LM (2002) The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia. *J Am Soc Nephrol* 13(10):2508–2516.
- Yu I, Garnham CP, Roll-Mecak A (2015) Writing and Reading the Tubulin Code. *J Biol Chem* 290(28):17163–17172.
- Yu L, Liang Q, Zhang W, Liao M, Wen M, Zhan B, Bao H, Cheng X (2019) HSP22 suppresses diabetes-induced endothelial injury by inhibiting mitochondrial reactive oxygen species formation. *Redox Biol* 21:101095.
- Yue S, Tang L-Y, Tang Y, Tang Y, Shen Q-H, Ding J, Chen Y, Zhang Z, Yu T-T, Zhang YE, Cheng SY (2014) Requirement of Smurf-mediated endocytosis of Patched1 in sonic hedgehog signal reception. *eLife* 3:e02555.

- Zaghloul NA, Katsanis N (2009) Mechanistic insights into Bardet-Biedl syndrome, a model ciliopathy. *J Clin Invest* 119(3):428–437.
- Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, Denecke B, Hristov M, Köppel T, Jahantigh MN, Lutgens E, Wang S, Olson EN, Schober A, Weber C (2009) Delivery of MicroRNA-126 by Apoptotic Bodies Induces CXCL12-Dependent Vascular Protection. *Science Signaling* 2(100):ra81–ra81.
- Zhang H-G, Liu C, Su K, Yu S, Zhang L, Zhang S, Wang J, Cao X, Grizzle W, Kimberly RP (2006) A membrane form of TNF-alpha presented by exosomes delays T cell activation-induced cell death. *J Immunol* 176(12):7385–7393.
- Zhang Y, Liu D, Chen X, Li J, Li L, Bian Z, Sun F, Lu J, Yin Y, Cai X, Sun Q, Wang K, Ba Y, Wang Q, Wang D, Yang J, Liu P, Xu T, Yan Q, Zhang J, Zen K, Zhang C-Y (2010) Secreted Monocytic miR-150 Enhances Targeted Endothelial Cell Migration. *Molecular Cell* 39(1):133–144.
- Zhao Y, Rahmouni K (2022) BBSome: A New Player in Hypertension and Other Cardiovascular Risks. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)* 79(2):303.
- Zimmerman B, Kelly B, McMillan BJ, Seegar TCM, Dror RO, Kruse AC, Blacklow SC (2016) Crystal Structure of a Full-Length Human Tetraspanin Reveals a Cholesterol-Binding Pocket. *Cell* 167(4):1041-1051.e11.
- Observations, communicated to the publisher by Mr. Antony van Leewenhoek, in a dutch letter of the 9th Octob. 1676. here English'd: concerning little animals by him observed in rain-well-sea- and snow water; as also in water wherein pepper had lain infused.

Annexe



Inter-Organ Crosstalk in the Development of Obesity-Associated Insulin Resistance

Megan Piquet, M. Carmen Martínez, and Tania Romacho

Contents

- 1 From Obesity to Diabetes: The Role of Inter-Organ Crosstalk
 - 2 Mediators of Communication: Soluble Factors of Inter-Organ Crosstalk
 - 2.1 Adipokines
 - 2.2 Myokines and Hepatokines: Toward the Organokine Concept
 - 2.3 EVs as Shuttle of Biological Information
 - 2.4 Other Circulating Messengers (miRNA, lncRNA, Fatty Acids)
 - 3 Organ Crosstalk
 - 3.1 AT-Liver Crosstalk
 - 3.2 AT-Skeletal Muscle Crosstalk
 - 3.3 AT-Pancreas Crosstalk
 - 3.4 Interaction Between AT and the Cardiovascular System
 - 3.5 Interaction Between Gut Microbiota, Liver, and AT
 - 4 Perspective: Taming Inter-Organ Mediators to Control Obesity?
- References

Abstract

The epidemics of obesity and type 2 diabetes have led to intensive investigation of the underlying mechanisms of these diseases and their main complications such as cardiovascular diseases and non-alcoholic fatty liver disease. This search has contributed to better understand how organs and tissues communicate with each other in the so-called inter-organ crosstalk. Adipose tissue, the liver, or skeletal muscle can actively release secreted factors termed “organokines” which

M. Piquet · M. C. Martínez
SOPAM, U1063, INSERM, UNIV Angers, SFR ICAT, Angers, France

T. Romacho (✉)
Institute of Clinical Diabetology, German Diabetes Center, Leibniz Center for Diabetes Research at Heinrich Heine University Düsseldorf, Düsseldorf, Germany
e-mail: tania.romacho@ddz.de

© The Author(s), under exclusive license to Springer Nature Switzerland AG 2021
Handbook of Experimental Pharmacology, https://doi.org/10.1007/164_2021_564

can interact with other distant targets in complex networks. More recently, other novel mediators of inter-organ crosstalk such as extracellular vesicles and their non-traditional cargoes as miRNAs and lncRNAs are gaining importance and represent potential therapeutic targets. In the present chapter we summarize some of the current knowledge on inter-organ communication with a focus on adipose tissue-released factors and their modulation on other organs and tissues like pancreas, liver, skeletal muscle, the cardiovascular system, and the gut in the context of obesity and its progression to insulin resistance. We also provide a perspective on mediators of inter-organ crosstalk as potential therapeutic targets.

Keywords

Crosstalk · Organokines · Insulin resistance · Obesity · Type 2 diabetes

Abbreviations

| | |
|----------------|---|
| AMPK | AMP-activated protein kinase |
| ASC | Adipose-derived stem cell |
| AT | Adipose tissue |
| ATPase 2a | Adenosine triphosphatase 2a |
| BMI | Body mass index |
| DPP4 | Dipeptidyl peptidase-4 |
| eNamt | Visfatin/nicotinamide phosphoribosyltransferase |
| eNOS | Endothelial nitric oxide synthase |
| ERK1/2 | Extracellular signal-regulated kinases 1/2 |
| EVs | Extracellular vesicles |
| FABP4 | Fatty acid-binding protein 4 |
| FFA | Free fatty acid |
| FGF21 | Fibroblast growth factor 21 |
| FOXO | Forkhead box protein O |
| GSK-3 β | Glycogen synthase kinase 3 beta |
| HUVEC | Human umbilical vein endothelial cells |
| IFN γ | Interferon- γ |
| IL-1 β | Interleukin 1 β |
| IL-6 | Interleukin |
| lncRNAs | Long non-coding ribonucleic acids |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| MCP-1 | Monocyte chemoattractant protein 1 |
| M-CSF | Macrophage colony-stimulating factor |
| miRNA | Micro ribonucleic acid |
| mRNA | Messenger ribonucleic acid |
| mTOR | Mechanistic target of rapamycin |
| NAFLD | Non-alcoholic fatty liver disease |
| NASH | Non-alcoholic steatohepatitis |
| NF- κ B | Nuclear factor-kappa B |

| | |
|----------------|--|
| NO | Nitric oxide |
| PI3-K | Phosphatidylinositol 3-kinase |
| PPAR α | Peroxisome proliferator-activated receptor alpha |
| ROS | Reactive oxygen species |
| SCFA | Short-chain fatty acids |
| sDPP4 | Soluble DPP4 |
| SFA | Saturated fatty acids |
| SVF | Stromal vascular fraction |
| T2D | Type 2 diabetes |
| TGF- β 1 | Transforming growth factor β 1 |
| TLR4 | Toll-like receptor 4 |
| TNF α | Tumor necrosis factor α |
| TSC1 | Tuberous sclerosis complex 1 |
| VEGF | Vascular endothelial growth factor |
| VSMCs | Vascular smooth muscle cells |

1 From Obesity to Diabetes: The Role of Inter-Organ Crosstalk

Obesity is characterized by an excess of fat that can lead to a deleterious effect on health (Carraro et al. 2021). According to the WHO, more than 650 million people worldwide are clinically obese, and this prevalence continues growing (WHO 2016). The acquisition of a Western diet and lack of exercise have extensively contributed to the obesity epidemics. Besides a “thermodynamic imbalance” between caloric intake and energy expenditure, obesity is a very complex disease influenced as well by genetics, epigenetics, and psychosocial factors and therefore effective therapies are urgently needed (Carraro et al. 2021). Obesity, and especially abdominal obesity, is often accompanied by other metabolic disturbances such as enhanced fasting plasma glucose, hypertension, and dyslipidemia. These factors frequently cluster together in the metabolic syndrome (Alberti et al. 2009). Metabolic syndrome increases the risk to develop type 2 diabetes (T2D) and cardiovascular diseases 2–4 times (Ballantyne et al. 2008). In fact, in T2D patients, the accumulation of visceral fat represents a key promoter of atherosclerosis, even independently of other traditional risk factors (Rejzink et al. 2019). While subcutaneous fat can act as a “metabolic sink,” visceral fat is specially related to the cardiometabolic complications of obesity. Metabolic disturbances such as obesity and insulin resistance lead to a pro-inflammatory state in white adipose tissue (AT) which reduces adipose-derived stem cells (ASCs) plasticity leading to AT remodeling mostly through hypertrophy (Badimon and Cubedo 2017). Furthermore, visceral fat has a more reduced ability to store free fatty acids (FFAs) than subcutaneous fat and displays a different lipidomic signature in overweight humans (Zacharia et al. 2020). Visceral AT is more prone to hypertrophic remodeling and macrophage recruitment.

Due to its location, visceral fat can release FFAs and other soluble factors into systemic circulation contributing to chronic inflammation and leading to lipid overflow resulting in ectopic fat accumulation in skeletal muscle and the liver and, eventually, causing insulin resistance (Després and Lemieux 2006). The elevation of fasting and postprandial plasma glucose levels is the outcome of pancreatic β -cell failure after a long period compensating insulin resistance in peripheral tissues (Kahn et al. 2006). Although it is clear how this process ends, the underlying mechanisms of how insulin resistance begins are very complex and remain yet not fully understood. Diabetes is defined by enhanced plasma levels of a single metabolite, glucose, but there is emerging evidence that inflammation also plays a role in T2D progression and its further complications. Obesity and T2D are considered chronic subclinical inflammatory states. This persistent, subacute inflammation is acknowledged as a key factor promoting metabolic derangements and finally contributing to insulin resistance in obesity. Under these conditions, excessive adipocyte growth leads to AT dysfunction characterized by a shift of the AT secretome with increased pro-inflammatory M1 macrophages but also an increased release of pro-inflammatory factors by adipocytes themselves (Romacho et al. 2014). Indeed, AT dysfunction has a central role in the development of insulin resistance, T2D, and key complications such as cardiovascular diseases and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD).

Insulin resistance in the AT results in reduced inhibition of lipolysis and increased lipogenesis. Besides triglyceride storage, AT acts as a true endocrine organ which synthesizes and releases a wide range of mediators (Romacho et al. 2014). Other circulating metabolic mediators such as lipids, amino acids, and keto acids also play an important role in inter-organ crosstalk regarding the onset of insulin resistance (Gancheva et al. 2018). Nevertheless, we will focus on AT-derived factors and how they can regulate distant targets, such as the liver, skeletal muscle, pancreas, the cardiovascular system, and gut microbiota. This chapter aims to provide an overview on relevant mediators of inter-organ crosstalk promoting or preventing the progression from obesity to insulin resistance. The impact of soluble molecules such as organokines, circulating soluble lipid mediators such as FFAs and extracellular vesicles (EVs) together with their most relevant/promising cargos in insulin resistance pathogenesis will be revised. Finally, we provide a perspective on potential therapeutic targets to interfere in this complex network in the context of metabolic diseases.

2 Mediators of Communication: Soluble Factors of Inter-Organ Crosstalk

In both health and insulin resistance states, AT, skeletal muscle, and the liver act as important endocrine organs (Fig. 1). Therefore, among the soluble inter-organ crosstalk mediators, adipokines, myokines, and hepatokines are critical actors. These soluble factors are very heterogeneous and comprise classical cytokines like interleukin(IL)-1 β , IL-6, prototypical molecules specifically originated in the AT

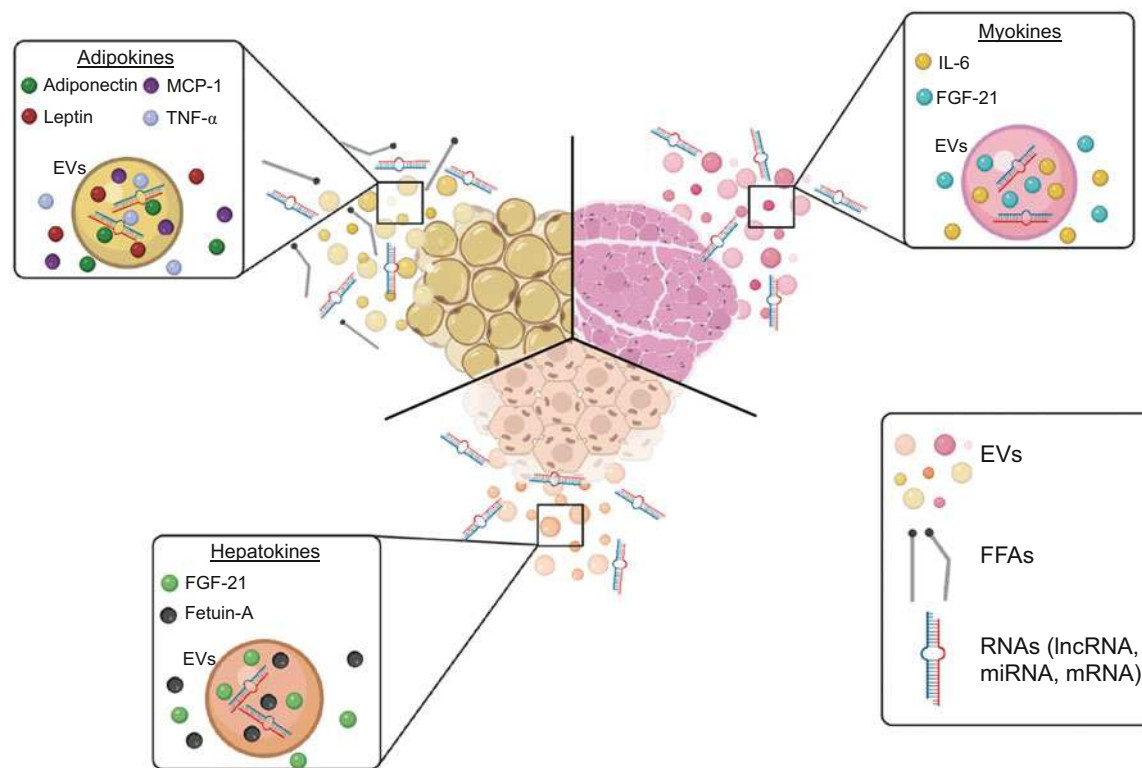


Fig. 1 Mediators of inter-organ communication released by different tissues. The main soluble cytokines are represented for each tissue as well as the free fatty acids and the circulating or internalized RNAs into extracellular vesicles. *EVs* Extracellular vesicles, *FFAs* Free fatty acids, *FGF21* Fibroblast growth factor 21, *IL-6* Interleukin-6, *LncRNAs* Long non-coding ribonucleic acids, *MCP-1* Monocyte chemoattractant protein 1, *miRNA* Micro ribonucleic acid, *mRNA* Messenger ribonucleic acid, *TNF- α* Tumor necrosis factor- α

like adiponectin or leptin, or in the skeletal muscle as myostatin, or simultaneously by AT, muscle, and liver as fibroblast growth factor 21 (FGF21) (Itoh 2014). Under pathophysiological conditions as obesity or T2D, there is an imbalance in these factors with a prominent production of pro-inflammatory factors (Oh et al. 2016). However, although extensive evidence has demonstrated an improvement of insulin signaling under lifestyle modifications such as diet or exercise, it remains elusive how these factors interplay with each other and what therapeutic potential they hold to combat the metabolic syndrome.

2.1 Adipokines

It is worth highlighting that AT comprises besides mature adipocytes and other non-parenchymal cell types, the so-called stromal vascular fraction (SVF). The SVF contains vascular cells, preadipocytes, fibroblasts, immune and multipotent stem cells. The term adipokine initially referred to a protein produced and released from adipocytes (Trayhurn and Wood 2004), thus excluding factors from other cells within the AT, but this term is currently used indistinctly for factors derived from all AT components. Adipokines can in turn be directly released by adipocytes through different mechanisms (Romacho et al. 2014) but also embedded in EVs (Hartwig et al. 2019). Thus, the whole fat cell secretome comprises the adipokinome, the novel term “exoadipokinome” (Hartwig et al. 2019) plus other lipid species such as FFAs or ceramides (Dahlman et al. 2012).

The discovery of classical adipokines like leptin, which has a key role in appetite control, and the insulin-sensitizing and pleiotropic anti-inflammatory adipokine adiponectin (Wang and Scherer 2016) has led to acknowledge the importance of AT in inter-organ crosstalk and specially in the context of the pathogenesis in the progression from obesity, insulin resistance, and T2D (Romacho et al. 2014). Besides prototypical AT-derived classical cytokines with prominent roles in the pathophysiology of diabetes and its complications such as IL-1 β or tumor necrosis factor α (TNF α), there are other factors not restricted to the AT such as the components of the renin-angiotensin system. Besides markers of systemic inflammation and cardiometabolic risks, adipokines are acknowledged as real mediators in defective inter-organ crosstalk leading to insulin resistance as well as promoting complications of T2D as cardiovascular diseases.

2.2 Myokines and Hepatokines: Toward the Organokine Concept

Skeletal muscle and liver can also act as endocrine organs through the release of factors called myokines and hepatokines, respectively. The term “organokine” collectively refers to adipokines, myokines, hepatokines, and other -kines to come (Choi 2016). Myokines are defined as cytokines and other kind of peptides synthesized, expressed, and secreted by muscle fibers which can act in an auto-/para- or endocrine manner (Pedersen and Febbraio 2012). However, many myokines

are not solely produced by skeletal muscle but also by AT such as IL-6 or also by the liver, like FGF21. Insulin resistance in skeletal muscle is a key step in the initiation of T2D. Thus, in insulin resistant skeletal muscle, intramyocellular lipids are accumulated and the myokinome profile is modified. Furthermore, upon sedentarism or exercise, adipokines and myokines can interact and regulate each other. In line, it has been proposed that myokines are the mediators of the beneficial effects of exercise.

Hepatokines such as FGF21 and fetuin-A are proteins produced and released mainly by the liver and can regulate glucose and lipid homeostasis in a positive or negative manner. Similarly to the previous “organokines,” diet, metabolic status, and exercise can modulate these factors. Thus, acute high-fat overfeeding increases circulating levels of FGF21 and fetuin-A in healthy men (Willis et al. 2020). Acute exercise also increases circulating FGF21 in an intensity-dependent manner (Willis et al. 2019).

2.3 EVs as Shuttle of Biological Information

Due to their cargo, EVs can be considered as true messengers between organs. Indeed, EVs are released from “mother cells” through different mechanisms and transfer their content to other cells (recipient or target cells). EVs are membrane structures released from the blebbing of the plasma membrane or from intracellular components such as intraluminal vesicles and multivesicular bodies. Depending on their size, two subtypes can be distinguished: large EVs and small EVs. During their biogenesis, EVs are enriched in proteins, lipids, messenger ribonucleic acid (mRNA), microRNAs (miRNA), and other types of RNA as well as in fragments of organelles. Due to their different biogenesis mechanisms, large EVs and small EVs are enriched in different proteins allowing their characterization. Indeed, large EVs are rich in plasma membrane markers that allow determining the cell of origin. Thus, it has been reported that large EVs can be generated from platelets, leukocytes, erythrocytes, hepatic cells, tumor cells and, in general, from all types of cells. At difference of large EVs, small EVs are rich in tetraspanin proteins showing that the machinery involved in the EV biogenesis determines the EV content. However, common components of both types of EVs have been also described. Hence, recent works show that both types of EVs can carry molecules that up to now have been considered as “soluble.” For instance, large EVs released from lipopolysaccharide (LPS)-treated monocytes harbor bioactive IL-1 β and transcripts for pro-inflammatory cytokines such as TNF α , IL-6, and IL-8 (Mackenzie et al. 2001; Wen et al. 2014). Circulating EVs from non-obese and obese patients carry several cytokines that correlated with body mass index (BMI) showing a link between the content of EVs and obesity although no evidence of the functionality of these cytokines has been demonstrated in vivo (Amosse et al. 2018). Also, circulating large EVs from mice contain chemokines and cytokines such as monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), macrophage colony-stimulating factor

(M-CSF), and IL-1 β and induce pro-inflammatory response in endothelial cells (Gaceb et al. 2016).

Concerning the lipid content, several studies have shown an increase in cholesterol, sphingomyelin, and phosphatidylserine in EVs when compared to mother cells, whereas phosphatidylcholine and phosphatidylinositol contents were decreased (for review, see Skotland et al. 2020). But as indicated above for cytokines, this is not clear whether changes in the composition of lipid EVs can modify their biological actions. Recently, it has been reported that ceramide C16:0 generated in thoracic AT from the paracardial region is secreted in small EVs released from the adipocytes (Akawi et al. 2021). Finally, EVs are very rich in mRNA and miRNA. Initial reports indicate that the lipid envelope of EVs protect mRNA and miRNA from degradation in comparison with circulating mRNA and miRNA (Kosaka et al. 2010). Thus, EVs can transfer both types of RNA to long-range target cells and induce changes on function of target cells. All these effects induced by the cargo of EVs will be further developed below.

2.4 Other Circulating Messengers (miRNA, lncRNA, Fatty Acids)

miRNA are a class of non-coding RNAs with less than 20 to 24 nucleotides (Ling et al. 2013). Unlike other types of RNAs, miRNAs regulate the expression of certain genes by base-pairing to the 3'UTR of their target mRNA. They are produced by two RNase III proteins, Drosha and Dicer, and generally target mRNAs from their cell of origin. Although miRNA levels in blood are relatively stable when circulating free in blood, it has been shown that miRNAs can be transported and protect from degradation into EVs or by binding to lipoprotein complexes (Chen et al. 2008; Kosaka et al. 2010).

Long non-coding RNAs (lncRNAs) are transcripts of more than 200 nucleotides that compose the majority of the nonprotein-coding genome. They regulate genes at the transcriptional and epigenetic level by direct interaction with chromatin or different transcription factors. Like miRNAs, lncRNAs can be found within EVs and act to target cells and tissues at long-range (Viereck and Thum 2017). These encapsulated circulating lncRNAs are stable in the extracellular environment, resisting to temperature or pH changes or to RNase attack, although they are preserved from degradation when carried by EVs. Moreover, it has been shown that in several pathologies such as obesity, circulating lncRNAs are enriched or decreased in the bloodstream, making them excellent biomarkers. For example, Thomou et al. (2017) have demonstrated the importance of miRNAs carried by small EVs derived from AT in the pathogenesis of metabolic dysfunctions.

Finally, during obesity, levels of plasma FFAs released from AT expansion, but also those consumed through diet, are increased. FFAs are classified according to the absence, saturated fatty acids (SFAs), or presence of double bonds (monounsaturated or polyunsaturated fatty acids, MUFAs or PUFAs, respectively) in their structure. Whereas SFAs are described as inducing deleterious effects such as insulin resistance and inflammation in a large variety of tissues (Boden et al. 2005),

interestingly, gut microbiota produces short-chain fatty acids (SCFA) including acetate, propionate, and butyrate that can modulate different metabolic pathways related with obesity, insulin resistance, and T2D. In general, SCFA possess anti-inflammatory effects and the dysbiosis associated with a higher fat and decrease of dietary fibers consumptions described during obesity and diabetes disrupts the SCFA generation leading to an increase in permeability and inflammation of the intestinal epithelium (Yehualashet and Yikna 2021).

3 Organ Crosstalk

3.1 AT-Liver Crosstalk

Secreted adipokines such as adiponectin, IL-6, leptin, MCP-1, and FFAs from AT play a critical role in the development of multi-organ insulin resistance including the liver. In detail, visceral AT removal improves hepatic insulin resistance in diet-induced obese rats (Ben-Shlomo et al. 2012). Recently, it has been shown that removal of epididymal visceral AT enhances insulin-stimulated Akt phosphorylation, not only in liver, but also in skeletal muscle. Interestingly, this was associated with a decrease of hepatic steatosis and oxidative stress, an increase in circulating adiponectin levels and a decrease in IL-6 and FFAs (Franczyk et al. 2021).

Since adiponectin exerts hepatoprotective actions, reduced adiponectin levels and decreased hepatic expression of the two adiponectin receptors during obesity are related to the severity of steatosis, inflammation, and fibrosis (Balmer et al. 2010) and contribute to a state of hepatic adiponectin resistance (Combs and Marliss 2014). The molecular mechanisms involve the specific interaction of adiponectin with its receptor AdipoR2, and the subsequent activation of both AMP-activated protein kinase (AMPK) downstream signaling and peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) in the liver attenuating hepatic lipoinflammation (Ishtiaq et al. 2019).

During obesity, enhanced secretion of several adipokines such as MCP-1 can exacerbate the infiltration of macrophages in the AT, systemic insulin resistance, and increased hepatic triglyceride content in mice (Kanda et al. 2006). On the contrary, deletion of MCP-1 gene or inhibition of MCP-1 improved insulin resistance and lipid ectopic accumulation in the liver of obese mice (Kanda et al. 2006).

Dipeptidyl peptidase-4 (DPP4) can cleave and inactivate the incretin hormones among other factors (Röhrborn et al. 2015). We have shown that soluble DPP4 (sDPP4) is an adipokine predominantly secreted by visceral AT in humans (Sell et al. 2013). Others propose that it is mainly produced by the liver. Regardless of its main source, sDPP4 promotes insulin resistance and inflammation in vitro and in vivo (Ghorpade et al. 2018). Thus, specific DPP4 deletion in the AT improves hepatic insulin sensitivity in a murine model of diet-induced obesity (Romacho et al. 2020a, b), whereas DPP4 silencing in hepatocytes suppresses the secretion of pro-inflammatory adipokines such as MCP-1, IL-6, TNF α , and IL-1 β from visceral AT and insulin resistance (Ghorpade et al. 2018; Baumeier et al. 2017). However,

orally administered DPP4 inhibitors, like sitagliptin, do not exert similar effects as DPP4 silencing in liver or AT (Ghorpade et al. 2018).

Other strategies such as inhibition or deletion in the liver of proteins involved in the SUMOylation (Liu et al. 2021), Forkhead box protein O (FOXO) transcription factors (Garcia Whitlock et al. 2021) and hepatokines, mainly FGF21, have shown a reduction of AT mass and decreased insulin resistance suggesting that the crosstalk between both organs is bidirectional.

3.2 AT-Skeletal Muscle Crosstalk

AT and skeletal muscle are the largest endocrine organs in humans. The upregulation of certain pro-inflammatory adipokines during obesity can affect skeletal muscle insulin sensitivity. It has been proposed that adipokines promote lipotoxicity, even in early stages of obesity when plasma FFA levels are not yet influenced by lipolysis. Thus, conditioned medium from human adipocytes in combination with low concentrations of palmitate potentiated lipid accumulation, reduced palmitate oxidation, and increased diacylglycerol content in human skeletal muscle cells (Taube et al. 2012).

On the contrary, the myokine secretory profile can be positively modulated by exercised-induced muscle contraction releasing the so-called exercise factors that comprise not only myokines, but also other metabolites which can counteract the negative effects of obesity-related adipokines or cytokines. In line, contraction of human skeletal muscle cells by electrical pulse stimulation activated AMPK activation and induced IL-6, similarly to what described for exercise in vivo. Furthermore, electrical pulse stimulation blunted insulin resistance induced by adipocyte conditioned medium, or isolated factors as MCP-1 and chemerin, by blocking pro-inflammatory signaling pathways (Lambernd et al. 2012). In spite of the identification of many novel myokines, their real impact in inter-organ crosstalk in humans remains unclear (Eckel 2019). Very recently, the regulation of EVs released from limbs under muscle contraction to the circulation and its uptake has demonstrated that EVs participate in exercise-mediated inter-organ crosstalk (Whitham et al. 2018).

3.3 AT-Pancreas Crosstalk

It is well accepted that adipokines and other mediators released by AT play a major role in the development of insulin resistance by acting on both peripheral organs and on pancreas function. Increased circulating fatty acid-binding protein 4 (FABP4) levels are associated with blunted increased insulin secretion, insulin sensitivity, and elevated glucagon fasting and oral glucose postchallenge in patients with T2D (Wang et al. 2021a) suggesting that FABP4 may affect β -cell and α -cell function. Both adiponectin and leptin levels act in an endocrine manner to regulate β -cell function since adiponectin increases and leptin inhibits insulin production (Turer and

Scherer 2012; Iikuni et al. 2008). Indeed, in obesity, increased leptin and decreased adiponectin levels reduce glucose-induced insulin secretion leading to β -cell secretory insufficiency. Other adipokines such as chemerin, adiponectin, and apelin, through the overexpression of G protein-coupled receptors, can also stimulate insulin secretion (Atanes et al. 2021).

Lipotoxicity induced by FFAs impairs pancreatic β -cell function resulting in a decrease in glucose-stimulated insulin secretion (Maedler et al. 2003). More in detail, ceramides induce β -cell apoptosis by releasing cytochrome c from the mitochondria (Lang et al. 2011) whereas palmitate inhibits insulin gene expression by acting at the transcriptional level via de novo ceramide synthesis (Kelpke et al. 2003). On the contrary, palmitic acid esters of hydroxy stearic acid released from AT are considered as endogenous anti-diabetic and anti-inflammatory lipids since they enhance glucose-stimulated insulin secretion and β -cell survival in pancreas (Syed et al. 2019).

Very recently, it has been shown that EVs are involved in a functional crosstalk between AT and pancreatic β -cells, which positively or negatively influences β -cell fates, depending on the physiopathological state of adipocytes and AT of origin (Gesmundo et al. 2021). Thus, EVs from untreated adipocytes induce cell survival, proliferation, AKT, and glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3 β) phosphorylation and reduce apoptosis of pancreatic β -cells. Whereas EVs released from cytokine-treated adipocytes reduce cell survival, proliferation, AKT and GSK-3 β phosphorylation and increase β -cell apoptosis. Although the underlying mechanisms mediating these effects are not completely elucidated, differential miRNA expression between both types of EVs may explain, at least partly, these effects.

3.4 Interaction Between AT and the Cardiovascular System

As described above, during obesity, changes in the AT secretome induce metabolic dysfunctions and inflammation including alteration of cardiovascular homeostasis (Chait and Den Hartigh 2020). Cardiovascular dysfunction, whose early hallmark is endothelial dysfunction, is associated with an imbalance in the expression and secretion of pro-angiogenic, pro-atherothrombotic, pro-inflammatory factors by AT (Wronkowitz et al. 2014). Consequently, identifying the detailed crosstalk between adipocytes and cardiovascular cells may help to prevent obesity-associated cardiovascular diseases (Wronkowitz et al. 2014).

During obesity, the rapid expansion of AT affects tissue vascularization resulting to a decreased oxygen supply in adipocytes, which leads to hypoxia, inflammation, and deficient angiogenesis (Hodson et al. 2013). During adipocyte differentiation, the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) secreted by AT is increased leading to vascular smooth muscle cells (VSMCs) proliferation of in vitro (Schlich et al. 2013), increased angiogenesis and insulin sensitivity within AT (Elias et al. 2012).

Paradoxically, in obesity and insulin resistance, central leptin resistance is accompanied by hyperleptinemia which has been associated with hypertension,

acute myocardial infarction, and heart failure (Fujimaki et al. 2001; Schulze et al. 2011; Simonds et al. 2014). This can be due to leptin ability to stimulate sympathetic nerve activity (Simonds et al. 2014) through the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) and extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2) pathways (Rahmouni et al. 2009). Similar effects have been described for resistin. Indeed, plasma levels of resistin have been positively correlated with high blood pressure. The involved mechanism seems to be related with the enhancement of renal sympathetic nerve activity via PI3-K (Kosari et al. 2012). Interestingly, an additive effect of leptin and resistin has been described when both adipokines were co-administrated in rats (Habeebullah et al. 2016). In *in vitro* studies using endothelial cells, leptin increases reactive oxygen species (ROS) production leading to fatty acid oxidation and reduced nitric oxide (NO) bioavailability through the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) uncoupling promoting endothelial dysfunction (Korda et al. 2008).

We have described that visfatin/Nicotinamide phosphoribosyltransferase (eNampt), a multi-faceted adipokine whose circulating levels are enhanced in T2D and obesity, causes endothelial dysfunction *in vivo* and *ex vivo* as well as vascular inflammation (Romacho et al. 2020a; Vallejo et al. 2011). Interestingly, *in vivo* endothelial dysfunction evoked by visfatin infusion was mediated by NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 (NLRP3)-inflammasome-driven tissular release of IL-1 β (Romacho et al. 2020b).

Since adiponectin exerts protective effects on vascular endothelial cells, VSMCs, and cardiomyocytes, the decrease in adiponectin levels observed during obesity is associated to poorer outcomes in cardiovascular diseases (for review, see Nakamura et al. 2014). In detail, adiponectin downregulation decreases eNOS activity leading to decreased NO bioavailability. Also, adiponectin favors prostacyclin production (Ohashi et al. 2009) and decreases secretion of pro-inflammatory cytokines from endothelial cells by inhibiting nuclear factor-kappa B (NF- κ B) signaling (Ouchi et al. 2000).

Omentin, an anti-inflammatory adipokine produced by AT, mainly from the SVF, that is downregulated during obesity, improved endothelium dysfunction by decreasing ROS production and increasing NO bioavailability in obese diabetic rats (Leandro et al. 2021). Recently, omentin-1 levels have been reported to be decreased in patients with hypertension compared with normotensive controls (Çelik et al. 2021) and atrial fibrillation (Chen et al. 2020). Interestingly, omentin displayed anti-fibrotic actions by counteracting transforming growth factor-(TGF)- β 1-induced cardiac fibroblast activation and endothelial-to-mesenchymal transition (Chen et al. 2020). Under high glucose conditions, omentin protects against NO decrease and ROS production in endothelial cells via the AMPK/PPAR δ signaling pathway (Liu et al. 2020). Conversely, recent data show that elevated levels of circulating omentin are associated with an increased risk of stroke and cardiovascular death in individuals with diabetes after adjustment for multiple cardiovascular risk factors (Niersmann et al. 2020) suggesting a potential role of omentin in the development of cardiovascular diseases.

Of particular interest, perivascular AT, the fat depot surrounding vessels, through the release of adipokines, FFAs, chemokines, and relaxing and contracting factors,

plays a key role in the crosstalk between the AT and the cardiovascular system due to its privileged localization. Accumulation of perivascular AT during obesity and diabetes decreases the release of perivascular adipose relaxing factors and exacerbates the production of perivascular contracting factors resulting in vasoconstriction (Britton and Fox 2011). For instance, reduced adiponectin expression in perivascular AT in T2D patients was increased and positively correlated with vascular oxidative stress (Antonopoulos et al. 2015). Conditioned medium from epicardial AT of patients with T2D reduced sarcomere shortening, cytosolic calcium fluxes, expression of sarcoplasmic endoplasmic reticulum adenosine triphosphatase 2a (ATPase 2a), and decreased insulin-mediated AKT-Ser473-phosphorylation of isolated rat cardiomyocytes. These effects were due to the enrichment in activin A and angiopoietin-2 in conditioned medium (Greulich et al. 2012).

As indicated above, EVs can be involved in the dialogue between AT and the cardiovascular system. A transfer of caveolin-1 from glucagon-stimulated neighboring endothelial cells to adipocytes takes place in mice *in vivo* (Crewe et al. 2018). Delivery of miR-200a from adipocyte-derived EVs to cardiomyocytes resulted in decreased tuberous sclerosis complex 1 (TSC1) and subsequent mechanistic target of rapamycin (mTOR) activation, leading to cardiomyocyte hypertrophy *in vitro* (Fang et al. 2016). On the other hand, EVs from adipose-derived stromal cells displayed cardioprotective effects in acute myocardial infarction in rats. Hence, under hypoxic conditions, these EVs are enriched in miR-93-5p that can be delivered to cardiomyocytes. As a result, Atg7 and Toll-like receptor 4 (TLR4)/NF- κ B were downregulated, leading to suppressing cardiac injury-mediated autophagy and inflammatory responses, respectively (Liu et al. 2018).

In this regard, LPS found in blood has been described as associated to sEVs from patients with metabolic syndrome and via the activation of TLR4 induces endothelial dysfunction through the overproduction of cytosolic and mitochondrial ROS (Ali et al. 2021).

Altogether, bidirectional communication between AT and cells of the cardiovascular system controls vascular homeostasis but also, when imbalanced, induce pathophysiological alterations.

A summary of the main features in the interplay between AT with liver, skeletal, muscle, pancreas, and the cardiovascular system can be found in Fig. 2.

3.5 Interaction Between Gut Microbiota, Liver, and AT

Under physiological conditions, the intestinal barrier is almost impermeable, but, during obesity, poor dietary habits favor a modification of the bacterial populations of the intestines. Indeed, a depletion of the bacterial richness as well as an increase of certain phyla such as Firmicutes and a decrease of others such as Bacteroidetes is observed in obese patients (Le Chatelier et al. 2013) as well as in human NAFLD and non-alcoholic steatohepatitis (NASH) (Loomba et al. 2017). These modifications favor increased lipid storage in liver, AT expansion, and TNF α or interferon gamma (IFN γ) production evoking an alteration of the epithelium and the passage of

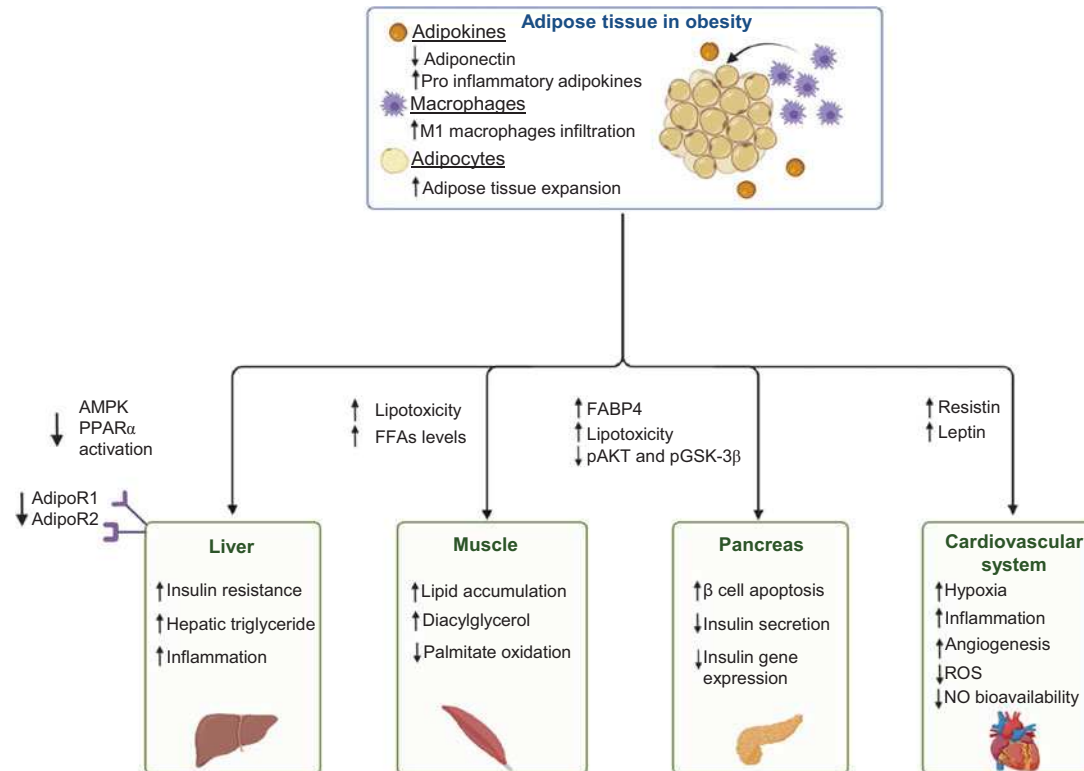


Fig. 2 Crosstalk between adipose tissue and several organs in obesity. Description of pathophysiological modifications in adipose tissue and their repercussion on liver, skeletal muscle, pancreas, and the cardiovascular system. *AMPK* AMP-activated protein kinase, *FABP4* Fatty acid-binding protein 4, *FFAs* Free fatty acids, *GSK-3 β* Glycogen synthase kinase 3 beta, *NO* Nitric oxide, *PPAR α* Peroxisome proliferator-activated receptor alpha, *ROS* Reactive oxygen species

microbial antigens or molecules such as LPS and SFAs (Madara and Stafford 1989; Clemente-Postigo et al. 2012) into the circulation. The presence of metabolic endotoxins in the bloodstream results in low-grade systemic inflammation which can alter the function of many organs through the activation of TLR4 pathway and ROS production (Cani et al. 2007). This mechanism maintains a pro-inflammatory loop favoring the development of metabolic syndrome and NAFLD (Baker et al. 2010; Fig. 3). LPS can be carried by bacterial EVs that alter the intestinal barrier by targeting tight junction proteins and increasing intestinal permeability leading to liver injuries via the activation of the LPS/TLR4 pathway (for review, see Villard et al. 2021) and impair glucose metabolism and insulin signaling in AT and skeletal muscle (Choi et al. 2015).

In isolated human abdominal subcutaneous adipocytes, LPS treatment promoted low-grade inflammation not only by activating TLR receptors but also by promoting the production of cytokines like TNF α and IL-6 (Creely et al. 2007). In a mouse model, the presence of a gut microbiota increased macrophage accumulation and LPS-dependent polarization toward the pro-inflammatory M1 phenotype in white AT (Caesar et al. 2012). Moreover, in humans, dietary treatments increasing SCFAs from microbiota reduced the production of pro-inflammatory adipokines such as IL-6 and IL-1 β (Roager et al. 2019). Treatment of mice with tributyrin to mimic SCFA action reduced AT inflammation which was associated with an increase of M2 macrophages and regulatory T cells (Sato et al. 2020).

Altogether, these data suggest that metabolic endotoxemia, in particular, and pro-inflammatory gut microbiota in general influence AT function in obesity, mainly, by increasing inflammation (Clemente-Postigo et al. 2019). However, some studies show that the development of obesity and its associated AT inflammation, impaired glucose tolerance and liver steatosis are independent of gut microbiota, since germ-free and conventional mice are similar prone to these effects when fed with a high-fat diet (Moretti et al. 2021; Eckel 2021).

4 Perspective: Taming Inter-Organ Mediators to Control Obesity?

Lifestyle interventions together with bariatric surgery remain in most of the cases the best solution for obese patients. In the last 30 years, intensive research on AT contribution to metabolic diseases has led to exciting discoveries. However, identifying new targets to develop pharmacological strategies to combat obesity has proven hitherto unsuccessful. Therefore, a deep understanding of inter-organ crosstalk in the pathogenesis of obesity and T2D as well as the changes of organ communication among diet or exercise can help us identify novel therapeutic targets to treat and prevent metabolic diseases and its complications.

The exciting results of the adiponectin receptor agonist AdipoRon at preclinical level have not been translated into clinical studies. At the moment, FGF21 remains one of the few organokines that is under clinical investigation for the treatment of obesity, T2D, and complications like NAFLD. Several analogues and FGF21

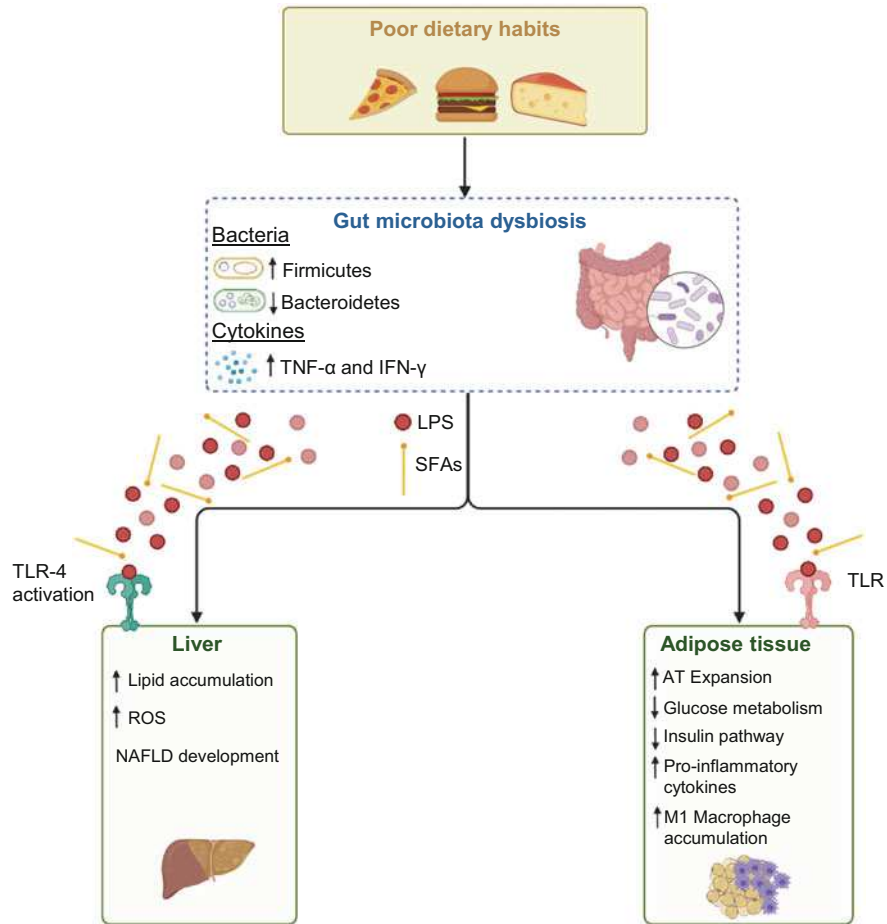


Fig. 3 The impact of gut microbiota dysbiosis on liver and adipose tissue. Poor dietary habits favor an increase of bacteria from certain phyla such as Firmicutes and a decrease of others such as Bacteroidetes. This imbalance favors TNF- α or IFN- γ production resulting in an alteration of the intestinal epithelium and the passage of microbial antigens or molecules such as LPS and SFAs in the circulation. The presence of metabolic endotoxins in the bloodstream results in a low-grade systemic inflammation which can alter the function of the liver through the activation of TLR pathways in the liver and the AT. This mechanism maintains the pro-inflammatory loop favoring the development of NAFLD as well as AT dysfunction. TNF- α and Interferon- γ production. AT adipose tissue, IFN- γ Interferon- γ , LPS Lipopolysaccharide, NAFLD Non-alcoholic fatty liver disease, ROS Reactive oxygen species, SFA saturated fatty acids, TLR-4 Toll-like receptor-4, TNF- α Tumor necrosis factor- α

receptor agonists have undergone clinical trials bringing mixed results (as reviewed in Geng et al. 2020).

Although the impact of bariatric surgery on gut microbiota has been demonstrated, the validity of microbiota-based therapies to combat obesity and insulin resistance remains unclear (Wang et al. 2021b, Hanssen et al. 2021).

Several preclinical studies showed promising results for adipose-derived EVs from lean mice reducing AT inflammation and improving insulin sensitivity in the recipient obese mice (Huang and Xu 2021). The potential clinical use of EVs still seems technically challenging in terms of isolation, drug loading, large-scaling, and clinical grade production. Artificial engineered EVs with selected bioactive cargos might represent future alternatives to natural EVs for targeted drug delivery. Although the advances in -omics has led to in-depth characterization of the secretome of organokines, their precise interplay, biological function, and therapeutic potential require further research (Liu et al. 2019).

References

- Akawi N, Checa A, Antonopoulos AS et al (2021) Fat-secreted ceramides regulate vascular redox state and influence outcomes in patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 77: 2494–2513
- Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM et al (2009) Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 120:1640–1645
- Ali S, Mallocci M, Safiedeen Z et al (2021) LPS-enriched small extracellular vesicles from metabolic syndrome patients trigger endothelial dysfunction by activation of TLR4. *Metabolism* 118: 154727
- Amosse J, Durcin M, Mallocci M et al (2018) Phenotyping of circulating extracellular vesicles (EVs) in obesity identifies large EVs as functional conveyors of macrophage migration inhibitory factor. *Mol Metab* 18:134–142
- Antonopoulos AS, Margaritis M, Coutinho P et al (2015) Adiponectin as a link between type 2 diabetes and vascular NADPH oxidase activity in the human arterial wall: the regulatory role of perivascular adipose tissue. *Diabetes* 64:2207–2219
- Atanes P, Ashik T, Persaud SJ (2021) Obesity-induced changes in human islet G protein-coupled receptor expression: implications for metabolic regulation. *Pharmacol Ther* 228:107928
- Badimon L, Cubedo J (2017) Adipose tissue depots and inflammation: effects on plasticity and resident mesenchymal stem cell function. *Cardiovasc Res* 113:1064–1073
- Baker SS, Baker RD, Liu W, Nowak NJ, Zhu L (2010) Role of alcohol metabolism in non-alcoholic steatohepatitis. *PLoS One* 5:e9570
- Ballantyne CM, Hoogeveen RC, McNeill AM, Heiss G, Schmidt MI, Duncan BB, Pankow JS (2008) Metabolic syndrome risk for cardiovascular disease and diabetes in the ARIC study. *Int J Obes (Lond)* 32(Suppl 2):S21–S24
- Balmer ML, Joneli J, Schoepfer A, Stickel F, Thormann W, Dufour J-F (2010) Significance of serum adiponectin levels in patients with chronic liver disease. *Clin Sci (Lond)* 119:431–436
- Baumeier C, Schlüter L, Saussenthaler S et al (2017) Elevated hepatic DPP4 activity promotes insulin resistance and non-alcoholic fatty liver disease. *Mol Metab* 6:1254–1263
- Ben-Shlomo S, Einstein FH, Zvibel I, Atias D, Shlomai A, Halpern Z, Barzilai N, Fishman S (2012) Perinephric and epididymal fat affect hepatic metabolism in rats. *Obesity (Silver Spring)* 20: 151–156

- Boden G, She P, Mozzoli M, Cheung P, Gumireddy K, Reddy P, Xiang X, Luo Z, Ruderman N (2005) Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor-kappaB pathway in rat liver. *Diabetes* 54:3458–3465
- Britton KA, Fox CS (2011) Perivascular adipose tissue and vascular disease. *Clin Lipidol* 6:79–91
- Caesar R, Reigstad CS, Bäckhed HK, Reinhardt C, Ketonen M, Lundén GÖ, Cani PD, Bäckhed F (2012) Gut-derived lipopolysaccharide augments adipose macrophage accumulation but is not essential for impaired glucose or insulin tolerance in mice. *Gut* 61:1701–1707
- Cani PD, Amar J, Iglesias MA et al (2007) Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56:1761–1772
- Carraro R, Romacho T, Peiró C, Corpas E, Sánchez-Ferrer CF (2021) Chapter 15 – obesity, a condition that mimics premature aging. In: Corpas E (ed) *Endocrinology of aging*. Elsevier, pp 501–521
- Çelik M, Nar R, Nar G, Sökmen E, Günver G (2021) Serum omentin-1 levels in hypertensive patients. *J Hum Hypertens* 35:290–295
- Chait A, den Hartigh LJ (2020) Adipose tissue distribution, inflammation and its metabolic consequences, including diabetes and cardiovascular disease. *Front Cardiovasc Med* 7:22
- Chen X, Ba Y, Ma L et al (2008) Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 18:997–1006
- Chen Y, Liu F, Han F, Lv L, Tang C-E, Xie Z, Luo F (2020) Omentin-1 is associated with atrial fibrillation in patients with cardiac valve disease. *BMC Cardiovasc Disord* 20:214
- Choi KM (2016) The impact of organokines on insulin resistance, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinol Metab (Seoul)* 31:1–6
- Choi Y, Kwon Y, Kim D-K et al (2015) Gut microbe-derived extracellular vesicles induce insulin resistance, thereby impairing glucose metabolism in skeletal muscle. *Sci Rep* 5:15878
- Clemente-Postigo M, Queipo-Ortuño MI, Murri M, Boto-Ordoñez M, Perez-Martinez P, Andres-Lacueva C, Cardona F, Tinahones FJ (2012) Endotoxin increase after fat overload is related to postprandial hypertriglyceridemia in morbidly obese patients. *J Lipid Res* 53:973–978
- Clemente-Postigo M, Oliva-Olivera W, Coin-Aragüez L et al (2019) Metabolic endotoxemia promotes adipose dysfunction and inflammation in human obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 316:E319–E332
- Combs TP, Marliss EB (2014) Adiponectin signaling in the liver. *Rev Endocr Metab Disord* 15:137–147
- Creely SJ, McTernan PG, Kusminski CM, Fisherff M, Da Silva NF, Khanolkar M, Evans M, Harte AL, Kumar S (2007) Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292:E740–E747
- Crewe C, Joffin N, Rutkowski JM, Kim M, Zhang F, Towler DA, Gordillo R, Scherer PE (2018) An endothelial-to-adipocyte extracellular vesicle axis governed by metabolic state. *Cell* 175:695–708.e13
- Dahlman I, Elsen M, Tennagels N, Korn M, Brockmann B, Sell H, Eckel J, Arner P (2012) Functional annotation of the human fat cell secretome. *Arch Physiol Biochem* 118:84–91
- Després J-P, Lemieux I (2006) Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 444:881–887
- Eckel J (2019) Myokines in metabolic homeostasis and diabetes. *Diabetologia* 62:1523–1528
- Eckel J (2021) Intestinal microbiota and host metabolism – a complex relationship. *Acta Physiol (Oxf)* 232:e13638
- Elias I, Franckhauser S, Ferré T et al (2012) Adipose tissue overexpression of vascular endothelial growth factor protects against diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 61:1801–1813
- Fang X, Stroud MJ, Ouyang K et al (2016) Adipocyte-specific loss of PPAR γ attenuates cardiac hypertrophy. *JCI Insight* 1:e89908
- Franczyk MP, He M, Yoshino J (2021) Removal of epididymal visceral adipose tissue prevents obesity-induced multi-organ insulin resistance in male mice. *J Endocr Soc* 5:bvab024
- Fujimaki S, Kanda T, Fujita K, Tamura J, Kobayashi I (2001) The significance of measuring plasma leptin in acute myocardial infarction. *J Int Med Res* 29:108–113

- Gaceb A, Vergori L, Martinez MC, Andriantsitohaina R (2016) Activation of endothelial pro-resolving anti-inflammatory pathways by circulating microvesicles from non-muscular myosin light chain kinase-deficient mice. *Front Pharmacol* 7:322
- Gancheva S, Jelenik T, Álvarez-Hernández E, Roden M (2018) Interorgan metabolic crosstalk in human insulin resistance. *Physiol Rev* 98:1371–1415
- Garcia Whitlock AE, Sostre-Colón J, Gavin M, Martín ND, Baur JA, Sims CA, Titchenell PM (2021) Loss of FOXO transcription factors in the liver mitigates stress-induced hyperglycemia. *Mol Metab* 51:101246
- Geng L, Lam KSL, Xu A (2020) The therapeutic potential of FGF21 in metabolic diseases: from bench to clinic. *Nat Rev Endocrinol* 16:654–667
- Gesmundo I, Pardini B, Gargantini E et al (2021) Adipocyte-derived extracellular vesicles regulate survival and function of pancreatic β cells. *JCI Insight* 6:141962
- Ghorpade DS, Ozcan L, Zheng Z, Nicoloso SM, Shen Y, Chen E, Blüher M, Czech MP, Tabas I (2018) Hepatocyte-secreted DPP4 in obesity promotes adipose inflammation and insulin resistance. *Nature* 555:673–677
- Greulich S, Maxhara B, Vandenplas G et al (2012) Secretory products from epicardial adipose tissue of patients with type 2 diabetes mellitus induce cardiomyocyte dysfunction. *Circulation* 126:2324–2334
- Habeebollah H, Alshaymi N, Stebbing MJ, Jenkins TA, Badoer E (2016) Central leptin and resistin combined elicit enhanced central effects on renal sympathetic nerve activity. *Exp Physiol* 101:791–800
- Hanssen NMJ, de Vos WM, Nieuwdorp M (2021) Fecal microbiota transplantation in human metabolic diseases: from a murky past to a bright future? *Cell Metab* 33:1098–1110
- Hartwig S, De Filippo E, Göddeke S, Knebel B, Kotzka J, Al-Hasani H, Roden M, Lehr S, Sell H (2019) Exosomal proteins constitute an essential part of the human adipose tissue secretome. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteomics* 1867:140172
- Hodson L, Humphreys SM, Karpe F, Frayn KN (2013) Metabolic signatures of human adipose tissue hypoxia in obesity. *Diabetes* 62:1417–1425
- Huang Z, Xu A (2021) Adipose extracellular vesicles in intercellular and inter-organ crosstalk in metabolic health and diseases. *Front Immunol* 12:608680
- Iikuni N, Lam QLK, Lu L, Matarese G, La Cava A (2008) Leptin and inflammation. *Curr Immunol Rev* 4:70–79
- Ishfaq SM, Rashid H, Hussain Z, Arshad MI, Khan JA (2019) Adiponectin and PPAR: a setup for intricate crosstalk between obesity and non-alcoholic fatty liver disease. *Rev Endocr Metab Disord* 20:253–261
- Itoh N (2014) FGF21 as a hepatokine, adipokine, and myokine in metabolism and diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5:107
- Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM (2006) Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444:840–846
- Kanda H, Tateya S, Tamori Y et al (2006) MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 116:1494–1505
- Kelpe CL, Moore PC, Parazzoli SD, Wicksteed B, Rhodes CJ, Poitout V (2003) Palmitate inhibition of insulin gene expression is mediated at the transcriptional level via ceramide synthesis. *J Biol Chem* 278:30015–30021
- Korda M, Kubant R, Patton S, Malinski T (2008) Leptin-induced endothelial dysfunction in obesity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295:H1514–H1521
- Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T (2010) Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem* 285:17442–17452
- Kosari S, Rathner JA, Badoer E (2012) Central resistin enhances renal sympathetic nerve activity via phosphatidylinositol 3-kinase but reduces the activity to brown adipose tissue via extracellular signal-regulated kinase 1/2. *J Neuroendocrinol* 24:1432–1439

- Lambernd S, Taube A, Schober A, Platzbecker B, Görgens SW, Schlich R, Jeruschke K, Weiss J, Eckardt K, Eckel J (2012) Contractile activity of human skeletal muscle cells prevents insulin resistance by inhibiting pro-inflammatory signalling pathways. *Diabetologia* 55:1128–1139
- Lang F, Ullrich S, Gulbins E (2011) Ceramide formation as a target in beta-cell survival and function. *Expert Opin Ther Targets* 15:1061–1071
- Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J et al (2013) Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 500:541–546
- Leandro A, Queiroz M, Azul L, Seça R, Sena CM (2021) Omentin: a novel therapeutic approach for the treatment of endothelial dysfunction in type 2 diabetes. *Free Radic Biol Med* 162:233–242
- Ling H, Fabbri M, Calin GA (2013) MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nat Rev Drug Discov* 12:847–865
- Liu J, Jiang M, Deng S et al (2018) miR-93-5p-containing exosomes treatment attenuates acute myocardial infarction-induced myocardial damage. *Mol Ther Nucleic Acids* 11:103–115
- Liu Y, Vu V, Sweeney G (2019) Examining the potential of developing and implementing use of adiponectin-targeted therapeutics for metabolic and cardiovascular diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)* 10:842
- Liu F, Fang S, Liu X et al (2020) Omentin-1 protects against high glucose-induced endothelial dysfunction via the AMPK/PPAR δ signaling pathway. *Biochem Pharmacol* 174:113830
- Liu Y, Dou X, Zhou W-Y et al (2021) Hepatic SENP2 controls systemic metabolism via SUMOylation-dependent regulation of liver-adipose tissue crosstalk. *Hepatology*. <https://doi.org/10.1002/hep.31881>
- Loomba R, Seguritan V, Li W et al (2017) Gut microbiome-based metagenomic signature for non-invasive detection of advanced fibrosis in human nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Metab* 25:1054–1062.e5
- MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A (2001) Rapid secretion of interleukin-1 β by microvesicle shedding. *Immunity* 15:825–835
- Madara JL, Stafford J (1989) Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest* 83:724–727
- Maedler K, Oberholzer J, Bucher P, Spinas GA, Donath MY (2003) Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic beta-cell turnover and function. *Diabetes* 52:726–733
- Moretti CH, Schiffer TA, Li X, Weitzberg E, Carlström M, Lundberg JO (2021) Germ-free mice are not protected against diet-induced obesity and metabolic dysfunction. *Acta Physiol (Oxf)* 231: e13581
- Nakamura K, Fuster JJ, Walsh K (2014) Adipokines: a link between obesity and cardiovascular disease. *J Cardiol* 63:250–259
- Niersmann C, Carstensen-Kirberg M, Maalmi H, Holleczeck B, Roden M, Brenner H, Herder C, Schöttker B (2020) Higher circulating omentin is associated with increased risk of primary cardiovascular events in individuals with diabetes. *Diabetologia* 63:410–418
- Oh K-J, Lee DS, Kim WK, Han BS, Lee SC, Bae K-H (2016) Metabolic adaptation in obesity and type II diabetes: myokines, adipokines and hepatokines. *Int J Mol Sci* 18:E8
- Ohashi K, Ouchi N, Sato K, Higuchi A, Ishikawa T, Herschman HR, Kihara S, Walsh K (2009) Adiponectin promotes revascularization of ischemic muscle through a cyclooxygenase 2-dependent mechanism. *Mol Cell Biol* 29:3487–3499
- Ouchi N, Kihara S, Arita Y et al (2000) Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation* 102:1296–1301
- Pedersen BK, Febbraio MA (2012) Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol* 8:457–465
- Rahmouni K, Sigmund CD, Haynes WG, Mark AL (2009) Hypothalamic ERK mediates the anorectic and thermogenic sympathetic effects of leptin. *Diabetes* 58:536–542

- Reijrink M, de Boer SA, Spoor DS et al (2019) Visceral adipose tissue volume is associated with premature atherosclerosis in early type 2 diabetes mellitus independent of traditional risk factors. *Atherosclerosis* 290:87–93
- Roager HM, Vogt JK, Kristensen M et al (2019) Whole grain-rich diet reduces body weight and systemic low-grade inflammation without inducing major changes of the gut microbiome: a randomised cross-over trial. *Gut* 68:83–93
- Röhrborn D, Wronkowitz N, Eckel J (2015) DPP4 in diabetes. *Front Immunol* 6:386
- Romacho T, Elsen M, Röhrborn D, Eckel J (2014) Adipose tissue and its role in organ crosstalk. *Acta Physiol (Oxf)* 210:733–753
- Romacho T, Sell H, Indrakusuma I et al (2020a) DPP4 deletion in adipose tissue improves hepatic insulin sensitivity in diet-induced obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 318:E590–E599
- Romacho T, Valencia I, Ramos-González M et al (2020b) Visfatin/eNAMPT induces endothelial dysfunction in vivo: a role for toll-like receptor 4 and NLRP3 inflammasome. *Sci Rep* 10:5386
- Sato FT, Yap YA, Crisma AR et al (2020) Tributyrin attenuates metabolic and inflammatory changes associated with obesity through a GPR109A-dependent mechanism. *Cell* 9:E2007
- Schlich R, Willems M, Greulich S, Ruppe F, Knoefel WT, Ouwens DM, Maxhera B, Lichtenberg A, Eckel J, Sell H (2013) VEGF in the crosstalk between human adipocytes and smooth muscle cells: depot-specific release from visceral and perivascular adipose tissue. *Mediators Inflamm* 2013:982458
- Schulze PC, Biolo A, Gopal D, Shahzad K, Balog J, Fish M, Siwik D, Colucci WS (2011) Dynamics in insulin resistance and plasma levels of adipokines in patients with acute decompensated and chronic stable heart failure. *J Card Fail* 17:1004–1011
- Sell H, Blüher M, Klötting N et al (2013) Adipose dipeptidyl peptidase-4 and obesity: correlation with insulin resistance and depot-specific release from adipose tissue in vivo and in vitro. *Diabetes Care* 36:4083–4090
- Simonds SE, Pryor JT, Ravussin E et al (2014) Leptin mediates the increase in blood pressure associated with obesity. *Cell* 159:1404–1416
- Skotland T, Sagini K, Sandvig K, Llorente A (2020) An emerging focus on lipids in extracellular vesicles. *Adv Drug Deliv Rev* 159:308–321
- Syed I, Rubin de Celis MF, Mohan JF, Moraes-Vieira PM, Vijayakumar A, Nelson AT, Siegel D, Saghatelian A, Mathis D, Kahn BB (2019) PAHSAs attenuate immune responses and promote β cell survival in autoimmune diabetic mice. *J Clin Invest* 129:3717–3731
- Taube A, Lambernd S, van Echten-Deckert G, Eckardt K, Eckel J (2012) Adipokines promote lipotoxicity in human skeletal muscle cells. *Arch Physiol Biochem* 118:92–101
- Thomou T, Mori MA, Dreyfuss JM et al (2017) Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues. *Nature* 542:450–455
- Trayhurn P, Wood IS (2004) Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 92:347–355
- Turer AT, Scherer PE (2012) Adiponectin: mechanistic insights and clinical implications. *Diabetologia* 55:2319–2326
- Vallejo S, Romacho T, Angulo J, Villalobos LA, Cercas E, Leivas A, Bermejo E, Carraro R, Sánchez-Ferrer CF, Peiró C (2011) Visfatin impairs endothelium-dependent relaxation in rat and human mesenteric microvessels through nicotinamide phosphoribosyltransferase activity. *PLoS One* 6:e27299
- Viereck J, Thum T (2017) Circulating noncoding RNAs as biomarkers of cardiovascular disease and injury. *Circ Res* 120:381–399
- Villard A, Boursier J, Andriantsitohaina R (2021) Bacterial and eukaryotic extracellular vesicles and nonalcoholic fatty liver disease: new players in the gut-liver axis? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 320:G485–G495
- Wang ZV, Scherer PE (2016) Adiponectin, the past two decades. *J Mol Cell Biol* 8:93–100
- Wang H, Cao J, Su J-B, Wang X-Q, Wang X, Zhang D-M, Wang X-H (2021a) Serum fatty acid-binding protein 4 levels and responses of pancreatic islet β -cells and α -cells in patients with type 2 diabetes. *Diabetol Metab Syndr* 13:70

- Wang M, Li L, Chen Y, Lian G, Wang J, Zhang J, Shan K, Shang L, Tian F, Jing C (2021b) Role of gut microbiome and microbial metabolites in alleviating insulin resistance after bariatric surgery. *Obes Surg* 31:327–336
- Wen B, Combes V, Bonhoure A, Weksler BB, Couraud P-O, Grau GER (2014) Endotoxin-induced monocytic microparticles have contrasting effects on endothelial inflammatory responses. *PLoS One* 9:e91597
- Whitham M, Parker BL, Friedrichsen M et al (2018) Extracellular vesicles provide a means for tissue crosstalk during exercise. *Cell Metab* 27:237–251.e4
- WHO (2016) Obesity and overweight [Internet]. [Cited 2021 May 25]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- Willis SA, Sargeant JA, Thackray AE, Yates T, Stensel DJ, Aithal GP, King JA (2019) Effect of exercise intensity on circulating hepatokine concentrations in healthy men. *Appl Physiol Nutr Metab* 44:1065–1072
- Willis SA, Sargeant JA, Yates T et al (2020) Acute hyperenergetic, high-fat feeding increases circulating FGF21, LECT2, and Fetuin-A in healthy men. *J Nutr* 150:1076–1085
- Wronkowitz N, Romacho T, Sell H, Eckel J (2014) Adipose tissue dysfunction and inflammation in cardiovascular disease. *Front Horm Res* 43:79–92
- Yehualashet AS, Yikna BB (2021) Microbial ecosystem in diabetes mellitus: consideration of the gastrointestinal system. *Diabetes Metab Syndr Obes* 14:1841–1854
- Zacharia A, Saidenberg D, Mannully CT et al (2020) Distinct infrastructure of lipid networks in visceral and subcutaneous adipose tissues in overweight humans. *Am J Clin Nutr* 112:979–990

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) **Megan Piquet**
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées
pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant(e) le **27 / 10 / 2023**

**Cet engagement de non plagiat doit être signé et joint
à tous les rapports, dossiers, mémoires.**

Présidence de l'université
40 rue de rennes - BP 73532
49035 Angers cedex
Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00



Titre : Caractérisation des vésicules extracellulaires issues du cil primaire et leur implication dans le développement de l'athérosclérose

Mots clés : Cil Primaire, Vésicules extracellulaires, Cellules endothéliales, Athérosclérose

Résumé : Le cil primaire est présent à la surface de la plupart des cellules de l'organisme. Au niveau vasculaire, il est particulièrement important dans les cellules endothéliales, où il détecte les contraintes de cisaillement et régule de nombreux aspects de la fonction vasculaire. Dans le cas de pathologies telles que l'athérosclérose, une perte ou une diminution du nombre et de la longueur des cils est observée. Nous démontrons ici que la perte de cils primaires, provoquée par des traitements pharmacologiques, résulte en partie de la libération d'EVs à partir de ces cils. Ces EVs ont été caractérisées et nous montrons qu'elles sont enrichies en marqueurs des cils primaires. De manière intéressante, ces EVs ont été associées à une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les cellules endothéliales, sans altérer la biodisponibilité du NO.

De plus, nous avons observé que les EVs provenant de cellules ciliées augmentaient la migration cellulaire et empêchaient l'augmentation de la perméabilité des cellules endothéliales induite par le TNF- α . Enfin, nous montrons que les EVs de patients atteints du syndrome d'apnée obstructive du sommeil (SAOS) présentant une dysfonction endothéliale expriment davantage de marqueurs des cils primaires, suggérant que ces EVs pourraient servir de biomarqueurs de la dysfonction endothéliale. Dans l'ensemble, ces résultats soulignent le rôle des EVs des cils primaires dans l'altération de la fonction endothéliale associée à une augmentation du stress oxydatif et dans leur utilisation potentielle en tant que biomarqueurs des maladies cardiovasculaires.

Title : Characterization of primary cilia-derived extracellular vesicles and their involvement in the development of atherosclerosis

Keywords : Primary cilia, Extracellular vesicles, Endothelial cells, Atherosclerosis

Abstract : The primary cilium is present on the surface of most cells in the body. In the vascular system, it is particularly important in endothelial cells, where it senses shear stress and regulates many aspects of vascular function. In pathologies such as atherosclerosis, a loss or reduction in the number and length of cilia is observed. Here, we demonstrate that the loss of primary cilia, induced by pharmacological treatments, results in part from the release of EVs from these cilia. These EVs have been characterized and we show that they are enriched in primary cilia markers. Interestingly, these EVs were associated with increased production of reactive oxygen species (ROS) in endothelial cells, without altering NO bioavailability.

Furthermore, we observed that ciliated cell-derived EVs increased cell migration and prevented the TNF- α -induced increase in endothelial cell permeability. Finally, we show that EVs from obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) patients with endothelial dysfunction express more primary cilia markers, suggesting that these EVs could serve as biomarkers of endothelial dysfunction. Taken together, these results highlight the role of primary cilia EVs in impaired endothelial function associated with increased oxidative stress, and their potential use as biomarkers of cardiovascular disease.