

Thèse de doctorat de

L'UNIVERSITE DE NANTES

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : « Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie »

Par

Alexandre GLEMAIN

Micro-ARNs de neutrophiles dans les vascularites associées aux ANCA

Thèse présentée et soutenue à « Nantes », le « 07/12/2020 »

Unité de recherche : ITUN-CRTI INSERM UMR 1064

Rapporteurs avant soutenance :

Noémie JOURDE-CHICHE Professeur des Universités, C2VN INSERM1263 / INRAE1260, Aix Marseille Université, France
Georges-Alexandre KARRAS Professeur des Universités, AP-HP, Université de Paris, France

Composition du Jury :

Président : Noémie JOURDE-CHICHE
Examineurs : Angélique GALVANI Maître de Conférence des Universités, RMeS UMR 1229, Université de Nantes, France
Olivier BLANC-BRUDE Chargé de Recherches HDR, PARCC INSEM U970, Université de Paris, France

Dir. de thèse : Fadi FAKHOURI Professeur des Universités, CRTI UMR 1064, Université de Nantes, France
Sarah BRUNEAU Docteur en Biologie, CRTI UMR 1064, Université de Nantes, France

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord pour le temps et leur expertise les jurés : Pr Jourde-Chiche, Pr Karras, Dr Galvani, Dr Blanc-Brude, qui me font l'honneur d'avoir accepté de juger ce manuscrit et cette soutenance.

Un grand merci à Fadi et Sarah, pour m'avoir accueilli dans leur équipe, et pour m'avoir formé, accompagné avec bienveillance tout au long de mon passage au CRTI. Merci également à ceux qui ont participé à ces travaux d'une façon ou d'une autre, en particulier les membres de l'équipe 3, et tout spécialement Mélanie. Pour leur aide technique précieuse, je me dois de citer la contribution de Bernard Martinet, Gwennan André-Grégoire, Julie Gavard, Antoine Néel, ainsi que Véro, Delphine, Amédée et Kévin, le plus cool des stagiaires. Je pense également à celles et ceux qui ont pu apporter une aide ponctuelle mais précieuse ou partagé un moment sympa en pièce de culture, et que je n'ai pas la place de citer correctement ici.

Parce qu'il y a une vie à côté, merci à mes amis qui ont égayé les journées au labo et les soirées en dehors, et là je me dois de citer en premier les bros Pierre et Malo, sans qui ces années auraient eu beaucoup, beaucoup moins de saveur. Merci aussi à la team terrasse, toujours en embuscade : Marine, Marion, Alice, Anaïs, Eléa, Nathan, Kévin. Merci à tous mes amis en dehors du labo : Etienne et Gildas mes frères d'adoption, Jean mon ex-colloc génial, à Emilie et Pierre (et ce grand fou de Romain), à Laurie, Eglantine et Rima, à Guigui, Chloé, Marie, Kévin, Elsa, Jules, Cécile, Tim, Coco, au brave Clément, à Corentin le boomer, et à tous les autres, pour votre présence, vos sourires.

Enfin, je voudrais remercier ma famille, pour leur soutien sans failles. Toute la famille Teyssier, qui est un vrai trésor, et en particulier Catherine qui m'a aidé à démarrer tout ça. Merci à Sylvie pour m'avoir aidé tout au long de mes études. Une pensée également pour Séverine, Marc, Jean-Christophe, Julia, Rose, Nathan, Alain, Annie, et aux deux Alexis.

Merci infiniment à mes parents et à mes sœurs, vous êtes des personnes exceptionnelles, et je n'aurais rien fait sans votre soutien. Laura, tu es mon rayon de soleil, merci pour ton amour inconditionnel, tu es tout pour moi, merci pour tout.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	12
I – LES VASCULARITES ASSOCIEES AUX ANCA (VAA)	13
I-1) DESCRIPTION DES FORMES DE VAA	13
I-1-a) Définitions	13
I-1-b) Classification	14
I-1-c) Epidémiologie	15
I-2) DIAGNOSTIC ET TRAITEMENT	17
I-2-a) Symptômes et Diagnostic	17
I-2-b) Suivi & Traitements	21
I-3) PHYSIOPATHOLOGIE	24
I-3-a) Facteurs déclenchants environnementaux	24
I-3-b) Facteurs génétiques et épigénétiques	26
I-4) ANCA ET ACTIVATION DES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES	28
I-4-a) Les ANCA	28
I-4-b) Les polynucléaires neutrophiles	31
I-4-c) Priming des neutrophiles	34
I-4-d) Activation des neutrophiles par les ANCA	36
I-4-e) Signalisation de l'activation	37
I-5) INDUCTION DE LESIONS ENDOTHELIALES DANS LES VAA	39
I-5-a) Les cellules endothéliales	39
I-5-b) Rôle des neutrophiles dans l'atteinte endothéliale	39
I-5-c) Rôle des monocytes et macrophages dans les VAA	41
I-5-d) Rôle des lymphocytes	42
II – VESICULES EXTRACELLULAIRES ET TRANSFERT DE MIRNAS	45
II-1) VESICULES EXTRACELLULAIRES	45
II-1-a) Définitions & classification	45
II-1-b) Biogenèse des exosomes	47
II-1-c) Biogenèse des microparticules	51
II-1-d) Biogenèse des corps apoptotiques	52
II-1-e) Composition des VE	53
II-1-f) Fonctions des VE	55
II-1-g) Purification des VE	58
II-1-h) Les VE et l'immunité	62
II-1-i) Applications pronostiques et thérapeutiques des VE	64
II-2) MICRO-ARNS	66
II-2-a) Définition	66
II-2-b) Biosynthèse des miARN	67
II-2-c) Mécanismes d'action des miARN	70
II-3) PHYSIOPATHOLOGIE DU TRANSFERT DE MIRNA	72
II-3-a) Physiologie, développement et pathologie	72
II-3-b) Utilisation pronostique des miARNs comme biomarqueurs	76
II-3-c) Utilisation thérapeutique du transfert de miARNs	77
II-3-d) Les cellules endothéliales : des cibles privilégiées du transfert de micro-ARN	81
II-3-e) Le transfert de micro-ARN entre neutrophiles et cellules endothéliales : un rôle des miARNs dans les VAA ?	84

III - OBJECTIFS DE LA THESE	86
III-1) HYPOTHESE DE TRAVAIL	86
III-2) OBJECTIFS.....	87
RESULTATS	91
ARTICLE : NEUTROPHIL-DERIVED EXTRACELLULAR VESICLES INDUCE ENDOTHELIAL DAMAGE THROUGH THE TRANSFER OF MICRORNAS IN ANCA-ASSOCIATED VASCULITIS	92
ABSTRACT	94
INTRODUCTION	96
RESULTS	98
DISCUSSION	117
METHODS	121
REFERENCES	126
SUPPLEMENTAL MATERIAL	128
<i>SUPPLEMENTAL METHODS</i>	128
<i>SUPPLEMENTAL REFERENCES</i>	132
<i>SUPPLEMENTAL FIGURES AND TABLES</i>	133
DISCUSSION	145
I - LE TRANSFERT DE MIR-223, MIR-142-3P ET MIR-451 AUX CE MICROVASCULAIRES	145
II - IMPACT DU TRANSFERT DE MICRO-ARNs ISSUS DE NEUTROPHILES ACTIVES SUR LES REPONSES ENDOTHELIALES	147
III – LE TRANSFERT DE MICRO-ARNs DANS LES VAA : UN PHENOMENE LOCAL ?	151
IV – UN TRANSFERT DE MICRO-ARNs AUX CE PAR LES VE DE MONOCYTES ?	154
V – IMPLICATIONS PATHOLOGIQUES DU TRANSFERT DE MIR-142-3P ET MIR-451 & PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES ET DIAGNOSTIQUES	156
CONCLUSION.....	162
REFERENCES.....	164

LISTE DES ABREVIATIONS

ADCC : *antibody-dependent cellular cytotoxicity* (cytotoxicité anticorps-dépendante)

ADN : acide désoxyribonucléique

Akt : *Akt1* ou *protein kinase B*

APHP : Assistance Publique -Hôpitaux de Paris

ARN(m) : acide ribonucléique (messenger)

ANCA : *anti-neutrophil cytoplasm antibody* (anticorps anticytoplasme des neutrophiles)

BPCO : bronchopneumopathie chronique obstructive

CCL2/MCP1 : chemokine ligand 2 / monocyte chemoattractant protein 1

CD... : cluster de différenciation

CD : cellule dendritique

CE : cellule endothéliale

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

Covid-19 : maladie à coronavirus 2019

CR : *complement receptor* (récepteur de molécules du complément)

CRP : *C reactive protein* (protéine C réactive)

CXCL : C-X-C motif ligand

DAMP : *danger associated molecular pattern* (motif moléculaire associé au danger)

DGK : diacylglycérol kinase

EBV : Epstein-Barr virus

EGFR : *epidermal growth factor receptor* (récepteur au facteur de croissance épidermal)

EGPA : *eosinophilic granulomatosis with polyangiitis* (granulomatose éosinophilique avec polyangéite)

ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay* (dosage d'immunoabsorption par enzyme liée)

eNOS : endothelial nitric oxide synthase

ERK : extracellular signal regulated kinase

ESCRT : endosomal sorting complexes required for transport

Fc : fragment cristallisable (des anticorps)

FcR : récepteur aux fragments Fc des anticorps

fMLP : N-formyl-méthionyl-Leucyl-phénylalanine

GPA : *granulomatosis with polyangiitis* (granulomatose avec polyangéite)

GPC1 : glypican-1

GVHD : *graft versus host disease* (maladie du greffon contre l'hôte)

HCV : virus de l'hépatite C

HDMEC : human endothelial dermal microvascular endothelial cells

H&E : hématoxyline et éosine

HLA : human leukocyte antigen

ICAM : *intercellular adhesion molecule* (molécule d'adhésion intercellulaire)

Ig : immunoglobuline

IL : interleukine

ILV : *intraluminal vesicle* (vésicule intra lumaire)

ISCT : international society for cell & gene therapy

ISEV : international society for extracellular vesicles

LDL : *low-density lipoprotein* (lipoprotéine de basse densité)

LNA : *locked nucleic acid* (acide nucléique bloqué)

IncARN : long ARN non codant

LPS : lipopolysaccharide

Mac-1 : macrophage 1 antigen (= CR3 = CD11b+CD18)

MAPK : mitogen-associated protein kinase

MEC : matrice extra-cellulaire

miARN : micro-ARN

MIF : facteur d'inhibition de la migration des macrophages

miRISC : miRNA-induced silencing complex

MPA : *microscopic polyangiitis* (polyangéite microscopique)

MPO : myéloperoxidase

MSC : *mesenchymal stem cell* (cellule souche mésenchymateuse)

mTOR : mechanistic target of rapamycin

MVB : *multivesicular body* (corps multivésiculaire)

NB1 : autre nom du CD177

(N)ET : (neutrophil) extracellular trap

NK : natural killer

nt : nucléotide

PABC : polyA binding protein C

PAMP : *pathogen associated molecular pattern* (motif moléculaire associé aux pathogènes)

PAS : periodic acid schiff

PI3K : phosphoinositide 3 kinase

PR3 : protéinase 3

primiR : primary microRNA transcript

PRR : *pattern recognition receptor* (récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires)

PTU : propylthiouracile

qPCR : quantitative polymerase chain reaction

RICTOR : rapamycin-insensitive companion of mTOR

ROS : *reactive oxygen species* (espèces réactives de l'oxygène)

(v/t)SNAREs : (vesicular/target) soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor

TEM : lymphocyte T effecteur mémoire

Th17 : lymphocyte T auxiliaire (helper) caractérisé par la production d'IL-17

TLDA : Taqman Low Density Array

TLR : *Toll-like receptor* (récepteurs Toll-like)

TNF : *tumor necrosis factor* (facteur de nécrose tumorale)

Treg : lymphocyte T régulateur

TRPS : tunable resistive pulse sensing

UTR : *untranslated region* (région non transcrite)

VAA : vascularite associée aux ANCA

VE : vésicule extracellulaire

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

INTRODUCTION :

Tableau I - Classification des formes de vascularites associées aux ANCA

Figure 1 - Marquages c-ANCA et p-ANCA par immunofluorescence

Figure 2 - Observation microscopique de lésions histologiques observées au sein de la biopsie rénale d'un patient atteint de vascularite associée aux ANCA

Figure 3 - Résumé des facteurs déclenchants des vascularites associées aux ANCA

Figure 4 - Recrutement, activation et fonction des neutrophiles lors de l'inflammation

Figure 5 - Pré-activation ou Priming des neutrophiles

Figure 6 - Signalisation de l'activation des neutrophiles par les ANCA

Figure 7 - Schéma physiopathologique simplifié des VAA

Figure 8 - Les sous-types de vésicules extracellulaires

Figure 9 - Séparation des VE selon la méthode d'ultracentrifugations différentielles

Figure 10 - Tri Immunomagnétique des petites VE

Figure 11 - Enrichissement en VE d'un milieu de culture par précipitation

Figure 12 - Mécanismes de formation et de sécrétion des exosomes

Figure 12 - Mécanismes d'internalisation des vésicules extracellulaires

Figure 13 - Biosynthèse des micro-ARNs

Figure 14 - Modes d'actions des micro-ARNs

Figure 15 - Exemples de transfert de micro-ARNs dans des contextes physiologiques et pathologiques

Figure 16 - Hypothèse de Travail : Les neutrophiles activés par les ANCA produisent des VE capables de transférer des miARNs aux cellules endothéliales, participant aux lésions vasculaires observées au cours des VAA

Figure 17 - Description des modèles *in vitro* utilisés lors de notre étude

RESULTATS - ARTICLE :

Figure 0. Visual Abstract

Figure 1. Neutrophil activation induces the release of extracellular vesicles that ensure the transfer of miR-223, miR-142-3p and miR-451 to microvascular endothelial cells.

Figure 2. miR-142-3p and miR-451 induce profound microvascular endothelial cell damage.

Figure 3. miR-142-3p inhibits critical genes and pathways in microvascular endothelial cells.

Figure 4. miR-142-3p and miR-451 induce the expression of pro-inflammatory cytokines and chemokines by microvascular endothelial cells but are not the sole players of EV-induced inflammation.

Figure 5. Extracellular vesicles released by ANCA-activated neutrophils induce microvascular EC apoptosis in the presence of TNF α through miR-142-3p-dependent mechanisms.

Figure 6. miR-223, miR-142-3p and miR-451 are augmented in kidney biopsies from patients with active ANCA-associated vasculitis.

Table 1: Clinical and biological characteristics of patients with ANCA-Associated Vasculitis

Table 2: Clinical and biological characteristics of control patients with proliferative and non-proliferative glomerulonephritis

Figure S1. Extracellular vesicles released by activated neutrophils carry miR-223, miR-142-3p and miR-451

Figure S2. Extracellular vesicles released by PR3 ANCA-activated neutrophils can transfer miR-223, -142-3p and -451 to different types of endothelial cells.

Figure S3. Activation of neutrophils through stimulation of Fcγ receptors also induces the release of extracellular vesicles that carry miR-223, -142-3p and -451 and transfer them to microvascular endothelial cells.

Figure S4. Assessment of miR-223, miR-142-3p and miR-451 overexpression in HDMEC upon transfection of their specific miRNA mimics

Figure S5. miR-142-3p and miR-451 overexpression induce phenotypic changes in HDMEC

Figure S6. Overexpression of miR-223, -142-3p and -451 inhibits several signaling pathways in HDMEC

Figure S7. miR-142-3p and miR-451 induce the secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines by microvascular endothelial cells.

Figure S8. Antagomir-142-3p and -451 efficiently block the induction of proinflammatory chemokines and cytokines upon miR-142-3p and -451 overexpression in HDMEC.

Figure S9. Extracellular vesicles released by ANCA-activated neutrophils induce microvascular EC apoptosis in the presence of TNFα through miR-142-3p-dependent mechanisms.

Table S1. miRNAs identified as increased in HDMEC after co-incubation with neutrophil-derived EVs

Table S2. Analysis of genes regulated by miR-223, miR-142-3p and miR-451 in ECs

DISCUSSION/CONCLUSION :

Figure 18 - Identification des sous-populations de VE impliquées dans le transfert de miARN

Figure 19 - Diminution de l'expression de BCL-X suite à la transfection de miR-142-3p

Figure 20 - Les VE de monocytes activés par des ANCA transfèrent le miR-142-3p aux CE

Figure 21 - Expression du miR-449b au sein de neutrophiles de patients au moment du diagnostic et de la rémission

Figure 22 - Modèle de VAA à anti-PR3 chez la souris humanisées NSG-SGM3

Figure 23 - Modèle physiopathologique proposé

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I – LES VASCULARITES ASSOCIEES AUX ANCA (VAA)

I-1) Description des formes de VAA

I-1-a) Définitions

Les vascularites sont des affections pathologiques, inflammatoires des vaisseaux sanguins. Les lésions vasculaires peuvent toucher les vaisseaux de tous calibres, et compromettre ainsi la perfusion des organes en aval.

Les vascularites associées aux ANCA (VAA) sont un groupe de pathologies auto-immunes systémiques, résultant en une destruction inflammatoire et nécrosante des vaisseaux de faible diamètre (Jennette, 2013). Les VAA affectent des organes et tissus variés (reins, poumons et voies aériennes, peau, articulations, muscles, cœur, système nerveux...), en y causant des lésions et déficiences. Elles peuvent donc rapidement engager le pronostic vital des patients, en particulier dans les formes rénales (glomérulonéphrite) et pulmonaire. Les VAA sont des vascularites pauci-immunes, au cours desquelles une recherche par immunofluorescence de la présence d'IgG ne permet pas de mettre en évidence la présence de dépôts immuns au niveau des reins. Elles sont en revanche associées à la présence d'ANCA (*anti-neutrophil cytoplasm antibodies*) dans le sérum.

Les ANCA sont des auto-anticorps pathogéniques dirigés contre des cibles antigéniques exprimées classiquement au sein du cytoplasme des neutrophiles (van der Woude et al., 1985). Ces antigènes sont majoritairement la myéloperoxidase (MPO) et la protéinase 3 (PR3). D'autres antigènes minoritaires pouvant également être des cibles des ANCA (LAMP-2, lactoferrine, élastase, cathepsine G...) ont été décrits (Flint and Savage, 2012 ; Savige et al.,

2008). On connaît également l'existence de certaines formes de VAA « ANCA-négatives » (Falk and Jennette, 1988 ; Lüdemann et al., 1990) qui présentent un tableau clinique représentatif des VAA alors que la mise en contact de leur sérum avec des polynucléaires neutrophiles renvoie un signal faible voire une absence de signal en immunofluorescence (Khan et al., 2010 ; McCarthy et al., 2017).

I-1-b) Classification

La classification des VAA a évolué au fil du temps, et s'est d'abord basée sur des critères cliniques ou établis lors de l'autopsie, notamment la présence de granulomes nécrosants dès les années 30. Churg & Strauss ont décrit en 1951 une série de cas associant asthme sévère, hyperéosinophilie, granulomatose nécrosante et inflammatoire, lésions vasculaires, et symptômes rénaux (Churg and Strauss, 1951). La classification officielle de l'American College of Rheumatology est parue dès 1990 (Fries et al., 2010), et une nomenclature des formes de vascularites a été établie par le groupe de Chapel Hill en 1994 (Jennette et al., 1994). Cette dernière a depuis été révisée en 2012 et 2018 (Jennette et al., 2013 ; Sunderkötter et al., 2018), et fait l'objet d'un consensus international quant à la dénomination des VAA.

Ainsi, la standardisation des critères cliniques et des noms des sous-types de vascularites permet de distinguer trois types de VAA, dont les caractéristiques sont résumées au sein du **Tableau I** :

- **La polyangéite microscopique** (*MPA : microscopic polyangiitis*)

La MPA est caractérisée par une glomérulonéphrite nécrosante associée à une capillarite pulmonaire, sans inflammation granulomateuse.

- **Granulomatose avec polyangéite** (*GPA : Granulomatosis with polyangiitis, ex-Wegener*)

La GPA induit principalement une glomérulonéphrite nécrosante, ainsi qu'une granulomatose nécrosante et une inflammation (notamment au sein des voies aériennes).

- **Granulomatose éosinophilique avec polyangéite** (*EGPA : Eosinophilic granulomatosis with polyangiitis, ex-Churg & Strauss*)

L'EGPA résulte en une granulomatose nécrosante et inflammatoire, dont l'infiltrat est riche en éosinophiles, touchant là aussi les voies aériennes. Elle est presque toujours liée à un terrain asthmatique et est principalement caractérisée par une éosinophilie.

I-1-c) Epidémiologie

Les VAA sont des pathologies rares. On estime leur incidence en Europe à 15 par million, avec un pic situé autour de 60 ans (Watts et al., 2015). En effet, les VAA sont en majorité des pathologies du sujet âgé, la plus forte incidence étant observée chez des patients de plus de 75 ans (Mohammad et al., 2009). La survie à 5 ans des VAA est évaluée entre 60 et 90% selon la gravité de la pathologie (Guillevin et al., 1996, 2011).

Une étude menée sur une population urbaine française estime la prévalence pour un million de la MPA à 25,1, celle de l'EGPA à 10,7 et celle de la GPA à 23,7, suggérant en outre une plus forte susceptibilité génétique des populations d'origine caucasienne (Mahr et al., 2004).

	GPA	MPA	EGPA
Dénomination	<i>Granulomatose avec Polyangéite Ex-Wegener</i>	<i>Polyangéite Microscopique</i>	<i>Granulomatose Eosinophilique avec Polyangéite Ex-Churg & Strauss</i>
Prévalence <i>(Cas pour 1 million)</i>	2,3-146	9,0-94,0	2,0-22,3
Âge de déclaration de la pathologie <i>(Années)</i>	45-65	55-75	38-54
Organes et tissus touchés	Vaisseaux de petit et moyen calibre <i>-Vascularite nécrosante</i> Voies aériennes supérieures <i>-Inflammation nécrosante granulomateuse</i> Rein <i>-Glomérulonéphrite nécrosante</i>	Vaisseaux de petit calibre <i>-Vascularite nécrosante</i> Rein <i>-Glomérulonéphrite nécrosante</i> Poumons <i>-Capillarite sans inflammation granulomateuse</i>	Vaisseaux de petit et moyen calibre <i>-Vascularite nécrosante -Eosinophilie</i> Voies aériennes <i>-Inflammation granulomateuse nécrosante avec infiltration éosinophilique -Asthme</i> Rein <i>-Glomérulonéphrite</i>
Spécificité des ANCA <i>(Fréquence)</i>	PR3-ANCA : 65-75% <i>MPO-ANCA : 20-30%</i> <i>ANCA négatifs : 5%</i>	<i>PR3-ANCA : 20-30%</i> MPO-ANCA : 55-65% <i>ANCA négatifs : 5-10%</i>	<i>PR3-ANCA : <5%</i> MPO-ANCA : 30-40% ANCA négatifs : 55-65%
Granulocyte majoritairement impliqué	<i>Neutrophile</i>	<i>Neutrophile</i>	<i>Eosinophile</i>

(Kitching et al., 2020)

Tableau I – Classification des formes de vascularites associées aux ANCA

Adapté d'après Kitching et al., 2020

I-2) Diagnostic et traitement

I-2-a) Symptômes et Diagnostic

Les VAA occasionnent des symptômes généraux aspécifiques : altération de l'état général, fatigue, amaigrissement, fièvre, arthralgies/myalgies, hyperleucocytose, CRP élevée (>5mg/L). Ce tableau peut être complété de signes pouvant être observés au niveau cutané (livedo, purpura vasculaire palpable et infiltré, nécrose cutanée voire gangrène ou ulcère digital), respiratoire (dyspnées, toux, hémoptysies, infiltrats pulmonaires et hémorragie intra-alvéolaire), digestif (diarrhées sanglantes, douleurs abdominales), oculaire (épisclérite), rénal (glomérulonéphrite rapidement progressive avec insuffisance rénale aigüe) ou neurologique (névrites et neuropathies). D'un point de vue histologique, la glomérulonéphrite s'accompagne de prolifération extra-capillaire ainsi que d'une nécrose de la paroi des capillaires glomérulaires, avec une absence de dépôts d'immunoglobulines.

Certains signes permettent de distinguer les sous-types de VAA. La GPA, à l'inverse de la MPA, est caractérisée par des symptômes non rénaux impliquant les voies aériennes supérieures (signes ORL à type de rhinite, sinusite, otite, ulcérations), le système pulmonaire (présence de nodules) et la présence de manifestations ophtalmologiques (conjonctivite, sclérite, épisclérite, pseudo-tumeur). L'EGPA est caractérisée par des granulomes inflammatoires péri- et extra-vasculaires riches en éosinophiles, une association systématique avec l'asthme et un terrain allergique. Les lésions vasculaires associées peuvent également atteindre des artères et veines de petit calibre. Les atteintes pulmonaires (pneumopathie, hémorragies intra-alvéolaire) et surtout cardiaques y sont fréquentes et potentiellement mortelles. Le bilan sanguin évoque un syndrome inflammatoire caractérisé par une hyperleucocytose et notamment une éosinophilie (>1G/L).

L'identification de la spécificité des ANCA (anti-PR3 ou anti-MPO) par ELISA permet également d'orienter le diagnostic vers la GPA (majoritairement à anti-PR3) ou l'EGPA et la MPA (anti-MPO dans 70% des cas de MPA et 40% d'EGPA). Une technique alternative d'immunofluorescence ne permettant pas d'identifier les antigènes cibles mais les zones ciblées par les ANCA peut également aiguiller vers le diagnostic (**Figure 1**) : GPA si le marquage est cytoplasmique (de type c-ANCA, anti-PR3), EGPA ou MPA s'il est péri-nucléaire (p-ANCA, anti-MPO). La spécificité des auto-anticorps peut avoir un intérêt pronostique. En effet les patients PR3+ ont deux fois plus de risque de rechute que les MPO+ (Lionaki et al., 2012), ainsi qu'un déclin de la fonction rénale plus rapide (Franssen et al., 2000 ; Walsh et al., 2012). De même, les patients EGPA ANCA-positifs sont davantage susceptibles de rechuter et ont une mortalité supérieure (Comarmond et al., 2013), et les patients MPO+ ont davantage de risques de décéder d'une pathologie cardiovasculaire que les PR3+ (Wallace et al., 2019).

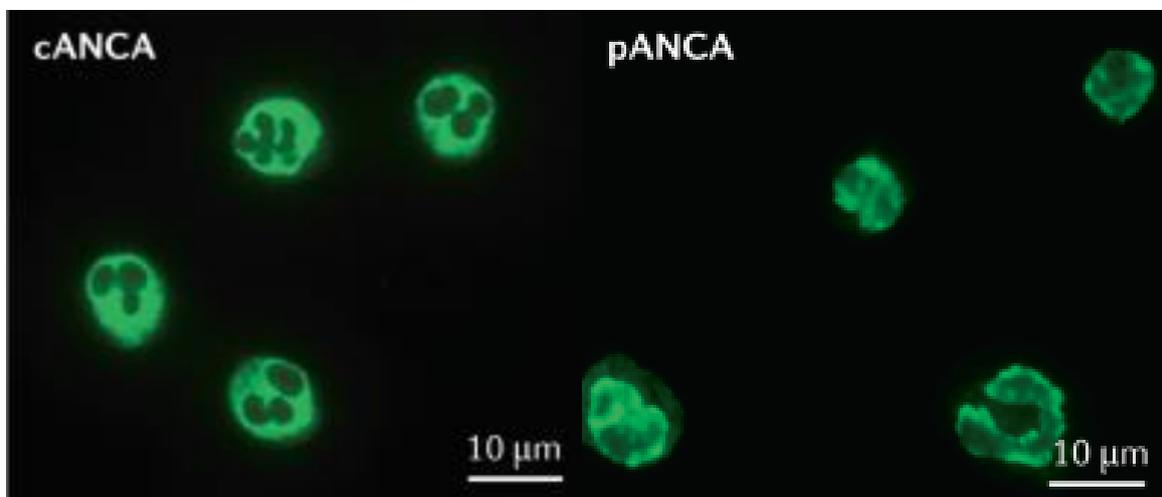


Figure 1 – Marquages c-ANCA et p-ANCA par immunofluorescence (Kitching et al., 2020)

Marquages en p-ANCA (péri-nucléaire, associé aux anti-MPO) et c-ANCA (cytoplasmique, associé aux anti-PR3). Les neutrophiles sont fixés puis incubés avec le sérum du patient, révélé ensuite par des anticorps secondaires anti-IgG humaines couplés à une molécule fluorescente. Reproduit d'après Kitching & al., 2010

Les recommandations françaises et européennes (Guillevin and Pagnoux, 2007 ; Mukhtyar et al., 2009 ; Sznajd and Mukhtyar, 2016 ; Yates et al., 2016) préconisent le recours à la biopsie, si l'état général du patient le permet, afin de diagnostiquer une poussée initiale ou une rechute. Si la biopsie rénale suivie d'une étude histologique constitue le *gold standard* de la détection des formes rénales de VAA, elle n'est pas forcément nécessaire au diagnostic si le patient souffre de symptômes formant un tableau clinique évocateur, associé à une détection d'ANCA circulants. Une biopsie rénale peut être réalisée dans un but diagnostique mais également afin d'adapter le traitement et d'établir un pronostic. En effet, il est décrit que la présence de lésions rénales fibrotiques étendues diminue l'efficacité de ces traitements. Pour toute biopsie, et *a fortiori* un prélèvement pulmonaire à la morbi-mortalité élevée, le bénéfice diagnostique doit être mis en parallèle avec le risque couru par le patient, d'autant que d'autres sites peuvent être moins complexes à biopsier, moins dangereux (biopsie nasosinusienne) et plus rentables (biopsie (neuro)-musculaire, biopsie de l'artère temporale), en particulier si le patient possède des signes cliniques associés à ces tissus (neuropathie périphérique, céphalées). L'étude histologique de la biopsie rénale permet enfin d'imager les lésions vasculaires glomérulaires, on peut y observer des capillaires bouchés par du matériel fibrineux, et des lésions caractéristiques dites « en croissant » (**Figure 2**).

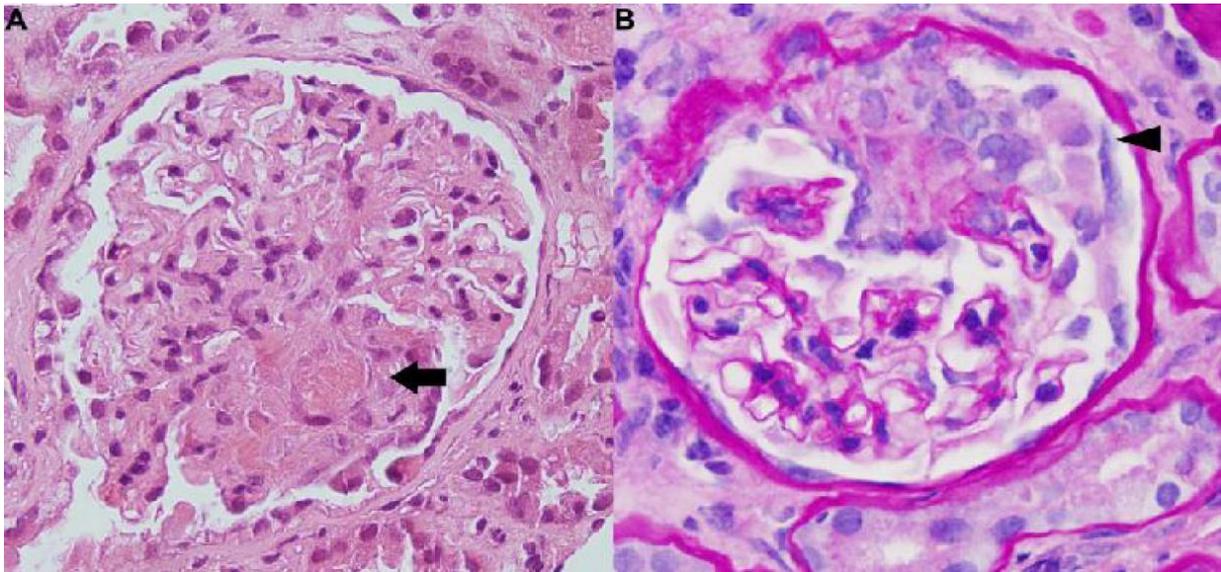


Figure 2 – Observation microscopique de lésions histologiques observées au sein de la biopsie rénale d'un patient atteint de vascularite associée aux ANCA (Paley et al., 2019)

- A. Photographie d'une biopsie rénale observée au microscope à lumière blanche (x40) après coloration H&E (hématoxyline et éosine). On peut discerner la présence de matériel fibrineux obstruant la lumière des micro-capillaires glomérulaires, causant la glomérulonéphrite.
- B. Photographie d'une biopsie rénale observée au microscope à lumière blanche (x40) après une coloration PAS (Periodic Acid Schiff) permettant de mettre en avant les lésions « en croissant ».

Figure reprise d'après Paley et al., 2019

I-2-b) Suivi & Traitements

Le traitement des VAA consiste d'abord en une phase d'induction, associant corticothérapie, cyclophosphamide (Guillevin et al., 1999 ; Hoffman, 1992 ; Novack and Pearson, 1971 ; Raitt, 1971) et Rituximab (anticorps anti-CD20) (Cortazar et al., 2018).

Les propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives des corticoïdes sont complétées par des bolus de cyclophosphamide. Le cyclophosphamide est un agent alkylant qui va se lier de façon covalente à l'ADN des cellules en cours de prolifération et les détruire spécifiquement, tout en épargnant les cellules au repos, il exerce donc un effet immunodépresseur utilisé dans le traitement des VAA.

Le Rituximab est un anticorps chimérique monoclonal ciblant l'antigène de surface CD20, et permettant une déplétion sélective des lymphocytes B par un effet cytotoxique direct, passant par le complément, ou bien par ADCC (antibody-dependant cell-mediated cytotoxicity) impliquant les récepteurs aux fragments Fc des IgG de monocytes, macrophages, polynucléaires. Les ANCA, auto-anticorps pathogéniques, jouent un rôle important dans le développement des VAA. A l'origine indiqué dans le traitement des lymphomes à cellules B, l'utilisation du rituximab dans les formes de VAA résistantes aux traitements conventionnels a été testée au début des années 2000 avec succès en traitement d'attaque, permettant une déplétion des lymphocytes B, notamment du compartiment sanguin (Eriksson, 2005 ; Keogh et al., 2005 ; Specks et al., 2001).

En revanche, le rituximab ne permet pas de dépléter les plasmocytes, sécrétant les anticorps, ni les formes immatures ou translationnelles de B, n'exprimant pas le CD20. Le bénéfice thérapeutique de cet anticorps ne passe donc pas uniquement par une diminution

de la sécrétion des ANCA pathogéniques (Aries, 2005), et d'autres mécanismes comme la coopération T/B peuvent davantage expliquer ses effets bénéfiques (Néel et al., 2019).

Des échanges plasmatiques (plasmaphérèses) dont le but est d'aider à la clairance des ANCA pathogéniques, peuvent y être associés avec un bénéfice thérapeutique démontré par plusieurs études (Aasarød et al., 2002 ; Frasca et al., 2003 ; Frascà et al., 1992 ; Klemmer et al., 2003). Cependant, leur efficacité au cours du traitement de la glomérulonéphrite est controversée depuis les années 1990 (Guillevin et al., 1996, 1997). A la suite de ces travaux, ils n'étaient plus recommandés en première intention si la vascularite est traitée par immunosuppression et corticoïdes (Guillevin and Pagnoux, 2003). Ces recommandations ont été confirmées par les résultats récents de l'étude PEXIVAS, qui a permis d'établir que le traitement par plasmaphérèse et glucocorticoïdes ne permettait pas de réduire l'incidence de l'insuffisance rénale chronique ni la mortalité par rapport au traitement par glucocorticoïdes seuls (Walsh et al., 2020).

Le traitement se poursuit ensuite par une phase d'entretien, consistant en une immunosuppression maintenue par une poursuite de la prise de cyclophosphamide durant une période supérieure ou égale à 24 mois. Etant donnée la toxicité importante induite par cette molécule, les cliniciens ont évalué des traitements de remplacement n'induisant pas davantage de rechutes. Dans ce contexte, l'azathioprine (Jayne et al., 2003), ou le méthotrexate pour les formes les moins sévères (Villa-Forte et al., 2007), ont prouvé leur efficacité. Le Rituximab est également utilisé lors de la phase de maintenance (Sznajd and Mukhtyar, 2016), et a montré une efficacité supérieure aux autres traitements dans ce cadre (Cortazar et al., 2018 ; Guillevin et al., 2014 ; Pendergraft et al., 2014).

Le suivi des patients inclut la surveillance de leur état général (apparition de signes cliniques marquant une récurrence, dosage de la CRP, numération de la formule sanguine), le contrôle de leur tension artérielle, de leur fonction rénale (protéinurie, hématurie, créatininémie), et la prévention des infections opportunistes, liée à l'immunosuppression. Les ANCA plasmatiques sont également dosés à titre indicatif comme évoqué un peu plus haut, bien que le taux d'ANCA circulants ne soit pas corrélé à la gravité de la pathologie (Sznajd and Mukhtyar, 2016).

Ce traitement est adapté à la gravité de la pathologie, notamment en calculant des scores de gravité tels que le FFS (Five Factor Score) pour la MPA et l'EGPA. Ce score prend en compte l'atteinte rénale (créatinine >150mmol/L), l'insuffisance cardiaque, l'atteinte digestive, l'absence d'atteinte ORL, l'âge (Gayraud et al., 2001 ; Guillevin et al., 1996, 2011). Mais n'ayant pas démontré sa pertinence dans le suivi de la GPA, d'autres scores comme le *Birmingham Vasculitis Activity Score* (BVAS) peuvent être utilisés en clinique et ont prouvé leur intérêt en aidant à anticiper les rechutes (Luqmani et al., 1994).

Même si le traitement permet une rémission d'une majorité des patients, les rechutes sont fréquentes, autour de 50% à 5 ans, et la mortalité des VAA traitées peut atteindre 25%. La survie rénale d'un patient compliant à 5 ans est d'environ 80%. Le risque de rechute est supérieur pour les formes PR3-positives (Pagnoux et al., 2008 ; Pierrot-Deseilligny Despujol et al., 2010 ; Walsh et al., 2012) et donc pour la GPA. Des alternatives et traitements complémentaires sont donc nécessaires pour prévenir les rechutes, en atténuer la gravité et améliorer la survie, en particulier dans les formes graves de VAA et notamment pour les patients PR3+.

I-3) Physiopathologie

I-3-a) Facteurs déclenchants environnementaux

Les VAA sont des pathologies au développement complexe et multifactoriel, encore mal compris. Ce sont des pathologies auto-immunes, lors desquelles il existe donc des mécanismes induisant une rupture de tolérance, dont l'étude permet de mieux comprendre le développement de ces pathologies, voire de le prévenir. Dans cette optique, des facteurs déclenchants et de rechute ont été identifiés. Ils peuvent être de nature environnementale (infections, exposition à certaines substances et médicaments) et génétique (Figure 3).

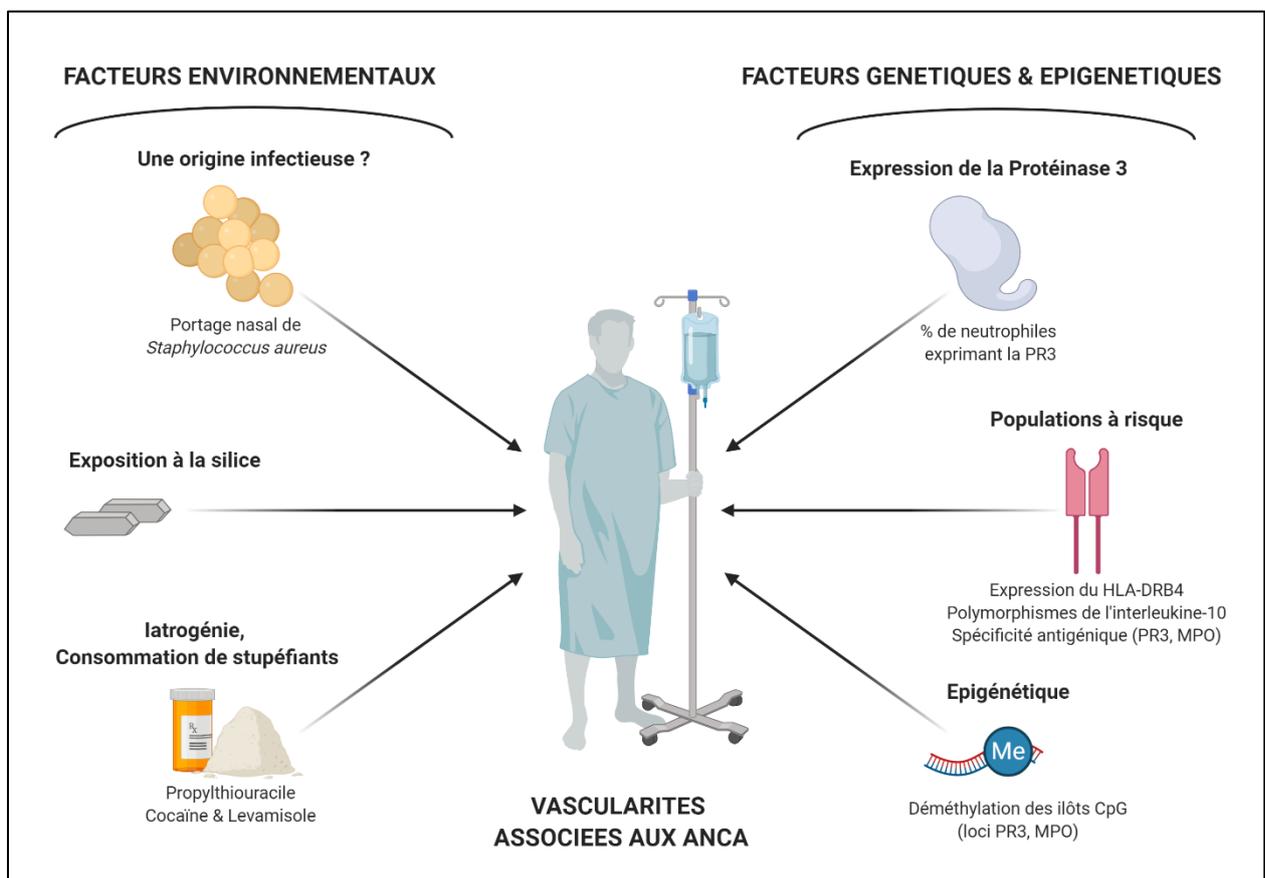


Figure 3 – Résumé des facteurs déclenchants des vascularites associées aux ANCA

Résumé schématique des facteurs environnementaux (infectieux, exposition à la silice, médicamenteux) et génétiques décrites comme ou suspectées d'être à l'origine du développement des vascularites associées aux ANCA

Tout d'abord, certaines études ont suggéré la piste d'une origine infectieuse des VAA. Un portage nasal de *Staphylococcus aureus* chez les patients GPA est associé à un plus grand risque de rechutes (Stegeman, 1994), risque majoré si les souches en question expriment la toxine tsst-1, un superantigène capable de stimuler des lymphocytes T de façon polyclonale (Popa et al., 2007). De plus, une association d'antibiotiques (co-trimoxazole) a réduit l'incidence des rechutes de patients en rémission de GPA (Stegeman et al., 1996), suggérant qu'un élément infectieux peut être à l'origine de la pathologie. Cette théorie est encore aujourd'hui incomplète et discutée.

Ensuite, de nombreuses études ont apporté des preuves du lien entre exposition à la silice, qui est pro-inflammatoire, et risque accru de développement de pathologies auto-immunes, et en particulier de développement de VAA (Gómez-Puerta et al., 2013 ; Hogan et al., 2007).

Enfin, des causes médicamenteuses ou en lien avec la consommation de stupéfiants ont également été démontrées. Le propylthiouracile (PTU) est un médicament utilisé dans la prise en charge de l'hyperthyroïdie. Plusieurs travaux ont permis d'établir que des patients traités par PTU produisent des anticorps anti-MPO, et qu'une certaine proportion d'entre eux, dont le titre et l'affinité des ANCA pour la MPO sont supérieurs, développe une vascularite observable cliniquement (Wang et al., 2013 ; Ye et al., 2005).

Un des mécanismes mis en jeu dans ce contexte iatrogène pourrait être une dérégulation de la production de *neutrophil extracellular traps* (NETs) par les neutrophiles, induite par le PTU (Watanabe-Kusunoki et al., 2019). Les NETs sont des réseaux principalement constitués de fibres de chromatine et de protéines aux propriétés antibactériennes, dont la MPO. Un traitement par PTU a montré une dérégulation du phénomène de NETose (génération de NETs) *in vitro*, avec des différences conformationnelles et une élimination plus

difficile. Au cours de la même étude, les auteurs ont injecté des NETs de rats induits par PTU à d'autres individus ; ils ont observé dans ce modèle une immunisation vis-à-vis de la MPO *in vivo*, traduite par la production d'ANCA anti-MPO et le développement d'une glomérulonéphrite et d'une capillarite pulmonaire, ce qui a été reproduit en traitant les rats avec le PTU (Nakazawa et al., 2012).

Ce phénomène observé dans un contexte de prise médicamenteuse pourrait élucider un des mécanismes de pathogenèse des VAA, ce qui a été confirmé par d'autres équipes, montrant que des NETs intacts étaient nécessaires à la présentation des peptides immunogènes par les cellules dendritiques, et que leur intégrité était nécessaire au développement de l'auto-immunité, laissant supposer un rôle de ces structures et de leur dérégulation dans la rupture de tolérance aboutissant à la génération des ANCA (Sangaletti et al., 2012). D'autres molécules, comme l'hydralazine, la minocycline, voire même la cocaïne, coupée au levamisole, ont également été associées à un risque de développement accru des VAA (Pendergraft and Niles, 2014).

1-3-b) Facteurs génétiques et épigénétiques

La proportion de neutrophiles circulants exprimant à leur membrane plasmique la PR3 est variable entre individus, mais stable au cours du temps chez un même sujet, et donc probablement contrôlée génétiquement.

Elle est en particulier élevée chez les patients VAA, mais ne varie pas lors des rémissions et rechutes, et aucune différence entre les patients PR3+ et MPO+ n'a été observée. En revanche, la fréquence des neutrophiles exprimant fortement la PR3 à leur surface est augmentée dans d'autres pathologies inflammatoires et auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde et cette population de neutrophile pourrait favoriser l'apparition de

pathologies auto-immunes et inflammatoires chroniques comme les VAA ainsi que les rechutes (Halbwachs-Mecarelli et al., 1995 ; Rarok, 2002 ; Witko-Sarsat et al., 1999a).

De façon très intéressante, une étude génétique britannique sur une large cohorte de patients montre des associations génétiques très différentes selon la spécificité des ANCA retrouvés chez les sujets, anti-PR3 (α 1-antitrypsin, Protéinase 3, HLA-DP) ou anti-MPO (HLA-DQ), suggérant une origine différente des vascularites à anti-MPO et anti-PR3 (Lyons et al., 2012).

Comme évoqué précédemment, certaines populations sont plus à risque de développer des VAA, notamment les populations d'origine caucasienne (Mahr et al., 2004). On sait d'une part que les porteurs du HLA-DRB4 sont plus à risque de souffrir d'EGPA (Vaglio et al., 2007). D'autre part, la présence exclusive de certains polymorphismes de l'IL-10, retrouvés uniquement chez les patients EGPA ANCA-négatifs laissent supposer des causes génétiques différentes en fonction du sous-type de VAA et de la spécificité antigénique des ANCA impliqués (Wieczorek et al., 2008).

Au-delà de ces facteurs génétiques, la dérégulation de l'expression de MPO et PR3 chez les patients VAA est également due à des événements épigénétiques, en particulier une déméthylation des îlots CpG de la chromatine au niveau des loci des gènes codant pour la MPO et de la PR3 (Ciavatta et al., 2010)

I-4) ANCA et activation des polynucléaires neutrophiles

I-4-a) Les ANCA

I-4-a-1) Rupture de tolérance & production des ANCA

Les évènements à l'origine de la rupture de tolérance vis-à-vis des antigènes du soi que sont la MPO et la PR3, et les mécanismes conduisant à la production d'anticorps auto-réactifs, les ANCA, ne sont pas totalement élucidés à ce jour. Plusieurs hypothèses co-existent dans la littérature scientifique.

Comme évoqué plus haut, des facteurs génétiques peuvent participer au développement des VAA, notamment en favorisant la production des ANCA. Un polymorphisme allélique du gène PTPN22, associé à l'autoimmunité humorale dans plusieurs autres pathologies (diabète de type I, polyarthrite rhumatoïde, lupus, thyroïdite de Hashimoto) est un facteur de risque génétique de la GPA pour les patients ANCA-positifs par rapport à des volontaires sains, ce qui n'est pas vérifié dans le groupe des patients « ANCA-négatifs » (Begovich et al., 2004 ; Csernok et al., 2008a ; Jagiello et al., 2005 ; Kaufman et al., 2006 ; Lee et al., 2007).

Une origine infectieuse a également été évoquée, dans laquelle la production des ANCA serait déclenchée soit par un mimétisme moléculaire avec un épitope bactérien, soit par un dévoilement excessif d'antigènes préservés (la MPO et la PR3) dans un contexte infectieux et inflammatoire. Cette thèse est supportée par l'observation de la présence d'ANCA anti-PR3 dans d'autres pathologies d'origine bactérienne comme l'endocardite (Choi et al., 2000).

Ensuite, la formation de granulomes, notamment dans les voies aériennes supérieures (souvent la première localisation affectée par la GPA), pourrait jouer un rôle dans la maturation de lymphocytes B autoréactifs. Des B produisant des ANCA anti-PR3 de haute

affinité ont en effet été détectés dans les tissus nasaux inflammés de patients, et notamment au niveau des lésions granulomateuses de patients GPA qui auraient un rôle d'organe lymphoïde, mettant en contact la PR3 ou un antigène microbien pouvant causer une cross-réaction, des cellules présentatrices d'antigène, et des B en maturation (Lamprecht and Gross, 2007 ; Voswinkel, 2005). Enfin, la PR3 peut directement participer à la maturation et à l'activation de cellules présentatrices d'antigène par une action protéolytique directe sur leur récepteur PAR-2, facilitant la réponse adaptative T spécifique de la PR3, la formation de granulomes et la coopération T-B à l'origine de la production d'ANCA (Csernok et al., 2006).

I-4-a-2) Preuves de la pathogénicité des ANCA

La pathogénicité des ANCA chez l'homme a été évoquée à la suite de l'observation de cas de transfert transplacentaires de ces auto-anticorps induisant des syndromes rénaux et pulmonaires disparaissant sous traitement classique des VAA (Bansal and Tobin, 2004). Cependant, ce phénomène n'étant pas systématique, d'autres équipes suggèrent que les ANCA seuls ne sont pas suffisants pour induire la pathologie (Silva et al., 2009).

D'autres preuves du potentiel pathogénique des ANCA *in vivo* ont été apportées par les modèles animaux de VAA, notamment un modèle de rats immunisés contre la MPO qui développent spontanément une glomérulonéphrite avec infiltration de neutrophiles, monocytes et lymphocytes T autour des petits vaisseaux des glomérules (Brouwer et al., 1993 ; Heeringa et al., 1996). Les leucocytes des rats immunisés contre la MPO humaine, ainsi que ceux de rats ayant été injectés avec des anti-MPO adhèrent de façon plus importante aux parois des vaisseaux de petit calibre et transmigrent davantage, et l'induction de ces interactions leucocytes-endothélium peut expliquer le développement de formes de vascularites (Little et al., 2005 ; Nolan et al., 2008).

Ces résultats ont été reproduits et complétés chez la souris au début des années 2000. Des souris déficientes en MPO (MPO^{-/-}) ont été immunisées avec la MPO murine, et les splénocytes de ces souris ont été injectés dans des souris *Rag2*^{-/-}, qui ne possèdent ni lymphocytes B ni T fonctionnels. Les souris répondent de façon « dose-dépendante » à l'injection de splénocytes en développant une glomérulonéphrite de plus en plus sévère, ainsi que des lésions pulmonaires. Ces résultats ont été reproduits par injection d'anti-MPO purifiés dans des souris *wild type* et *Rag2*^{-/-}, suggérant que la pathogénicité des ANCA est directe, et que le compartiment inné du système immunitaire est suffisant pour le développement d'un syndrome proche de ceux observés dans les VAA humaines chez la souris (Xiao et al., 2002).

Le pouvoir pathogénique des ANCA varie non seulement en fonction de leur spécificité antigénique, mais également en fonction des modifications post-traductionnelles que ces anticorps subissent. Les anti-MPO dirigés contre certains épitopes activent en effet plus fortement les polynucléaires (Roth et al., 2013), et le niveau de sialylation des anti-PR3 module également le burst oxydatif de ces cellules, et est associé à l'activité de la GPA (Guilpain et al., 2011), indiquant que la fraction constante des ANCA joue également sur leur activité et leur rôle dans le développement des VAA.

Enfin, une pathogénicité directe des ANCA via un binding à l'endothélium a été avancée par plusieurs équipes mais est fortement discutée et ne fait pas à l'heure actuelle consensus (Savage et al., 1993).

1-4-b) Les polynucléaires neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles forment un type cellulaire appartenant à l'immunité innée et sont générés dans la moelle osseuse à partir de progéniteurs hématopoïétiques. Ce sont des cellules de grande taille (environ 10 micromètres de diamètre), au noyau plurilobé, qui font partie avec les basophiles et les éosinophiles de la famille des polynucléaires. Les neutrophiles du compartiment sanguin sont divisés en deux pools, un circulant et un pool arrêté de façon transitoire dans les micro-capillaires. Leur renouvellement est rapide : on estime la production quotidienne de neutrophiles à 10^{11} cellules par jour, et 10^{12} en cas d'infection bactérienne (Mayadas et al., 2014). Les premières observations concernant le turnover de ces cellules allaient donc dans le sens d'une durée de vie courte dans la circulation. Cependant, ces dix dernières années, plusieurs études ont permis de montrer qu'elle était plus longue que ce qui était précédemment établi, étant estimée entre 5 heures et 5 jours (Pillay et al., 2010).

Les neutrophiles constituent la population de leucocytes la plus importante de la circulation (>60%, soit $5 \cdot 10^9$ /L de sang) et jouent un rôle majeur dans les processus inflammatoires. Elles sont en effet parmi les premières cellules à migrer sur le site de la lésion (inflammatoire, infectieuse...) afin d'y détruire et/ou phagocyter les cellules lésées et débris, les pathogènes, et participent à amplifier et/ou résoudre l'inflammation (Hidalgo et al., 2019 ; Németh et al., 2020 ; Peters, 1998).

Les neutrophiles sont recrutés sur le site inflammatoire par des processus de chimiotactisme impliquant des chimiokines comme l'interleukine (IL)-8, l'interféron γ , les facteurs du complément tels que C3a et C5a, et le leucotriène B4. Plus précisément, ces cellules sont recrutées par l'interaction de molécules d'adhésion du neutrophile (sélectines,

intégrines) sur leurs ligands présents à la surface des cellules endothéliales, induisant des étapes de rolling, d'arrêt et de transmigration à travers la vasculature, puis de recrutement au sein du tissu inflammé par un chimiotactisme impliquant les molécules évoquées ci-dessus. Les neutrophiles reconnaissent les PAMP (*pathogen associated molecular patterns*) des agents infectieux, grâce à des récepteurs PRR (*pattern recognition receptors*) dont les récepteurs TLR (*Toll-like receptors*), mais aussi les récepteurs CR1 et CR3 du complément et les récepteurs Fc aux fragments conservés des immunoglobulines. La reconnaissance de ces motifs par leurs récepteurs va déclencher l'activation des neutrophiles. Ces cellules activées vont alors remplir leurs fonctions de destruction et de clairance des agents pathogènes et de leurs composants par différents mécanismes cytotoxiques : la production de ROS (*reactive oxygen species*) cytotoxiques, de NETs aux propriétés antibactériennes, de chimiokines permettant le recrutement d'autres effecteurs sur site, la dégranulation (relargage de molécules antimicrobiennes), et la phagocytose. Les NETs et les granules produits contiennent des peptides et enzymes aux fonctions antimicrobiennes (MPO, élastase...), et les pathogènes opsonisés par des Ig et/ou des molécules du complément sont reconnus via les récepteurs Fc et CR évoqués ci-dessus (Mayadas et al., 2014). Ces mécanismes sont résumés au sein de la **Figure 4**.

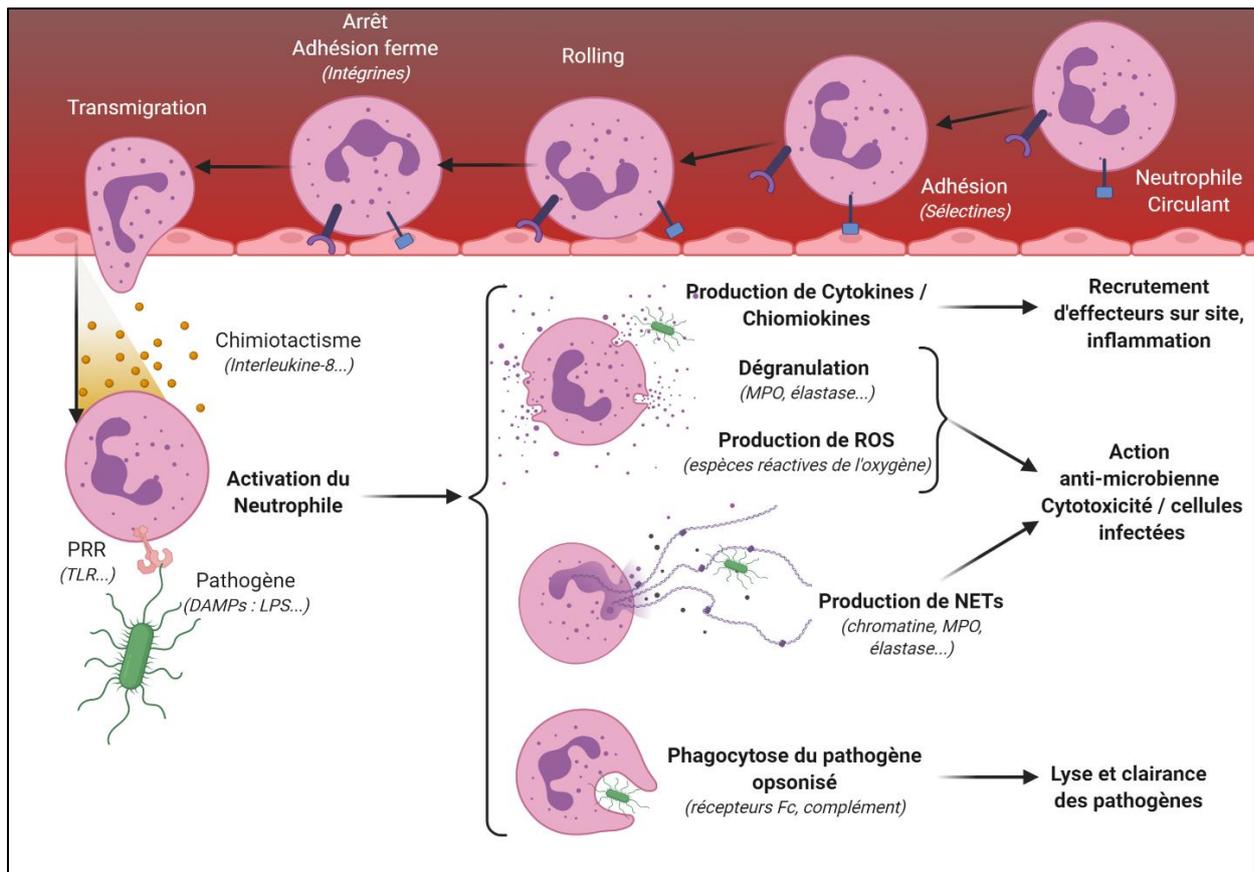


Figure 4 : Recrutement, activation et fonction des neutrophiles lors de l'inflammation

Les polynucléaires neutrophiles circulants sont recrutés in situ lors de l'inflammation par des mécanismes d'adhésion réversible (mettant en jeu les sélectines), de rolling, d'adhésion franche (intégrines) et enfin de transmigration à travers l'endothélium. Une fois sur place, leurs PRR (TLRs...) permettent la reconnaissance de motifs moléculaires issus du pathogène, les DAMPs (LPS...), ce qui déclenche l'activation du neutrophile. Ce dernier va alors produire des chimiokines, des espèces réactives de l'oxygène, des granules cytotoxiques, des NETs, et phagocyter les pathogènes opsonisés par des immunoglobulines et des molécules du complément, ce qui aura pour impact le recrutement et l'activation d'autres effecteurs sur le site de l'inflammation, la lyse des microbes, des cellules infectées, ainsi que la clairance des débris restants.

I-4-c) Priming des neutrophiles

La MPO et la PR3 sont exprimées dans des granules intracytoplasmiques dits azurophiles, qui sont mobilisés lors de l'activation du neutrophile (Sengeløv et al., 1995 ; Witko-Sarsat et al., 1999b). La MPO est faiblement exprimée de façon basale sur le neutrophile au repos. En revanche, la PR3 n'est pas ou peu présente à la surface de la majorité des neutrophiles au repos, mais il existe une sous-population de neutrophiles, d'importance variable selon les individus mais constante au cours du temps pour un sujet et déterminée génétiquement (Schreiber, 2003 ; von Vietinghoff et al., 2006), qui présente spontanément la PR3 à sa surface (Halbwachs-Mecarelli et al., 1995). Son importance est, comme évoqué plus haut, facteur de risque de rechute des VAA (Schreiber et al., 2005 ; Witko-Sarsat et al., 1999a). Cette population « *PR3^{hi}* » est davantage sensible à la stimulation par les ANCA, qui induit donc des réponses fonctionnelles plus importantes sur cette sous-population (Schreiber et al., 2004).

Ni la MPO ni la PR3 ne sont des protéines transmembranaires, leur expression à la surface cellulaire dépend donc d'un complexe plus important. L'expression membranaire de la PR3 est liée à sa présentation par le récepteur NB1 (CD177), et le complexe NB1-Mac1 (CD11b+CD18) est nécessaire à l'activation du neutrophile par les ANCA anti-PR3 (Jerke et al., 2011 ; Reumaux et al., 1995), et participe à la présentation de la MPO (Johansson et al., 1997), même si d'autres mécanismes liés au priming et indépendants de NB1 semblent promouvoir la translocation de la PR3 à la membrane (Hu et al., 2009).

La pré-activation des neutrophiles, ou « priming » par différents stimuli, tels des molécules d'origine bactérienne (peptide N-formyl Met Leu Phe ou fMLP), des cytokines (TNF α , les interleukines IL-1, IL-6, IL-8 IL-18), ou des molécules du complément comme C5a, induit une expression accrue de PR3 et MPO à la membrane, notamment par une translocation

des granules qu'ils contiennent (Charles et al., 1991 ; Csernok et al., 2008b ; Falk et al., 1990 ; Hewins et al., 2006 ; Schreiber et al., 2009a).

On retrouve dans la circulation de patients souffrant d'une forme active de VAA davantage d'expression de PR3 à la surface des neutrophiles ; cette observation est répétée dans des contextes inflammatoires ou infectieux comme le sepsis et reflète donc probablement un mécanisme ubiquitaire de pré-stimulation du neutrophile (Csernok et al., 1994). Un niveau élevé de PR3 membranaire protège les neutrophiles en apoptose de la phagocytose par les macrophages, jouant là aussi sur le maintien de l'inflammation (Kantari et al., 2007). Le mécanisme de « *Priming* » est illustré au sein de la **Figure 5**.

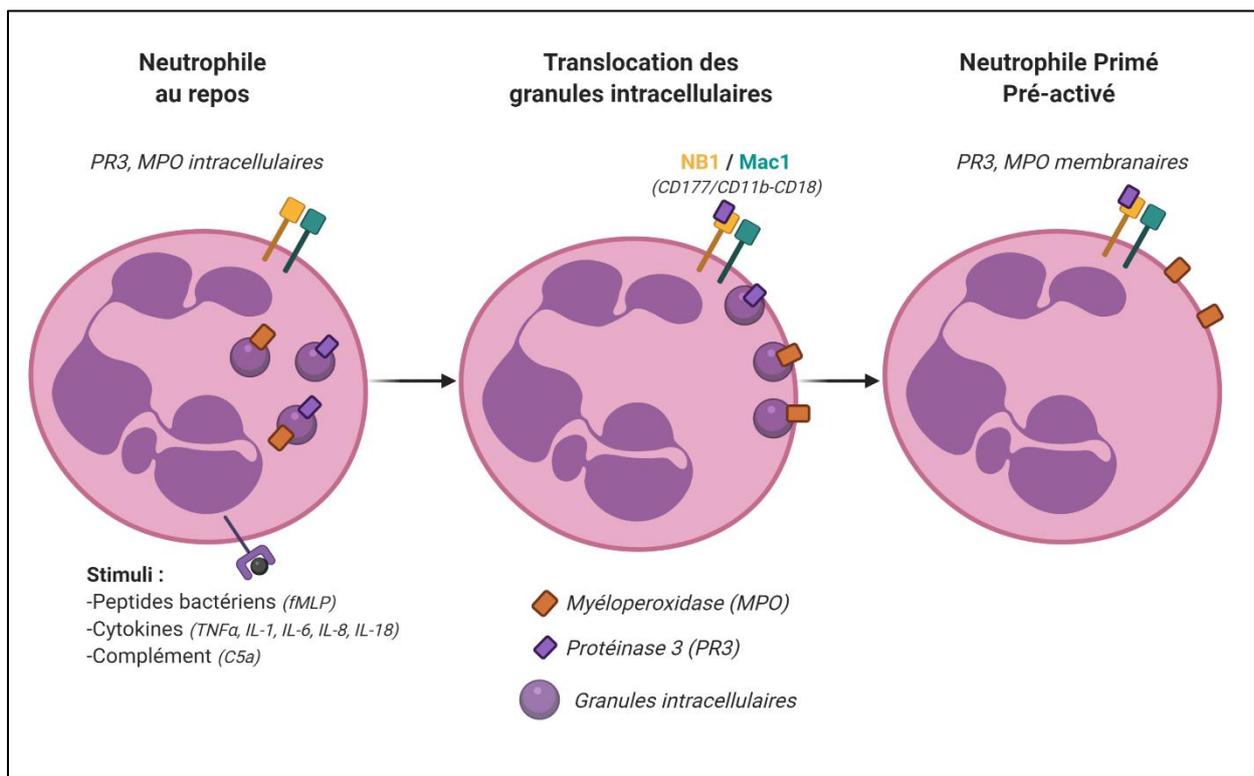


Figure 5 : Pré-activation ou Priming des neutrophiles

Sous l'action de stimuli divers (peptides bactériens, cytokines, complément...), la Protéinase 3 et la Myéloperoxidase, exprimées de façon basale au sein de granules intracytoplasmiques, voient leur expression devenir membranaire, à l'aide notamment du complexe NB1/Mac1. C'est le phénomène de Priming ou Pré-activation, qui rend ces antigènes accessibles à la surface du neutrophile.

I-4-d) Activation des neutrophiles par les ANCA

Cette étape de priming permet une plus grande accessibilité de ces antigènes à la fixation par les ANCA (Van Rossum et al., 2005) et permet à ceux-ci d'induire une stimulation complète du neutrophile. En effet, les neutrophiles pré-activés au TNF α peuvent être activés *in vitro* par des ANCA anti-PR3 ou anti-MPO mais pas par des anticorps contrôle (Charles et al., 1991). Ceux-ci sont activés à la fois spécifiquement par l'interaction auto-anticorps/antigène cible, mais également par la fixation de la partie constante des ANCA sur les récepteurs aux fragments Fc présents à la surface des neutrophiles, notamment les Fc γ RIIa et Fc γ RIIIa. Cette activation semble en outre être facilitée par la présence d'ANCA de sous-classe IgG3 (Kocher et al., 1998 ; Mulder et al., 1995, 2008 ; Porges et al., 1994). Un polymorphisme de ces récepteurs Fc pourrait d'ailleurs contribuer à expliquer la part héritée des VAA, puisque des allèles différents du gène codant pour le Fc γ RIIa ont été associés à une capacité d'induction du burst oxydatif des neutrophiles très variable (Porges et al., 1994). De plus, les rechutes de patients GPA sont associés à des polymorphismes des gènes codant pour Fc γ RIIa et Fc γ RIIIa (Dijstelbloem et al., 1999).

Par ailleurs, une sous-population de neutrophiles apoptotiques portant des marqueurs de translocation des granules intracellulaires à leur surface est capable de répondre à la stimulation par les ANCA sans priming préalable (Gilligan et al., 1996 ; van Rossum et al., 2004).

1-4-e) Signalisation de l'activation

D'un point de vue moléculaire, des études *in vitro* ont montré que la fixation des ANCA à leur antigène cible induit une activation de la Phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3K) qui va d'une part promouvoir la production de superoxydes et la dégranulation, et d'autre part induire, en synergie avec la signalisation issue de l'engagement des fragments constants des ANCA avec leurs récepteurs Fc, l'activation de la Diacylglycérol Kinase alpha (DGK α), elle-même responsable d'une induction de l'adhésion (Kettritz, 2002 ; Schreiber et al., 2010 ; Williams et al., 2007).

Des souris PI3K γ ^{-/-} ne développent pas de glomérulonéphrite suite à l'immunisation vis-à-vis de la MPO (Schreiber et al., 2010). L'inhibition de la p38 mitogen-activated protein kinase (p38-MAPK) a montré *in vitro* une diminution de la dégranulation et du burst oxydatif induit par anti-PR3 et anti-MPO, se traduisant *in vivo* par une diminution de l'infiltrat et des lésions glomérulaires dans un modèle de souris injectée avec des anti-MPO murins (van der Veen et al., 2011), suggérant une implication de la voie p38-MAPK dans l'activation du neutrophile par les ANCA. Le TNF α , l'adhésion des neutrophiles à une couche endothéliale, et la fixation des fragments conservés des ANCA aux récepteurs Fc γ R des neutrophiles induisent de façon synergique l'expression membranaire de la PR3, suggérant l'existence d'une boucle d'amplification de l'activation des neutrophiles impliqués dans les VAA (Brachemi et al., 2007), cf **Figure 6**.

Les neutrophiles activés par les ANCA sécrètent des facteurs activateurs du complément, augmentant donc la concentration du facteur C5a, ce qui contribue à entretenir une boucle d'activation (Xiao et al., 2007). En effet, en signalisant via la PI3K, le C5a participe au priming et à l'activation des neutrophiles (Ohashi and Woodgett, 2005).

L'inhibition de C5a *in vivo* atténue le développement de la glomérulonéphrite induite par anti-MPO chez la souris, et les souris C5a^{-/-} en sont également protégées (Huugen et al., 2007 ; Schreiber et al., 2009b). L'activation par les ANCA induit la sécrétion de cytokines par les neutrophiles, dont le TNF α , l'IL-1 β et l'IL-8 et contribuant à la stase dans les microcapillaires de ces cellules et au recrutement massif d'autres granulocytes sur place, et donc aux lésions endothéliales (Brooks et al., 1996 ; Cockwell et al., 1999 ; Noronha et al., 1993).

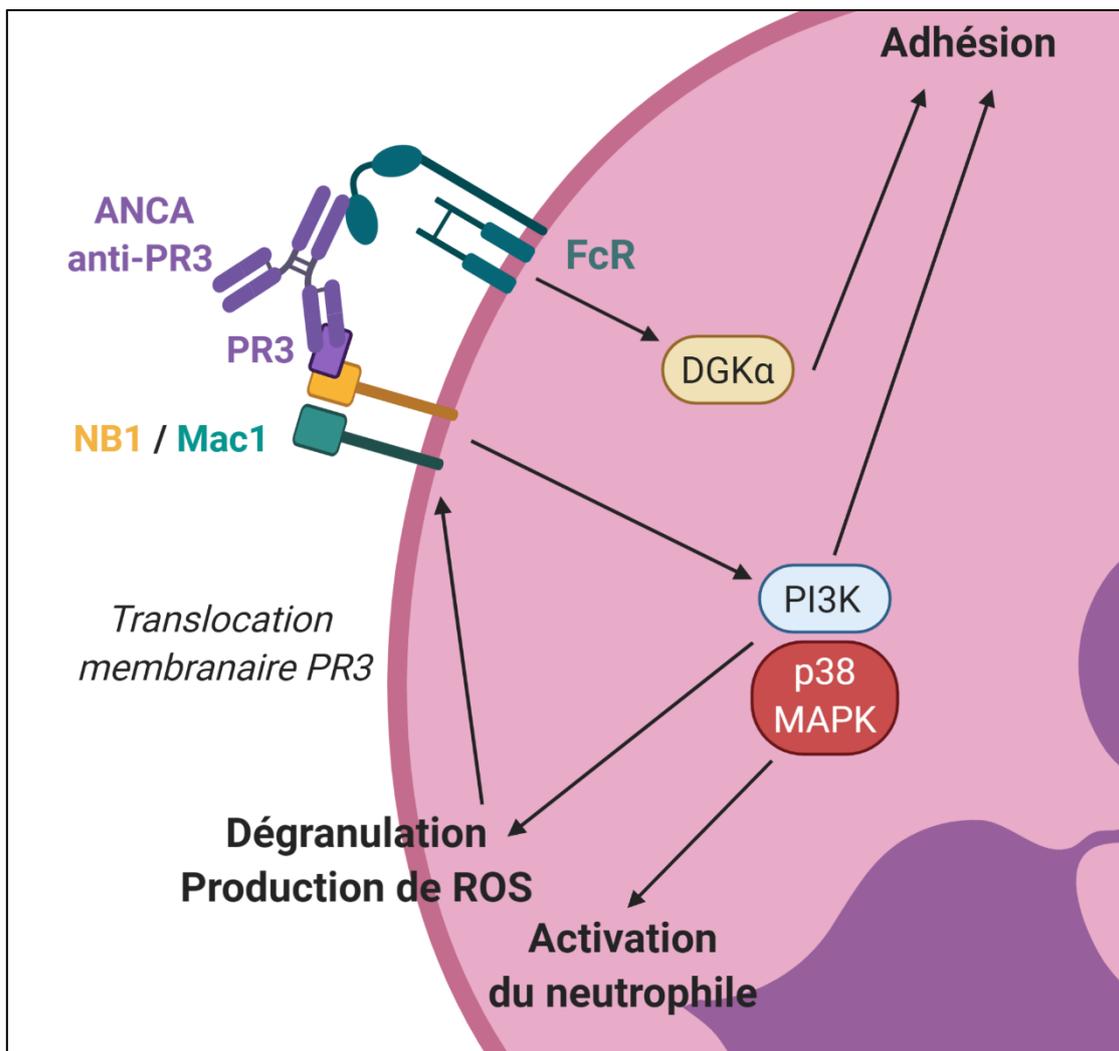


Figure 6 -Signalisation de l'activation des neutrophiles par les ANCA

La fixation des ANCA (ici anti-PR3) sur leur cible antigénique après priming induit les voies Phosphatidylinositol 3 Kinase et p38 MAP Kinase, déclenchant activation du neutrophile, dégranulation et production d'espèces réactives de l'oxygène. L'activation de la voie DG Kinase α par le binding des fragments conservés des ANCA sur les récepteurs Fc (FcR) permet, en synergie avec la voie PI3K, de faciliter l'adhésion du neutrophile à l'endothélium. La translocation membranaire de PR3 (ou MPO) est facilitée par la dégranulation, on observe ainsi une boucle d'activation du neutrophile.

I-5) Induction de lésions endothéliales dans les VAA

I-5-a) Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales (CE) sont des cellules épithéliales, dérivées du mésoderme au cours de l'embryogenèse. Ce sont des cellules polarisées qui tapissent les parois internes des vaisseaux sanguins, avec une face basale ancrée sur une structure nommée lame basale et une face apicale en contact avec la circulation sanguine. Ces cellules ont des phénotypes différents selon le diamètre et la fonction du vaisseau concerné (artères, veines, capillaires...).

Ces cellules assurent ou régulent évidemment de nombreuses fonctions vitales en lien avec le système cardio-vasculaire (tonus vasculaire, hémostasie...), mais elles ont aussi des rôles importants dans l'immunité. Elles forment la première barrière entre un pathogène présent dans la circulation et les tissus environnants, et peuvent répondre à des stimuli inflammatoires (cytokines, chimiokines, molécules issues de pathogènes...) en régulant les réponses immunitaires innées et adaptatives (adhésion et transmigration des leucocytes dans les tissus, présentation antigénique, costimulation) (Aitoufella et al., 2008).

De nombreuses pathologies sont en lien avec une dysfonction ou une lésion de ces cellules endothéliales (cancers, infections, rejets d'organe en transplantation...) dont de nombreuses pathologies auto-immunes (VAA, lupus, syndrome des antiphospholipides) et inflammatoires (sepsis). Comme évoqué précédemment, les neutrophiles, mais également les monocytes et les lymphocytes, participent aux lésions endothéliales au cours des VAA.

I-5-b) Rôle des neutrophiles dans l'atteinte endothéliale

L'activation des neutrophiles par les ANCA induit *in vitro* davantage de relargage de ROS ainsi qu'une dégranulation importante (Falk et al., 1990). Ces données ont été reproduites en utilisant la fraction IgG totales de patients anti-MPO+ ou anti-PR3+ afin

d'activer des neutrophiles de volontaires sains primés au TNF α , démontrant une activation des neutrophiles plus importante suite à l'activation par ANCA anti-PR3 (Franssen et al., 1999). En outre, des neutrophiles stimulés par des ANCA transmigrent davantage à travers une couche endothéliale dans un modèle *in vitro* de transmigration sous flux (Radford et al., 2001). L'ensemble de ces mécanismes (dégranulation, production de superoxydes, adhésion, transmigration) rend les neutrophiles davantage cytotoxiques vis-à-vis de cultures primaires de cellules endothéliales (Savage et al., 1992) et peut participer à expliquer les lésions vasculaires induites par les neutrophiles dans les VAA.

Des rapports contradictoires suggèrent à l'inverse que l'adhésion à l'endothélium de neutrophiles activés par des ANCA abolit l'augmentation de la sécrétion de superoxydes observée *in vitro*, mais induit davantage de sécrétion de sérine protéases et de facteur de von Willebrandt (Lu et al., 2006). Ces protéases, ainsi que la PR3 présente dans les granules sécrétés par les neutrophiles, peuvent avoir un rôle direct sur les lésions endothéliales en dégradant la matrice extracellulaire. Ces protéases peuvent également être délivrées en grandes quantités, localement, dans le micro-capillaire, via une sécrétion de NETs ou de vésicules extracellulaires (Hong et al., 2012 ; Kessenbrock et al., 2009). Pour appuyer cette hypothèse d'une concentration massive, hyperlocalisée de ces facteurs pathogènes dans la microvasculature dans le développement des vascularites, on peut également avancer que les neutrophiles de patients VAA, même en rémission, produisent davantage de ROS intracellulaires que ceux de volontaires sains, induisant davantage de relargage de NETs qui peuvent obstruer les micro-capillaires (Ohlsson et al., 2014).

I-5-c) Rôle des monocytes et macrophages dans les VAA

Les monocytes, également issus de la différenciation hématopoïétique au sein de la moelle osseuse, sont des cellules immunitaires nombreuses (environ 10% du pool de leucocytes circulants) capables de migrer dans les tissus, se différencier en macrophages et y exercer des actions immunorégulatrices. Les monocytes, suivi des neutrophiles, forment le type cellulaire majoritaire des infiltrats glomérulaires des VAA (Weidner et al., 2004). Par ailleurs, la présence de macrophages infiltrants a été décrite au cours des stades précoces de glomérulonéphrite, au sein de zones de nécrose fibrinoïde (Zhao et al., 2015). Leur niveau d'activation est corrélé avec les phases actives de la GPA (Kobold et al., 1999). Leur rôle dans la physiopathologie des VAA fait l'objet d'un intérêt renouvelé et pourrait être générateur de nouveaux traitements (Brunini et al., 2016 ; Jennette and Falk, 2015).

Les monocytes expriment également la MPO et la PR3 à leur membrane, de façon corrélée avec le CD14 (récepteur au LPS) (Tarzi et al., 2015). Les ANCA sont capables, par fixation sur leurs antigènes cibles et sur les récepteurs FcγR, d'activer les monocytes, et induisent une sécrétion accrue de MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), TNFα, IL-1β, IL-6, IL-8 et thromboxane A2 (Casselmann et al., 1995 ; Hattar et al., 2002 ; Ralston et al., 1997). Ces facteurs solubles sont capables d'activer et de recruter un grand nombre de cellules effectrices (neutrophiles, monocytes, lymphocytes, cellules dendritiques...) sur le site de l'inflammation et de participer ainsi aux lésions observées lors des VAA ainsi qu'à la mise en place d'une boucle pro-inflammatoire. Les monocytes activés par des ANCA peuvent également être responsables de lésions endothéliales directes puisqu'ils sécrètent des ROS (Weidner et al., 2001). Enfin, via l'uprégulation du CD14, du CD18 (intégrines β2), ainsi que des voies des Toll-like receptors (TLRs) et NOD1/2, les ANCA augmentent la susceptibilité à l'activation des monocytes ainsi que leurs capacités d'adhésion (Haller et al., 1996 ; Nowack

et al., 2000 ; Uehara et al., 2009). Les monocytes de patients en phase aigüe de VAA ont en effet un profil activé, avec notamment une uprégulation de molécules d'adhésion (CD11b, CD62L). Ce phénotype est conservé en phase de rémission et pourrait être en partie à l'origine des rechutes (Wikman et al., 2008).

En outre, les monocytes/macrophages activés par des ANCA anti-MPO sont capables, tout comme les neutrophiles, de produire des ETs (*extracellular traps*) contenant de la MPO, et donc capables de léser directement l'endothélium (O'Sullivan et al., 2015).

1-5-d) Rôle des lymphocytes

On observe dans les lésions pulmonaires et rénales (glomérulaires) des VAA une accumulation de neutrophiles, de monocytes et macrophages, mais également de lymphocytes T ; ceux-ci sont majoritairement des populations CD4+ mémoire, mais des CD8+ y sont également présents, à l'inverse des B ou des NK qui en sont absents (Coulomb-L'Hermine et al., 2001 ; Cunningham et al., 1999 ; Ruth et al., 2006 ; Weidner et al., 2004). Les T CD4+ effecteurs mémoires (TEMs) non-régulateurs sont en permanente expansion, même en rémission chez les patients GPA, et pourraient être impliqués dans les mécanismes de rechute (Abdulahad et al., 2006).

L'activation des TLRs des lymphocytes CD4+ TH1 et TH17 accentuent le développement de la pathologie dans des modèles expérimentaux murins de vascularite (Summers et al., 2011), et les réponses TH17 sont modifiées chez les patients et semblent participer aux rechutes (Abdulahad et al., 2008 ; Nogueira et al., 2010 ; Wilde et al., 2012), conjointement avec une fonction altérée des Tregs (Rani et al., 2015). Un mécanisme assez direct de la participation de ces cellules à l'entretien d'un environnement pro-inflammatoire passe par la capacité des Th17, via la sécrétion de CXCL5, d'attirer les neutrophiles sur site (Disteldorf et

al., 2015). Par ailleurs, on observe des changements phénotypiques ainsi qu'une diminution du nombre de lymphocytes T régulateurs (Tregs) et de cellules dendritiques (CD) circulants lors des poussées de VAA, évoquant un rôle de ces cellules dans la pathogenèse (Rimbert et al., 2011).

Enfin, les lymphocytes B, et en particulier les plasmocytes auto-réactifs, ont un rôle majeur *via* la sécrétion des ANCA. Les granulomes formés au cours de la GPA jouent un rôle d'organe lymphoïde tertiaire, au sein desquels a été observée une proximité de cellules PR3+, de lymphocytes B et de plasmocytes, ainsi que des preuves de sécrétion d'immunoglobulines par des cellules mémoires et d'une expansion clonale de celles-ci (Voswinkel et al., 2008), montrant ainsi une sélection et une maturation d'affinité des B dans ces structures. Les granulomes sont également propices au développement d'une auto-réactivité vis-à-vis de la PR3 ou de la MPO, puisqu'ils permettent la mise en contact d'une grande quantité de cellules PR3+ ou MPO+ avec des cellules présentatrices d'antigène, ainsi que des lymphocytes T et B, dans des conditions pro-inflammatoires, en présence de grandes quantités de NETs contenant également ces antigènes et capables d'activer les cellules dendritiques et les B autoréactifs (Kessenbrock et al., 2009). L'ensemble de ces mécanismes sont résumés **Figure 7**.

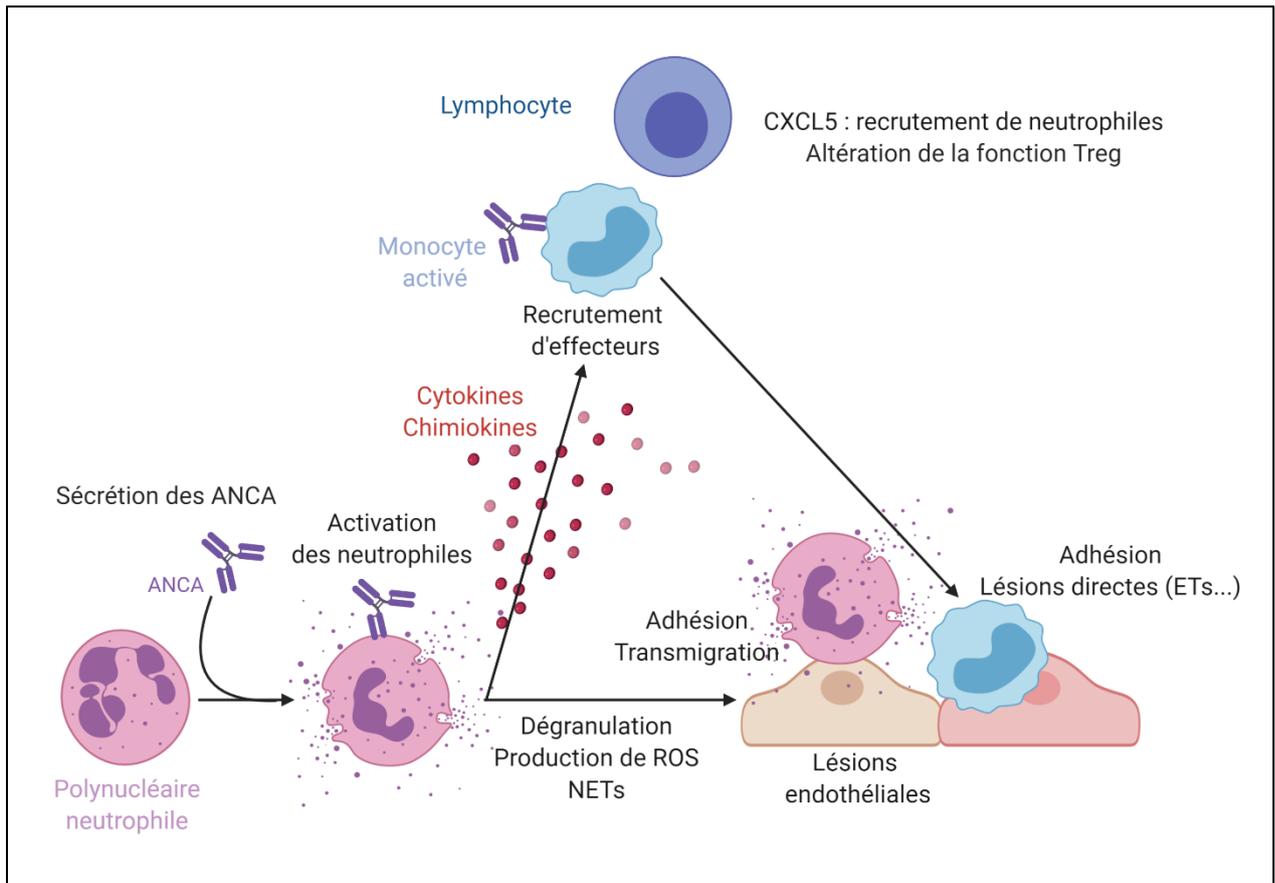


Figure 7 : Schéma physiopathologique simplifié des mécanismes de lésion vasculaires observées au cours des VAA

Les polynucléaires neutrophiles activés par les ANCA causent directement les lésions endothéliales en produisant et relarguant des molécules cytotoxiques (ROS, NETs, granules), et en recrutant d'autres effecteurs sur site (monocytes, lymphocytes). Ces derniers peuvent également léser directement le microcapillaire ou recruter d'autres cellules inflammatoires in situ.

II – Vésicules extracellulaires et transfert de miRNAs

II-1) Vésicules extracellulaires

II-1-a) Définitions & classification

Les vésicules extracellulaires (VE) sont des structures biologiques complexes, pouvant être relarguées par pratiquement tous les types cellulaires. Ce sont des objets de taille subcellulaire, formées d'une bicouche lipidique et contenant de nombreuses molécules potentiellement actives biologiquement (lipides, protéines, acides nucléiques...). Initialement prises pour des débris cellulaires, les vésicules extracellulaires ont en premier lieu été classées selon leur taille : exosomes (30-150nm), microvésicules ou microparticules ou ectosomes (50nm-2µm) et corps apoptotiques (0,5-5µm). Cependant, la caractérisation plus fine de leur biogenèse et de l'expression de marqueurs (membranaires et cytoplasmiques) différentiels a fait évoluer le consensus vers une division des sous-populations de VE en fonction des voies permettant leur production et donc de leur origine intracellulaire, et non de leur seule taille.

Les corps apoptotiques sont produits lors de mécanismes apoptotiques, les microvésicules sont relarguées par un bourgeonnement membranaire direct, tandis que les exosomes sont générés par invagination de la membrane des corps multivésiculaires, qui vont ensuite fusionner avec la membrane plasmique pour relarguer les exosomes dans le milieu extracellulaire. Ces sous-population ont des tailles et densités se chevauchant (cf **Figure 8**), et ne peuvent être isolées uniquement par une séparation basée sur ces paramètres physiques. Cependant, de par leur origine, les exosomes sont globalement enrichis en protéines endosomales (Alix...) et en tétraspanines (CD9, CD63, CD81...), et la caractérisation de ces marqueurs est un pan actif de la recherche. Ceci est d'autant plus vrai que, là encore, ils peuvent être partagés en plusieurs sous-populations et un marqueur isolé ne suffit souvent

pas à trier/caractériser un échantillon, nécessitant une combinaison de plusieurs d'entre eux (Raposo and Stoorvogel, 2013 ; Théry et al., 2018).

Les VE peuvent être secrétées par une cellule productrice dans un fluide biologique extracellulaire et captées par une cellule cible à laquelle elles vont pouvoir transférer leur contenu, et ainsi avoir un impact sur la signalisation et la biologie de celle-ci.

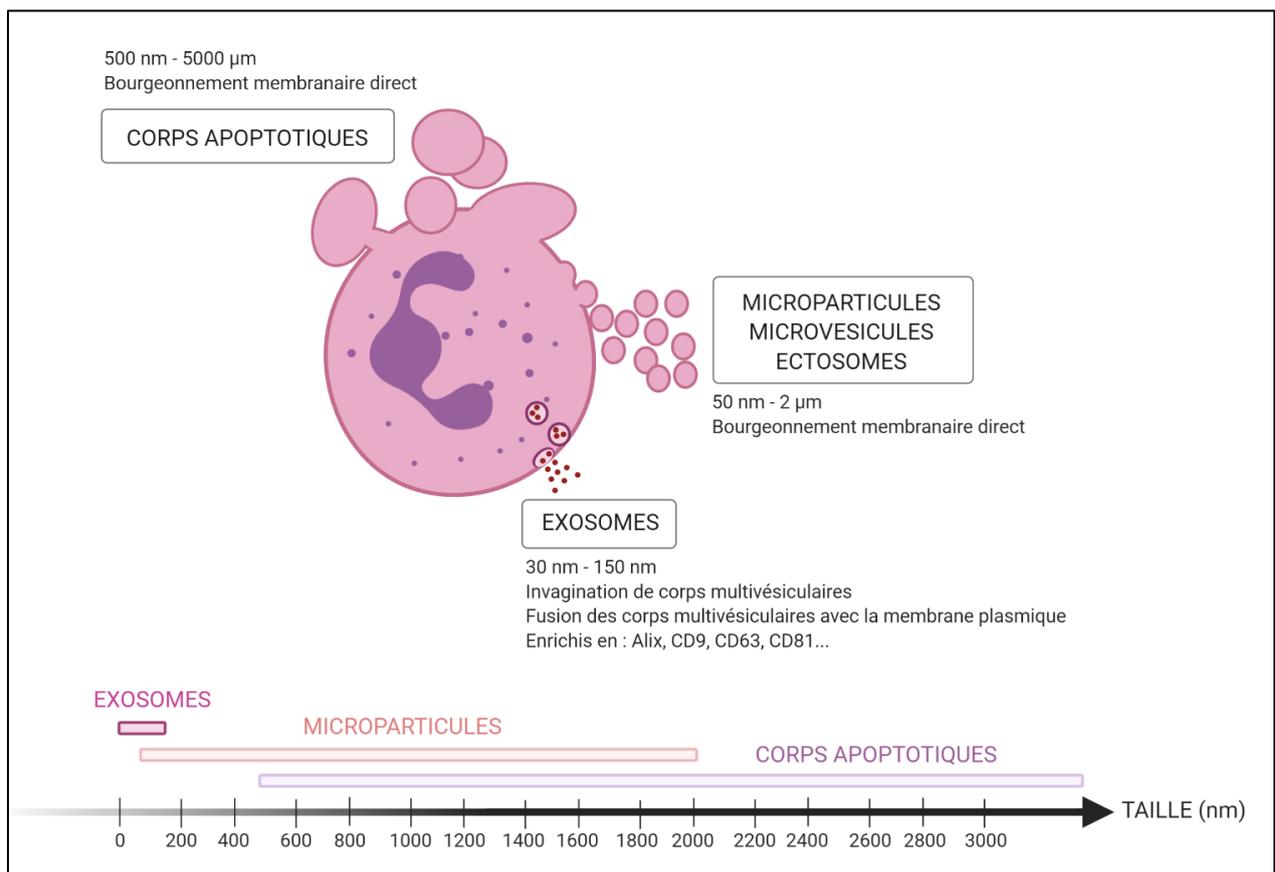


Figure 8 – Les sous-types de vésicules extracellulaires

Les corps apoptotiques et les microparticules sont générés par bourgeoisement membranaire direct, tandis que les exosomes sont formés par invagination de corps multivésiculaires (MVBs), et seront ensuite relargués par fusion de ces MVBs avec la membrane plasmique. Ces vésicules peuvent être différenciées par la présence de certains marqueurs, mais les gammes de taille de ces vésicules, bien que différentes, se chevauchent et ne suffisent donc pas à les discriminer.

II-1-b) Biogenèse des exosomes

Les exosomes sont des vésicules de petite taille (30-150nm). Le terme « exosome » a été utilisé pour la première fois en 1987, lors de l'étude de petits objets sécrétés par des réticulocytes de moutons (Johnstone 1987 J Biol Chem). Ces structures sont générées au sein d'endosomes multivésiculaires ou « *multivesicular bodies* » (MVBs), enrichis dans certaines protéines d'ancrage de la famille des tétraspanines, et notamment CD9 et CD63. Les MVBs sont des vésicules de 400-500nm de diamètre, issues des endosomes, et servent d'intermédiaires dans la dégradation des protéines issues de la membrane plasmique ou du réseau du Golgi. Les MVBs fusionnent avec des lysosomes ou avec la membrane plasmique afin de recycler ou de se débarrasser de leur contenu, notamment des protéines membranaires mal formées (Futter et al., 1996 ; Gruenberg and Stenmark, 2004 ; Johnstone et al., 1991 ; Sotelo and Porter, 1959).

Ils sont ensuite pris en charge par le système ESCRT (*endosomal complex required for transport*), puis sécrétés dans le compartiment extracellulaire (Akers et al., 2013 ; Pan et al., 1985). Les exosomes sont appelés « vésicules intraluminales » lorsqu'ils sont contenus à l'intérieur des MVBs, et prennent leur nom lorsqu'ils sont relargués dans le milieu extracellulaire.

Le système endosomal dirige les composants qui y transitent, y compris ces vésicules intraluminales, vers les lysosomes, la membrane plasmique, ou en extracellulaire, afin de les dégrader, les recycler ou de les sécréter (Gruenberg and Stenmark, 2004 ; Piper and Katzmann, 2007). La destinée des vésicules intraluminales, destruction par fusion des MVBs avec les lysosomes ou sécrétion sous forme d'exosomes, semble dirigée, spécifique : en effet, les exosomes ont des particularités que n'ont pas les autres vésicules intraluminales, telles

qu'une membrane riche en cholestérol (Möbius et al., 2002). Cependant, la plupart des mécanismes qui sous-tendent le tri de ces vésicules ne sont à ce jour pas élucidés.

Des travaux menés au cours des vingt dernières années ont permis d'élucider quelques-uns des mécanismes de biosynthèse des VE et d'identifier des molécules-clés de ce processus, notamment le rôle des complexes ESCRT. Le rôle de ces complexes est de sélectionner des cibles protéiques ubiquitinylées et de les charger dans le réseau de MVBs et en particulier au sein des vésicules intraluminales, qui deviendront les exosomes une fois sécrétés. Ces protéines régulent et stabilisent le bourgeonnement interne et la scission des vésicules intraluminales au sein des MVBs au cours d'un processus impliquant fortement le métabolisme phospholipidique (Babst, 2011 ; Katzmann et al., 2002 ; Raiborg et al., 2003), participant à la genèse des exosomes.

Plus précisément, le complexe ESCRT 0 forme des clusters en reconnaissant et rassemblant les molécules ubiquitinylées à la membrane des endosomes tardifs, tandis que les complexes ESCRT I et II stabilisent les déformations de la membrane induits par des mouvements lipidiques pour y séquestrer ce contenu, et ESCRT III clive le bourgeon ainsi formé pour créer les vésicules intraluminales (Babst, 2011 ; Wollert and Hurley, 2010)).

Par ailleurs, il existe des mécanismes de chargement des exosomes indépendants de l'ubiquitylation. Le premier met en jeu la protéine Alix, qui est capable de servir de molécule adaptatrice, capable de recruter des protéines destinées à être intégrées aux exosomes et à les lier directement avec le complexe ESCRT II, indépendamment du mécanisme de recrutement des molécules ubiquitinylées par ESCRT 0, I et II (Dores et al., 2012 ; Fisher et al., 2007). Alix et d'autres protéines comme Tsg101 qui sont impliquées dans la régulation de la

fonction des complexes ESCRT, sont également retrouvées au sein des exosomes sécrétés par de nombreux types cellulaires (Katzmann et al., 2001 ; Théry et al., 2001).

Enfin, les MVBs peuvent également être formées de façon indépendante des complexes ESCRT, à partir des radeaux lipidiques présents à la surface des endosomes précoces. Ces radeaux sont des microdomaines membranaires riches en sphingomyéline, qui est hydrolysée en céramide au cours d'une réaction catalysée par l'enzyme nsMase 2, induisant une déformation de la membrane du MVB qui initie le processus de bourgeonnement interne des vésicules intraluminales au sein du corps multivésiculaire (Trajkovic et al., 2008).

Les exosomes portent donc, de par leur biogenèse, des protéines associées aux endosomes et notamment des tétraspanines dont CD9, CD37, CD53, CD63, CD81 et CD82, ainsi que d'autres molécules liées au cytosquelette, au trafic intracellulaire ou à l'apoptose (Escola et al., 1998 ; Théry et al., 2001 ; Van Niel, 2003). Ils expriment en outre des marqueurs liés à leur type cellulaire d'origine : les exosomes sécrétés par différents types de cellules immunitaires possèdent en effet des molécules liées à l'adhésion comme le CD11b ou CD54, des molécules de CMH de classe I ou II, ainsi que des molécules de costimulation comme le CD86 (Escola et al., 1998 ; Lamparski et al., 2002 ; Théry et al., 2001 ; Zitvogel et al., 1998).

Une fois ces corps multivésiculaires formés, d'autres protéines jouent un rôle majeur dans leur transport, l'arrimage puis la fusion avec la membrane plasmique, permettant le relargage des exosomes. Tout d'abord, on peut citer les protéines de la famille Rab, associées aux voies de trafficking intercellulaire et de sécrétion, et en particulier Rab27 (Ostrowski et al., 2010) et Rab11 (Savina et al., 2002, 2005). Mais également d'autres molécules d'adhésion de la famille des SNAREs (Cai et al., 2007). Les vSNAREs (SNAREs vésiculaires) se fixent aux

tSNAREs (« target » SNAREs, présentes sur la face interne de la membrane plasmique) (Cai et al., 2007), afin d'arrimer et fusionner les MVB à la membrane plasmique. Cette biogenèse est résumée au sein de la **Figure 12**.

Il est important de noter que nous ne connaissons à ce jour pas tous les mécanismes qui permettent la biogenèse des exosomes.

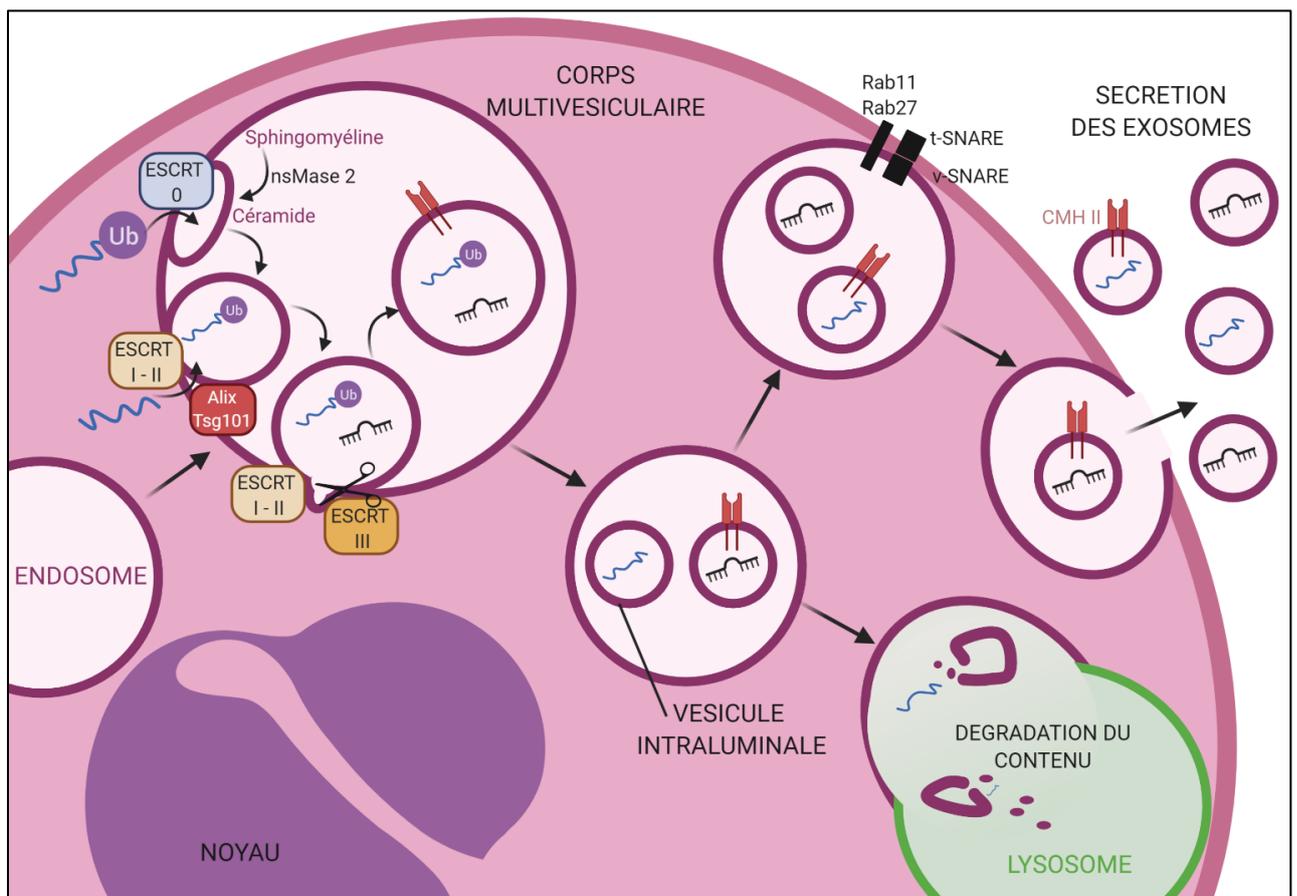


Figure 12 – Mécanismes de formation et de sécrétion des exosomes

Les exosomes sont formés par invagination de corps multivésiculaires d'origine endosomale. Des mouvements lipidiques sont initiés par une réaction catalysée par l'enzyme nsMase 2 qui permet la production de céramide à partir de sphingomyéline. Cette modification de la membrane vésiculaire induit une courbure, stabilisée par les complexes ESCRT I et II. Des molécules, notamment des protéines ubiquitinyllées (recrutées au sein de ces vésicules intraluminales par le complexe ESCRT 0), mais aussi des micro-ARNs et d'autres types d'acides nucléiques, sont incorporées dans ces vésicules. La base du bourgeon sera clivée, notamment à l'aide d'ESCRT III et ces vésicules intraluminales seront dégradées dans le réseau lysosomal ou sécrétées sous forme d'exosome dans le milieu extracellulaire, à l'aide de molécules comme Rab11, Rab27 et les SNAREs permettant la fusion du MVB avec la membrane plasmique.

II-1-c) Biogenèse des microparticules

Les microparticules, microvésicules ou ectosomes, sont générées par bourgeonnement direct de la membrane plasmique, et sont en moyenne de taille supérieure aux exosomes (50nm-2µm), même si les gammes de diamètre des deux populations se superposent. Les lipides membranaires sont redistribués, et le cytosquelette réorganisé afin de former les microvésicules. Le bourgeonnement membranaire de ces vésicules est induit par une translocation active de phospholipides et de protéines du feuillet interne de la membrane plasmique vers l'extérieur, comme la phosphatidylsérine, à l'aide d'enzymes nommées flippases (transfert vers l'extérieur) et floppases (vers l'intérieur) (Hugel et al., 2005 ; Leventis and Grinstein, 2010). Ce processus met également en jeu des contractions du cytosquelette, faisant intervenir le couple actine-myosine, et sont également hautement régulés, entre autres par des protéines de la famille Rho (McConnell et al., 2009 ; Muralidharan-Chari et al., 2009). Le complexe ESCRT semble également participer à la stabilisation des mouvements lipidiques à l'origine de la formation des microparticules (Nabhan et al., 2012).

Cependant, l'ensemble des mécanismes précis de biosynthèse/formation, leur trafficking et de relargage des VE, leur capacité d'adhésion/fusion à la membrane de la cellule cible et leur devenir à l'intérieur de celle-ci ne sont pas à ce jour totalement élucidés, et tous les acteurs moléculaires de ces phénomènes ne sont encore identifiés.

II-1-d) Biogenèse des corps apoptotiques

Les corps apoptotiques sont des vésicules de taille variable : leur diamètre est classiquement estimé entre 500nm et 5µm, mais de plus petites vésicules (50-500nm) ont également été observées (J. Simpson and Mathivanan, 2012). Ils sont générés par bourgeonnement de la membrane plasmique lors de l'apoptose, phénomène de mort cellulaire programmée. Ce bourgeonnement implique là aussi des changements dans la composition lipidique et la symétrie de la membrane plasmique, dont une externalisation de la phosphatidylsérine (Fadok et al., 1992), et est contrôlé par le cytosquelette d'actine et ses interactions avec la myosine (Coleman et al., 2001). De par leur biogenèse et leur taille, ils peuvent contenir des organites entiers (Taylor et al., 2008). Ils sont rapidement phagocytés par les macrophages localement, dont les récepteurs reconnaissent trois marqueurs des corps apoptotiques : l'Annexine V (liée à la phosphatidylsérine), le facteur C3b du complément et la thrombospondine (fixés aux molécules de surface oxydées des corps apoptotiques) (van Engeland et al., 1998 ; Erwig and Henson, 2008 ; Fadok et al., 1992 ; Mevorach et al., 1998 ; Savill et al., 1992).

Cependant, cette clairance locale par les macrophages ne semble pas totale puisqu'on peut détecter des corps apoptotiques dans la circulation sanguine (Samos et al., 2006), et ceux-ci peuvent être captés par un autre type cellulaire, y transférer des informations et changer son phénotype *in vivo* (Bergsmedh et al., 2001).

II-1-e) Composition des VE

Les VE sont des objets biologiques composés de protéines, de lipides, et d'acides nucléiques. Le contenu lipidique des exosomes est varié, marqué par des mouvements de lipides entre les deux couches membranaires (« flip-flop »), conférant à leur bicouche membranaire une certaine symétrie, induisant une rigidité accrue de la membrane des exosomes vis-à-vis de la membrane plasmique, ce qui pourrait participer à leur stabilité dans la circulation sanguine et à leur internalisation par la cellule cible (Février and Raposo, 2004). En outre, les exosomes sont enrichis en molécules classiquement décrites dans les radeaux lipidiques membranaires (sphingomyéline, glycolipides, cholestérol) (Wubbolts et al., 2003) ainsi qu'en leurs partenaires protéiques (les inhibiteurs du complément CD55, CD59), ce qui induit leur stabilité notamment vis-à-vis d'une destruction médiée par le complément (Clayton et al., 2003 ; Rabesandratana et al., 1998). A l'inverse, les microparticules présentent pour certaines la phosphatidylsérine en extracellulaire et ont une distribution des lipides plus asymétrique (Akers et al., 2013 ; Hugel et al., 2005).

Les VE contiennent de nombreuses protéines aux fonctions variées (CMH, molécules d'adhésion, du cytosquelette, enzymes...) (Lo Cicero et al., 2015). Les protéines destinées à être adressées aux exosomes sont ubiquitinylées et prises en charge par le système ESCRT précédemment décrit, afin d'y être chargées, tandis que celles à destination des microparticules sont adressées par des modifications post-transcriptionnelles différentes telles que l'addition d'un résidu lipidique (myristoylation, palmitoylation...) (Shen et al., 2011 ; Yang and Gould, 2013).

La composition protéique des vésicules extracellulaires peut indiquer leur origine, et la présence d'une combinaison de certains marqueurs membranaires, peut permettre

d'identifier la cellule productrice, ce qui ouvre des perspectives intéressantes de diagnostic, de suivi, voire de traitements dans de nombreuses pathologies. Par exemple, les VE issues des lymphocytes T activés sont CD3⁺ (Blanchard et al., 2002), et celles produites par les polynucléaires neutrophiles portent des marqueurs de ce type cellulaire (CD11b, CD18, CD62L) (Hong, 2018). Comme évoqué précédemment, des mécanismes communs à la biogenèse de plusieurs sous-types de VE existent (intervention du cytosquelette d'actine, externalisation de la phosphatidylsérine), et compliquent la définition de marqueurs exclusifs à certaines sous-populations. Quelques marqueurs ont été évoqués ci-dessus (CD9, CD63, CD81 pour les exosomes, C3b et la thrombospondine pour les corps apoptotiques...), mais ils ne sont pas toujours détectables dans chaque sous-type de VE. Aucune combinaison d'entre eux ne fait à l'heure actuelle consensus, et il convient d'en associer plusieurs pour évoquer une préparation enrichie en une sous-population de VE.

Enfin, les VE contiennent également des acides nucléiques, dont des acide ribonucléiques messagers (ARNm) fonctionnels, et des ARN non codants (lncARN ou *long non coding ARN*...) dont des micro-ARN (miARN), qui peuvent être transférés à une cellule cible et, respectivement y synthétiser des protéines ou réguler l'expression génique (Valadi et al., 2007). Le contenu en acides nucléiques, et en particulier les petits ARNs dont les micro-ARNs, empaquetés dans les VE est différent du pool cytoplasmique en ARNs de la cellule sécrétrice, indiquant que ceux-ci y sont dirigés de façon spécifique et active (Nolte-t Hoen et al., 2012). Certains motifs présents sur les miARNs sont reconnus par des ribonucléoprotéines comme hnRNPA2B1 qui participent à leur chargement dans les VE, ce processus étant régulé par la quantité de ces protéines ou leurs modifications post-traductionnelles (Villarroya-Beltri et al., 2013), ainsi que par le nombre de copies des cibles de ces miARNs dans la cellule sécrétrice (Squadrito et al., 2014).

Il est intéressant de noter que, malgré leurs différences, les microparticules et les exosomes partagent une partie de leur contenu (Cocucci and Meldolesi, 2015), et pourraient donc jouer des rôles biologiques proches dans certaines situations physiopathologiques.

II-1-f) Fonctions des VE

Les VE sont présentes dans tous les compartiments liquides biologiques (plasma, urine, salive, liquide séminal...) et sont donc potentiellement des acteurs importants de nombreux phénomènes liées à la physiologie de différents systèmes (immunitaire, cardiovasculaire), à leur fonctionnement, à leur développement, ainsi qu'aux pathologies pouvant les affecter, ainsi qu'à des fonctions telles que la reproduction (Carlsson et al., 2003). Ces vésicules peuvent activer des récepteurs ou transférer des protéines ou des lipides membranaires à la surface d'une cellule cible, ou bien transférer leur contenu (protéines, lipides, acides nucléiques...) suite à leur internalisation.

Les mécanismes de fusion et/ou d'endocytose des VE sont encore peu décrits. On connaît en revanche certains récepteurs des exosomes, comme les molécules Tim1 et Tim4 qui permettent la phagocytose de cellules apoptotiques et de leurs débris en reconnaissant la phosphatidylsérine (PS), également capables de lier les exosomes PS⁺ (Miyashita et al., 2007). La présence de molécules d'adhésion à la surface des VE permet leur adhésion à la matrice extracellulaire (MEC), ainsi qu'à la surface des cellules cibles. Par exemple, les intégrines $\beta 1$, $\beta 2$ à la surface d'exosomes produits par des lymphocytes B permet leur adhésion à la MEC ainsi qu'à des fibroblastes activés au TNF α (Clayton et al., 2004). Les VE de types cellulaires variés peuvent être internalisées par de nombreuses cellules cibles, mais lorsque cette internalisation est liée à un récepteur particulier, elle peut également être très spécifique aux cellules l'exprimant (Mulcahy et al., 2014 ; Näslund et al., 2014).

Ces vésicules peuvent également être internalisées par des mécanismes moins spécifiques : fusion membranaire (SNAREs, Rab...), endocytose (médiée par les radeaux lipidiques, les clathrines ou les cavéolines), ainsi que par des mécanismes de phagocytose et de macropinocytose (Mulcahy et al., 2014), comme résumé **Figure 12**. Les VE peuvent également être opsonisées, facilitant leur internalisation (Coakley et al., 2017).

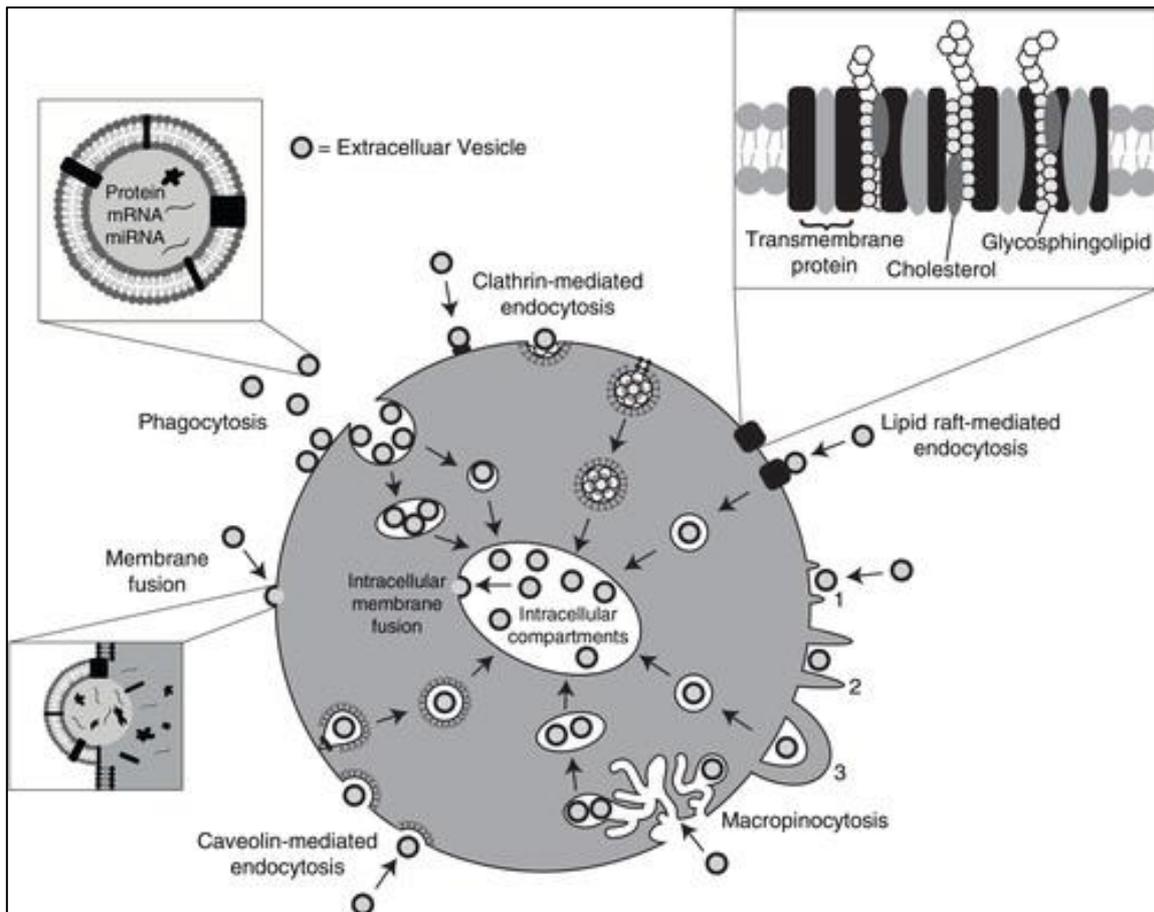


Figure 12 : Mécanismes d'internalisation des vésicules extracellulaires

Les VE peuvent être internalisées par fusion membranaire, endocytose (médiée par les radeaux lipidiques, les clathrines ou les cavéolines), ainsi que par des mécanismes de phagocytose et de macropinocytose. Reproduit d'après Mulcahy et al., 2014.

Grâce à ces mécanismes, les cellules productrices de VE peuvent transférer des protéines à d'autres types cellulaires de façon spécifique (Denzler et al., 2000), ainsi que des lipides (Subra et al., 2010) et des acides nucléiques, notamment des copies d'ARNm, de

IncARN et de miARNs (Skog et al., 2008). Une fois endocytées, les VE peuvent être dirigées vers les endosomes ou les lysosomes, et les molécules qu'elles contiennent libérées, séquestrées dans un compartiment intracellulaire ou détruites (Joshi et al., 2020). Le transport d'eicosanoïdes par ces vésicules participe par exemple à la modulation de réactions immunitaires à distance, et constitue un bon exemple de transfert de lipides bio-actifs par les VE (Boillard, 2018).

Les VE peuvent par ailleurs fusionner avec la membrane plasmique pour transférer un récepteur qu'elles présentent elles-mêmes. Par exemple, des cellules issues d'une tumeur de la prostate, portant un récepteur responsable de la résistance au traitement, peuvent via leurs exosomes transférer ce récepteur, et la capacité de résistance induite, à d'autres cellules (Corcoran et al., 2012). Des cellules tumorales peuvent également transférer le ligand Dll4 à la membrane de cellules endothéliales. Ce dernier va alors interagir avec son récepteur sur les cellules endothéliales voisines afin de favoriser l'angiogenèse (Sheldon et al., 2010). Par ailleurs, les VE peuvent porter à leur membrane un récepteur ou un ligand capable d'interagir directement avec sa contrepartie sur une cellule cible (Gross et al., 2012).

Le transfert de molécules *via* les VE en tant que moyen de communication intercellulaire est donc établi, mais il est également décrit que certaines cellules se servent des VE pour expulser une molécule en particulier, sans but de communication évident, afin de permettre par exemple la perte d'expression d'un récepteur (Harding et al., 1984). Ces mécanismes de communication intercellulaire peuvent participer à l'homéostasie d'un tissu.

Il a ainsi été démontré qu'au sein du système nerveux, le crosstalk impliquant les VE entre les neurones et la glie participe au développement, à l'homéostasie et à la

synchronisation des activités cérébrales, en lien avec la sécrétion de neurotransmetteurs (Frühbeis et al., 2013).

Mais ces mécanismes de communication intercellulaires peuvent aussi participer au développement de certaines pathologies. Par exemple, à la dissémination et à l'accumulation de peptides β -amyloïdes des plaques causant la maladie de Parkinson (Rajendran et al., 2006), de protéines mal repliées à l'origine de la sclérose latérale amyotrophique (Grad et al., 2014), ou des particules protéiques infectieuses des maladies à prions (Fevrier et al., 2004).

Enfin, les VE semblent jouer un rôle dans la signalisation du développement embryonnaire, en étant impliquées dans des voies de signalisation majeures pour la croissance et la morphogenèse de l'embryon. En effet, elles permettraient l'échange intercellulaire de protéines des familles WNT et Sonic Hedgehog, et transporteraient des ligands du récepteur Notch (McGough and Vincent, 2016).

II-1-g) Purification des VE

Les VE peuvent être isolées à partir de milieu de culture ou de fluides biologiques (plasma, urine...). Après une première centrifugation à basse vitesse, afin d'éliminer les cellules et les plus gros débris cellulaires, une centrifugation à 100 000g permet de les culotter, et une purification additionnelle grâce à un gradient de sucrose, qui permet de séparer les exosomes (de densité d'environ 1,13g/mL, variable en fonction de leur origine) et les agrégats de protéines (Escola et al., 1998 ; Raposo et al., 1996). Il est important de noter que parmi les « gros débris » éliminés peuvent se trouver les VE de plus grande taille, et que le rendement ainsi que la pureté des fractions obtenues ne sont pas parfaits, ainsi on parle ici davantage d'enrichissement que de purification ou de tri au sens strict.

De nombreuses autres méthodes d'enrichissement en sous-types de VE ont été décrites (Théry et al., 2018). Une des plus utilisées en recherche est la technique d'ultracentrifugation différentielle, qui permet de séparer différentes fractions de VE selon leur taille (Kowal et al., 2016), et dont la mise en œuvre est présentée **Figure 9**. Les plus petites vésicules peuvent ensuite subir un tri immunomagnétique afin d'enrichir la préparation en exosomes « vrais », c'est-à-dire possédant une combinaison des marqueurs CD9, CD63, et CD81 (**Figure 10**).

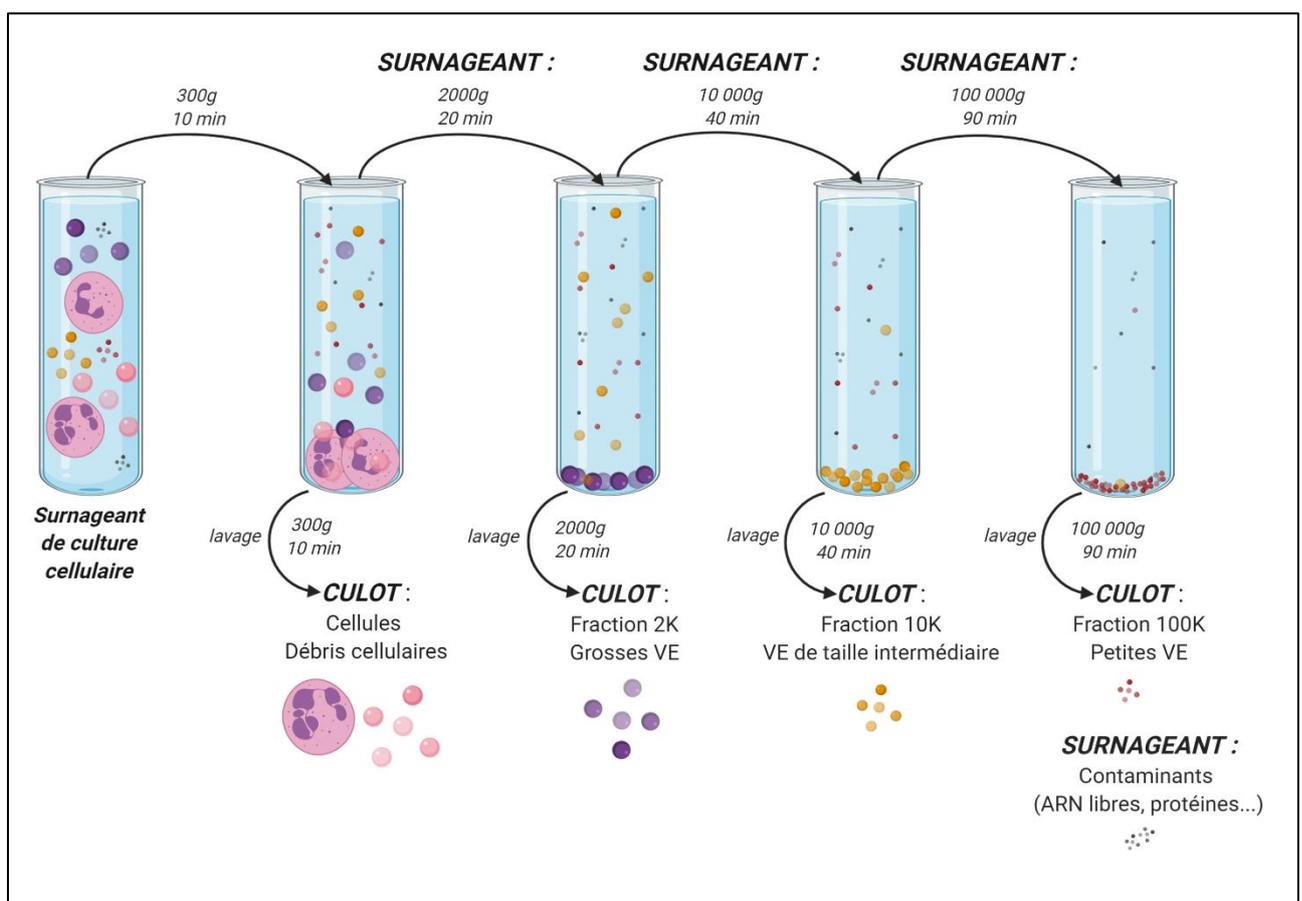


Figure 9 – Séparation des VE selon la méthode d’ultracentrifugations différentielles

Les fractions de vésicules extracellulaires peuvent être séparées selon leur taille et concentrées à partir d’un liquide par une série d’ultracentrifugations différentielles en fractions « 2K », « 10K » et « 100K », correspondant aux VE de grande, moyenne et petite tailles. Figure adaptée de « Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes » (Kowal et al., 2016).

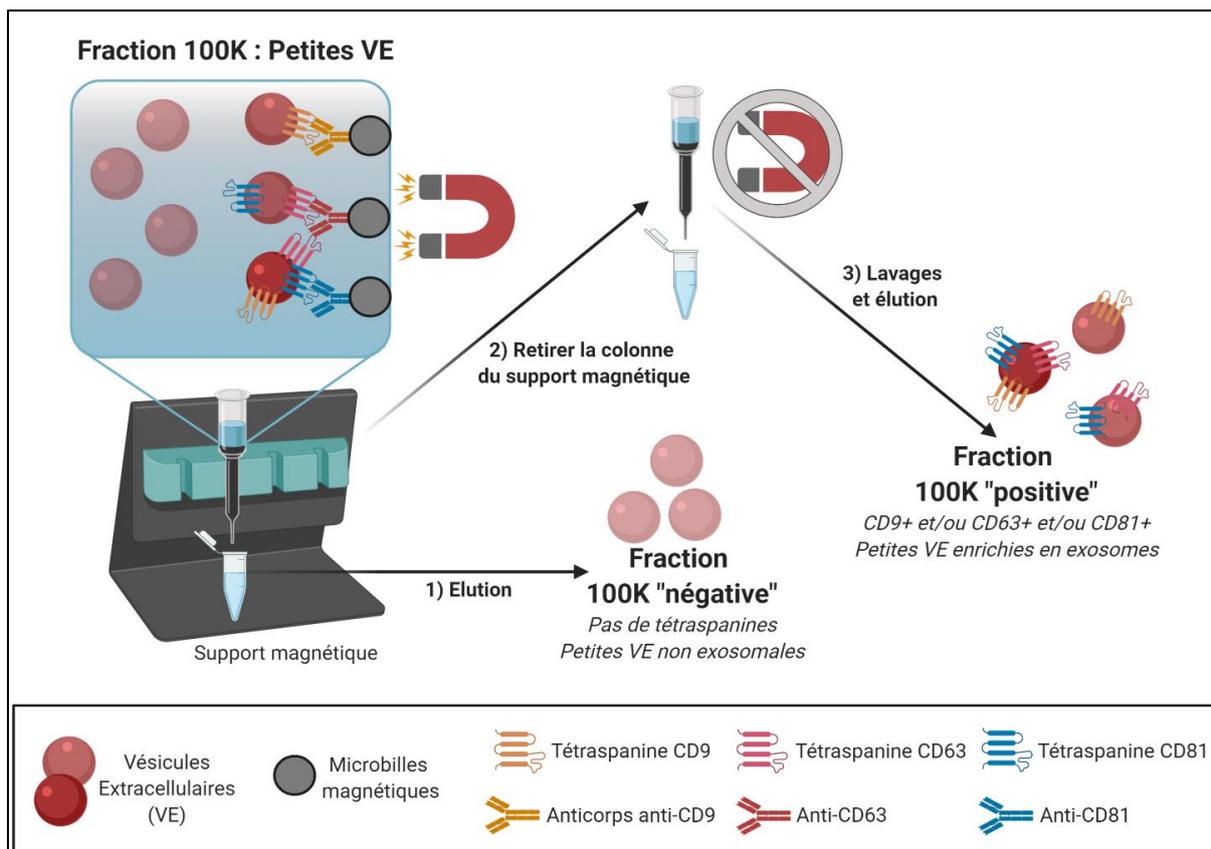


Figure 10 – Tri Immunomagnétique des petites VE

Les petites VE (« Fraction 100K ») sont incubées avec des billes magnétiques portant des anticorps anti-CD9, CD63 et CD81 et déposées dans une colonne, elle-même placée sur un support aimanté. Suite à une première élution, les VE négatives pour ces trois marqueurs sont récupérées et concentrées (« Fraction 100K négative »). La colonne est ensuite lavée puis élue en dehors du support aimanté, permettant de collecter la « Fraction 100K positive », enrichie en exosomes. D'après les recommandations du protocole Exosome Isolation Kit Pan Human (Miltenyi Biotec).

Les VE peuvent aussi être précipitées à l'aide de polymères permettant de les agréger entre elles afin de pouvoir les concentrer par simple centrifugation, comme par exemple l'ExoQuick, dont le protocole est présenté **Figure 11** (System Biosciences) (Zhu, 2014), et dont l'avantage est d'être rapide, au détriment de la pureté de l'échantillon (agrégation des VE entre elles et contamination possible par des agrégats protéiques). Ces techniques ont été perfectionnées, dans le but d'utiliser les VE en clinique. En effet, une méthode de purification de grade clinique a été développée à partir de ces techniques (Lamparski et al., 2002), ouvrant la voie à un usage thérapeutique des VE.

Une fois purifiées, les VE peuvent être observées par microscopie électronique. Les exosomes se présentent sous forme d'objets ronds plus ou moins aplatis, de diamètre oscillant entre 30 et 100nm. Elles peuvent également être mesurées ou quantifiées par différentes techniques basées sur leurs propriétés physico-chimiques : diffusion de la lumière de VE soumises au mouvement brownien (NTA), passage à travers un nanopore (TRPS : *tunable resistive pulse sensing*), diffraction de la lumière (cytométrie en flux). Le perfectionnement des méthodes de purification des VE a également permis une meilleure caractérisation biochimique de ces acteurs, et notamment d'étudier la composition de leur contenu.

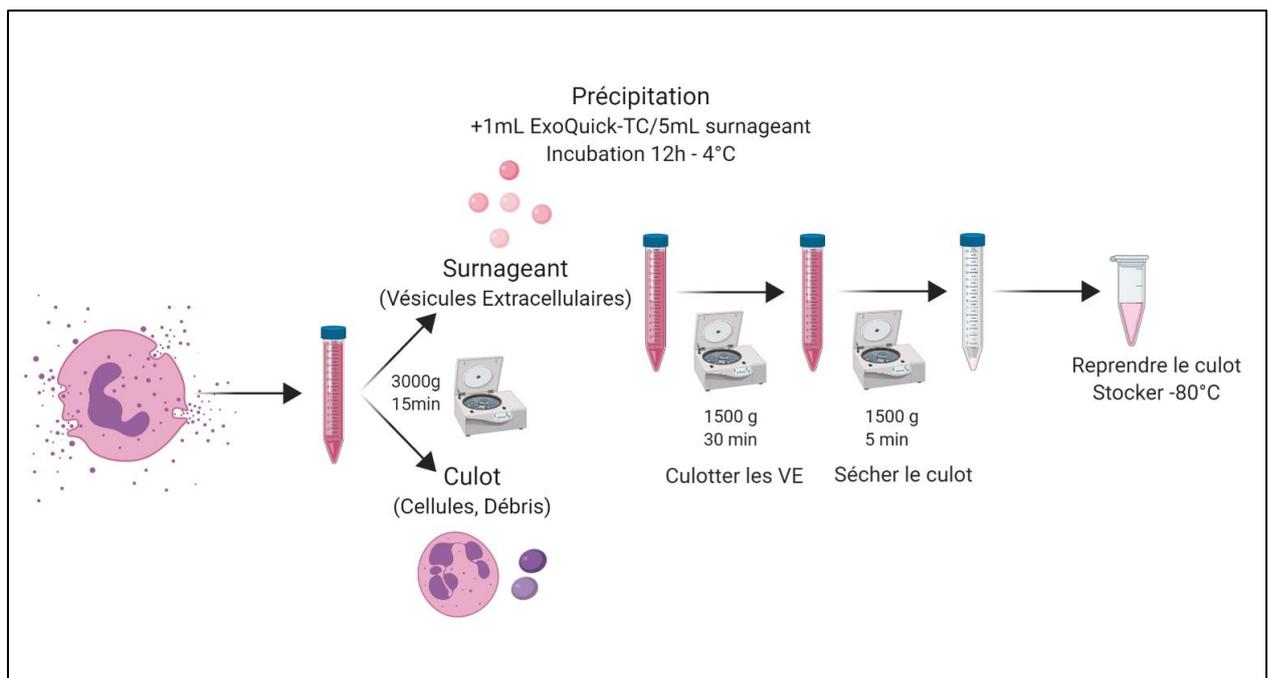


Figure 11 – Enrichissement en VE d'un milieu de culture par précipitation

*Les vésicules produites par une culture cellulaire d'intérêt peuvent être concentrées à partir de leur surnageant. Les cellules et gros débris sont tout d'abord éliminées par une première centrifugation, puis le surnageant est incubé avec un polymère permettant l'agrégation des VE. Enfin, les vésicules sont culottées par centrifugations et peuvent être reprises pour stockage ou utilisation.
Protocole adapté depuis celui de l'ExoQuick Exosome Precipitation Solution (SBI System Biosciences)*

II-1-h) Les VE et l'immunité

Comme évoqué plus haut, les exosomes sécrétés par certaines cellules immunitaires présentent à leur surface, des molécules de CMH de classe I ou II, des molécules de costimulation (CD86...) et d'adhésion (CD11b, CD54...), suggérant un potentiel immunomodulateur des VE (Escola et al., 1998 ; Lamparski et al., 2002 ; Théry et al., 2001 ; Zitvogel et al., 1998). Ces dernières participent également à transporter des effecteurs du complément (Karasu et al., 2018).

En effet, il a été démontré que des VE peuvent avoir un rôle stimulateur, notamment dans l'activation des lymphocytes : elles permettent en effet le transfert de complexes CMH/peptides entre différentes cellules dendritiques, et certaines sont des adjuvants à l'activation d'un T par une de ces dernières (André et al., 2004 ; Théry et al., 2002). Elles peuvent également avoir un rôle immunomodulateur, voire participer à induire une tolérance : l'injection des VE d'un donneur avant allogreffe peut induire une prolongation de la survie du greffon (Peché et al., 2003). Des EV issues de bactéries diminuent *in vivo* les symptômes liés aux allergies alimentaires en induisant l'apoptose des mastocytes (Kim et al., 2016).

L'impact sur le système immunitaire d'autres VE issues de pathogènes a d'ailleurs été décrit. Le détournement de la machinerie de production des VE par différents parasites (Marti and Johnson, 2016 ; Montaner et al., 2014) et virus a également été avancé (Izquierdo-Useros et al., 2010), notamment le HIV dont le cycle de réplication utilise la machinerie de production d'exosomes (Fang et al., 2007).

Enfin, des tumeurs peuvent également utiliser ces objets comme des moyens d'échappement au système immunitaire induisant une tolérance envers les cellules

cancéreuses (Riteau et al., 2003), ainsi qu'en facilitant leur propre survie en modelant leur microenvironnement (Hegmans et al., 2004 ; Iero et al., 2008).

Par exemple, Costa-Silva et al. ont montré chez la souris une capacité des adénocarcinomes pancréatiques à sécréter des exosomes contenant un facteur d'inhibition de la migration des macrophages (MIF) participant à la formation d'une niche pro-tumorale et augmentant les métastases (Costa-Silva et al., 2015). En outre, les auteurs de cette étude ont également montré que les patients qui développent des métastases hépatiques possèdent des exosomes plus riches en MIF que les autres, suggérant une application pronostique voire thérapeutique de ces découvertes.

Les VE issues de cellules du système immunitaire peuvent également avoir un impact négatif, voire pathogène, sur le maintien d'un tissu sain. Par exemple, le transfert de MPO par les VE de neutrophiles activés inhibe *in vivo* la prolifération et la migration de cellules épithéliales, et donc la cicatrisation (Slater et al., 2017) lors de mécanismes de lésions de la barrière intestinale.

II-1-i) Applications pronostiques et thérapeutiques des VE

Les VE, ainsi que leur contenu, peuvent être utilisés comme des biomarqueurs pour suivre l'évolution d'une pathologie ou la réponse à un traitement, comme par exemple des mutations tumorales (Shao et al., 2012). Ce sont en effet des objets biologiques stables et accessibles de façon non ou peu invasive dans différents fluides biologiques. Hoshino et ses collègues, en travaillant sur des exosomes issus de tumeurs ayant pour propriété de favoriser le développement de la niche pré-métastatique, ont pu montrer en 2015 que les intégrines présentes à la surface de ces VE avaient des motifs d'expression distinctes en fonction de la localisation des métastases ultérieures, hépatiques ou pulmonaires (Hoshino et al., 2015), ouvrant la voie à leur détection dans un but prédictif. De la même façon, la présence d'un marqueur, le glypican-1 (GPC1), à la surface d'exosomes circulants permet de discriminer les volontaires sains et les formes bénignes de cancers du pancréas de patients avec des formes agressives, précoces et tardives, de cancers du pancréas (Melo et al., 2015), suggérant l'utilisation de ces exosomes comme biomarqueurs précoces de la gravité de ces pathologies.

Les VE, outre ce rôle de biomarqueur et de suivi des pathologies, peuvent aussi être utilisées dans des buts thérapeutiques. Des travaux ont par exemple utilisé les VE comme un vecteur permettant de délivrer un cargo à une cellule cible (Alvarez-Erviti et al., 2011).

Les VE issues de cellules souches mésenchymateuses (MSCs) ont montré leur potentiel thérapeutique à travers plusieurs travaux, en particulier au cours d'une étude pilote dans le traitement de la GVHD (*graft versus host disease*) résistante aux traitements classiques (Kordelas et al., 2014), et lors du traitement de pathologies chroniques du rein (Nassar et al., 2016).

Dans le cadre de la pandémie de Covid-19 (maladie à coronavirus 2019), plusieurs essais thérapeutiques impliquant l'administration par voie intraveineuse ou intranasale de VE isolées à partir de milieux de culture de cellules souches mésenchymateuses ont été démarrés (ChiCTR2000030484, NCT04276987, ChiCTR2000030261) sur la base d'études *in vitro* et pré-cliniques chez l'animal, dans des modèles de pathologies respiratoires comme le syndrome de détresse respiratoire aigu, l'hypertension artérielle pulmonaire ou l'asthme (Worthington and Hagood, 2020).

Cependant, à l'heure actuelle l'ISEV (*International Society for Extracellular Vesicles*) et l'ISCT (*International Society for Cell and Gene Therapy*) ont pris position contre l'utilisation de VE issues de MSCs dans le traitement de la Covid-19 (Börger et al., 2020). Tout en encourageant les recherches actives dans ce domaine, les auteurs mettent en avant des problèmes de contrôle qualité de la production et de la purification de ces VE, l'insuffisance de données pré-cliniques de sécurité et d'efficacité, ainsi que le design et la supervision des essais en cours.

II-2) micro-ARNs

II-2-a) Définition

Les micro-ARN sont des courtes séquences de nucléotides (20-24, généralement 22) simple brin, non codants, qui régulent de façon post-transcriptionnelle l'expression de certains gènes en se fixant sur des sites spécifiques complémentaires des ARNm ciblés. Les travaux de Lee et al. Sur le gène *lin-4*, nécessaire au développement du ver *C.elegans*, ont été les premiers à décrire un micro-ARN et son mécanisme d'action biologique. Le gène *lin-4* ne code pas pour une protéine, mais pour un petit ARN de 61 nucléotides (nt) de long, lui-même précurseur à une séquence de 22 nt, le micro-ARN, qui ne code pas pour une protéine, mais est capable de se fixer sur la région 3'UTR (untranslated region) de l'ARNm codant pour la protéine LIN-14 et de réguler sa traduction par une interaction ARN-ARN antisens (Lee et al., 1993). Des miARN jouant ainsi un rôle de régulation de l'expression génique ou « *gene silencing* » ont été décrits dans diverses espèces animales et végétales (Agrawal et al., 2003), avec des rôles dans le développement, la mort cellulaire et diverses fonctions comme le métabolisme, et de façon particulièrement intéressante, la différenciation hématopoïétique chez les mammifères (Brennecke et al., 2003 ; Chen, 2004). Ils ont également un rôle dans de nombreuses pathologies, y compris des cancers et des pathologies liées à l'immunologie (Kloosterman and Plasterk, 2006).

Ils existent chez tous les eucaryotes, et sont généralement fortement conservés au cours de l'évolution (Pasquinelli et al., 2000). Par ailleurs, les gènes qui codent pour ces séquences peuvent être situés au sein de clusters ou non, souvent dans des introns et donc avec une expression synchronisée avec celle d'une protéine, avec pour conséquence une régulation de leur synthèse au niveau de ces clusters, et dans certains cas uniquement dans un type cellulaire ou à un stade de développement donné (Bartel, 2004). Le site miRbase.org

(http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_summary.pl?org=hsa) recense environ 2000 séquences de miARN décrites chez l'Homme, et on estime que plus de 60% des gènes sont concernés par la régulation par ces séquences (Friedman et al., 2009).

II-2- b) Biosynthèse des miARN

Les loci du génome codant pour les miARN sont situés pour moitié dans des zones intragéniques (introns, exons) de gènes codant pour des protéines (leur expression est donc régulée par les promoteurs de ces gènes), et pour moitié dans des zones intergéniques, avec un promoteur propre régulant leur transcription (Kim and Kim, 2007 ; O'Brien et al., 2018 ; The FANTOM Consortium et al., 2017). Ces séquences sont transcrites grâce à des ARN polymérase II et III (Ha and Kim, 2014), synthétisant de façon canonique un « primary transcript » ou pri-miRNA, petit ARN double brin possédant une structure en tête d'épingle. Des motifs méthylés du pri-miR sont alors reconnus par la protéine DGCR8, qui recrute alors l'enzyme Drosha (Alarcón et al., 2015). Cette dernière est une Rnase III qui clive ce pri-miR en un « precursor miRNA » ou pre-miRNA, qui sera quant à lui transporté de façon active dans le cytoplasme par la Ran-GTP/exportine 5 où il sera clivé en miARN duplex mature par l'enzyme Dicer (Makarova et al., 2016 ; Okada et al., 2009 ; Zhang et al., 2004). L'enzyme Dicer, d'abord décrite chez la drosophile, est capable, grâce à des domaines de type RNase III, de cliver un ARN double brin pour générer deux fragments simple brin d'environ 22 nucléotides chacun, ou miARN duplex (Bernstein et al., 2001). Des homologues de cette enzyme ont été décrits chez de nombreuses autres espèces, qui provient selon la phylogénie d'un ancêtre commun (Golden et al., 2002) illustrant la forte conservation des voies de synthèse des miARN au cours de l'évolution.

Ce duplex est ensuite pris en charge par une protéine de la famille Argonaute (Ago) : un des deux brins, le « guide » (*guide strand*) forme le miARN mature et s'associe de façon active (en consommant de l'ATP) à la protéine Ago pour former le complexe miRISC (*miRNA-induced silencing complex*), tandis que le brin restant, dit « passager » (*passenger strand*) est classiquement éliminé (Ha and Kim, 2014 ; Yoda et al., 2010). Le complexe miRISC, contenant le miARN mature, peut alors réguler le niveau d'expression de ses cibles. Il existe également d'autres voies alternatives de synthèse des microARN, dites non-canoniques (Drosha/DGCR8-indépendante, Dicer-indépendante) (O'Brien et al., 2018). La biosynthèse de ces molécules est schématisée au sein de la **Figure 13**.

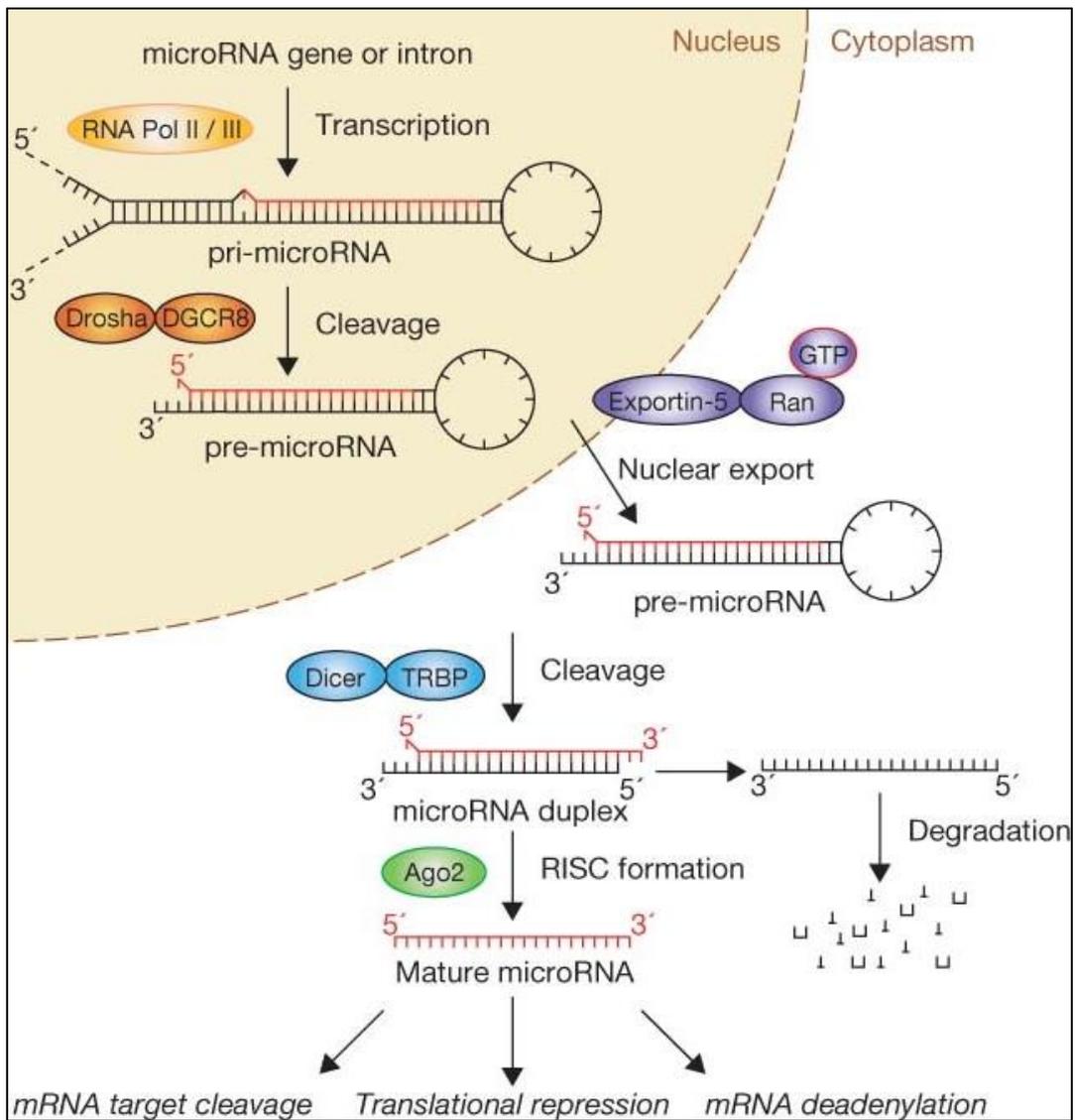


Figure 13 – Biosynthèse des micro-ARNs

Des pri-miRs sont transcrits par les ARN polymérase II et III, puis clivés par l'enzyme Drosha en pre-micro-ARN. Ces derniers sont exportés depuis le noyau vers le cytoplasme par le complexe Exportine 5-RanGTP, puis clivés par Dicer. Enfin, les micro-ARNs sont pris en charge par les protéines Argonaute (Ago2) pour former le complexe RISC fonctionnel (Winter et al., 2009).

II-2-c) Mécanismes d'action des miARN

Les miARNs matures ainsi synthétisés peuvent reconnaître des motifs qui leur sont partiellement complémentaires situés classiquement dans les parties 3'-UTR (*untranslated region*) sur les ARN messagers cibles, et induire leur dégradation ou inhiber leur traduction.

Tout d'abord, les ARNm ciblés peuvent être clivés directement par le complexe miRISC s'ils possèdent une séquence cible presque parfaitement ou parfaitement complémentaires (Jo et al., 2015) (**Figure 14**). La dégradation de ces ARNm peut également être favorisée par leur déstabilisation induite par les microARN. Cette déstabilisation est induite par l'interaction du complexe miRISC avec des protéines de la famille GW182, qui vont à leur tour interférer avec PABC (*poly-A-binding protein C*), causant la perte de la queue poly-A stabilisatrice, suivie par celle de la coiffe 5', induisant la sensibilité de l'ARNm ciblé à la digestion par les exonucléases (Huntzinger and Izaurralde, 2011 ; Ipsaro and Joshua-Tor, 2015 ; Jonas and Izaurralde, 2015). Ces mécanismes complexes mettent en jeu le recrutement de protéines intermédiaires qui ont été partiellement identifiées. Par exemple l'enzyme DCP2, capable de dégrader la coiffe stabilisatrice des ARNm, s'associe avec différentes protéines pour recruter directement l'exonucléase XRN1 ; ainsi les mécanismes d'élimination de la coiffe et de digestion de l'ARNm ainsi déstabilisé sont couplés de façon efficace (Braun et al., 2012).

On sait également que les miARN peuvent posséder des sites de fixation en dehors de la région 3'-UTR précédemment évoquée : dans la région codante des ARNm ou en 5'-UTR, induisant également dans ce cas une répression de l'expression génique (Forman et al., 2008 ; Zhang et al., 2018). A l'inverse, la fixation d'un miARN sur un promoteur peut induire l'expression génique des protéines que celui-ci régule, et ainsi induire une plus grande production d'un ARNm et de la protéine pour laquelle il code (Dharap et al., 2013).

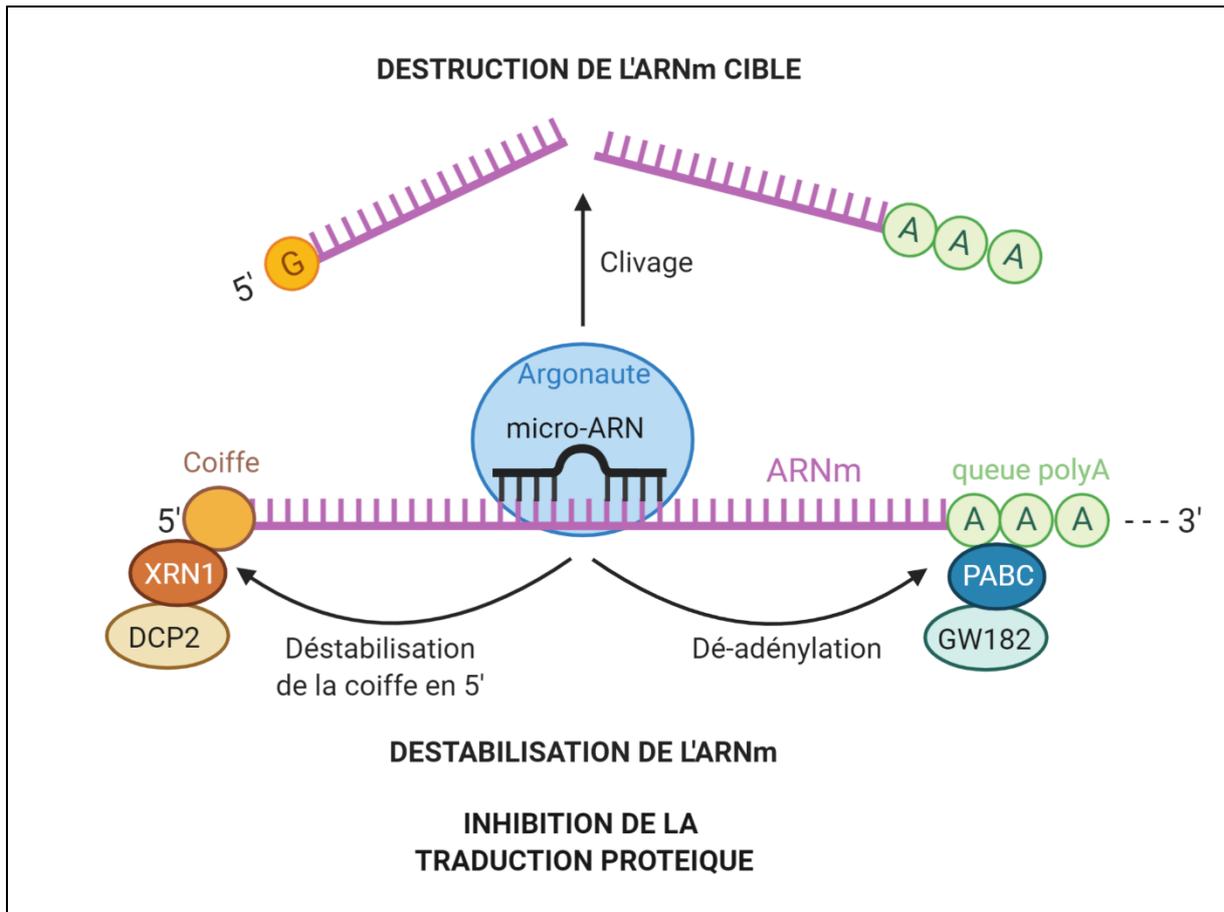


Figure 14 – Modes d’actions des micro-ARNs

Les micro-ARNs pris en charge par les protéines Argonaute au sein du complexe miRISC, peuvent causer un clivage direct de l’ARNm cible, ou bien inhiber sa traduction. Certains des mécanismes impliqués passent par une déstabilisation de sa coiffe en 5’ ou de sa queue poly-A en 3’, empêchant l’initiation ou l’élongation de la traduction et rendant ces ARNm plus sensibles à la destruction par des nucléases.

II-3) Physiopathologie du transfert de miRNA

II-3-a) Physiologie, développement et pathologie

Le transfert de micro-ARN fonctionnels est réalisé via des VE sécrétées par une cellule productrice, et est capable d'induire dans la cellule « réceptrice » une downrégulation de l'expression de gènes cibles, et donc un impact biologique. Il a été décrit pour la première fois en 2007 par Valadi et ses collègues (Valadi et al., 2007). Certaines études ont également décrit un transfert de complexes mi-RISC (micro-ARN et protéine Argonaute) fonctionnels (Laffont et al., 2013). Depuis, ce mécanisme de communication intercellulaire a été décrit dans de nombreuses situations physiologiques, pathologiques, ainsi qu'au cours du développement.

Les micro-ARN ont un rôle régulateur à différentes étapes du développement des organismes (Brennecke et al., 2003). Des transferts de miARNs ont été décrits chez l'homme entre le trophoblaste et les cellules du placenta de la mère lors de la grossesse (Luo et al., 2009), leur conférant une résistance accrue aux infections virales (Delorme-Axford et al., 2013 ; Mouillet et al., 2014). En outre, le lait maternel contient des exosomes, chargés notamment en miARNs, qui sont majoritairement stables après digestion et peuvent être captés par les cellules de la barrière épithéliale digestive pour y avoir un impact biologique (Liao et al., 2017). Ces VE ont en particulier des propriétés immunorégulatrices, et pourraient influencer à long terme les phénomènes allergiques en jouant sur les Tregs (Admyre et al., 2007 ; Melnik et al., 2014). En dehors de ce rôle dans le développement, le crosstalk intercellulaire par transfert de miARNs est impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques. Cela peut s'illustrer par exemple par la pigmentation de la peau, déterminée au niveau des mélanocytes, qui est modulée par la sécrétion de miARNs provenant des kératinocytes en contact avec le rayonnement ultraviolets (Cicero et al., 2015). Pour prendre un exemple issu du système immunitaire, le transfert de miARNs aux cellules présentatrices

d'antigène depuis les lymphocytes T participe à la formation de la synapse immunologique (Mittelbrunn et al., 2011).

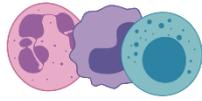
Par ailleurs, ce type de communication intercellulaire peut participer au maintien de l'homéostasie dans les tissus et les organes. Par exemple, les cellules endothéliales peuvent sécréter des VE contenant le miR-214, qui une fois internalisé par d'autres cellules endothéliales voisines aura un effet anti-sénescence et donc pro-angiogénique (van Balkom et al., 2013). Dans le cadre du remodelage osseux, les ostéoclastes et ostéoblastes échangent des vésicules contenant des miARNs (miR-214, miR-140-3p...), qui régulent la différenciation et la fonction de ces cellules (Xie et al., 2017).

Mais ce type d'échange moléculaire est également impliqué dans de nombreux mécanismes pathologiques. Une part importante des découvertes dans les domaines de recherche touchant aux VE et à leur contenu ont été faites dans le domaine de la cancérologie. En effet, plusieurs études ont montré des transferts de miARNs favorisant la prolifération, la propagation, le remodelage de la niche tumorale ou la résistance aux traitements (André-Grégoire and Gavard, 2017 ; Bronisz et al., 2014 ; Cereghetti and Lee, 2014 ; Chan et al., 2005 ; Dai et al., 2018 ; Grange et al., 2011 ; Huan et al., 2013 ; Kogure et al., 2011 ; Munoz et al., 2013 ; Skog et al., 2008 ; Tadokoro et al., 2013 ; Tormo et al., 2019 ; van der Vos et al., 2016 ; Yang et al., 2011 ; Zhuang et al., 2012). De nombreux transferts pathologiques de microARNs ont été mis en évidence dans de multiples contextes : maladies cardiovasculaires (Fujita et al., 2015), hépatiques (Povero et al., 2015), ou infections (Buck et al., 2014 ; Dreux et al., 2012 ; Haneklaus et al., 2012 ; Schorey et al., 2015 ; Théry et al., 2009).

La littérature décrit des exemples très éclairants de transfert de micro-ARNs au cours de situations pathologiques en lien avec le système immunitaire, régulant la fonction de cellules comme les lymphocytes T, de monocytes, de cellules dendritiques (Ismail et al., 2013 ;

Kamalden et al., 2017 ; Montecalvo et al., 2012 ; Njock et al., 2015 ; Okoye et al., 2014 ; Salama et al., 2014). Par exemple, Tung et ses collègues ont démontré que des VE chargées en miR-150-5p et miR-142-3p transmettent ces miARN à des cellules dendritiques (CD), induisant un phénotype tolérogène de ces cellules, avec en particulier une production accrue d'IL-10 et une diminution de celle de l'IL-6 après stimulation au LPS (Tung et al., 2018). A l'inverse, certaines situations au cours desquelles ces échanges de miARN sont bénéfiques ont également été décrites. On sait par exemple que le miR-223, contenu dans des VE de neutrophiles, peut être transmis aux cellules épithéliales pulmonaires et avoir un effet protecteur dans un contexte d'inflammation aiguë du poumon (Neudecker et al., 2017a). Des exemples de ces transferts de miARNs ont été résumés au sein de la **Figure 15**.

PHYSIOLOGIE / DEVELOPPEMENT



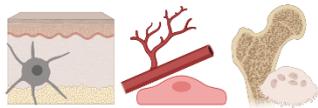
Immunité

-Immunorégulation :

Cellules endothéliales - monocytes : miR-10a
Tregs -Cellules dendritiques : miR-142-3p, miR-150-5p
(Niock et al. 2015; Tung et al. 2018)

-Synapse immunologique :

T/Cellules présentatrices d'antigènes : miR-335
(Mittelbrunn et al. 2011)



Homéostasie Tissulaire

-Pigmentation : Kératinocytes/Mélanocytes :
miR-203, miR-3196 (Cicero et al. 2015)

-Angiogenèse : Cellules endothéliales : miR-214 (van Balkom et al. 2013)

-Remodelage osseux : Ostéoclastes/Ostéoblastes :
miR-214, miR-140-3p (Xie et al. 2017)



Développement :

-Grossesse : Trophoblaste/Placenta : miR-517a
(Luo et al. 2009; Brennecke et al. 2003)

-Allaitement (Liao 2017; Admyre et al. 2017; Melnik et al. 2014)

PATHOLOGIE



Pathologies cardio-vasculaires et métaboliques

-Bronchopneumopathie / Tabac :

C épithéliales / Fibroblastes : miR-210
(Fujita et al. 2015)

-Inflammation pulmonaire :

Neutrophiles / C épithéliales : miR-223
(Neudecker et al. 2017)

-Fibrose : hépatocytes - cellules stellaires :
miR-128-3p (Povero et al. 2015)

-Ischémie-reperfusion : Progéniteurs endothéliaux /
C rénales : miR-126, miR-296 (Cantaluppi et al. 2012)

-Athérosclérose : C endothéliales / musculaires
lisses : miR-143/145 (Hergenreider et al. 2012)



Cancers

-Glioblastome :

Entre cellules tumorales : miR-1, miR-21

Vers la microglie : miR-451, miR-21

Résistance au traitement : miR-9

(Bronisz et al. 2014; Chan et al. 2005; Munoz et al. 2013; Skog et al. 2008; van der Vos et al. 2016)

-Cancer colorectal / Leucémie myéloïde :

Micro-environnement tumoral : miR-10b, miR-150
(Dai et al. 2018; Huan et al. 2018)



Infections

-Virus, Parasites (Buck et al. 2014; Pfeffer 2004)

Auto-immunité

-Diabète de type II :

Cellules β / C dendritiques, C de Müller : miR-29b,
miR-15a (Kamalden et al. 2017; Salama et al. 2014)

Figure 15- Exemples de transfert de micro-ARNs dans des contextes physiologiques et pathologiques

Des transferts de miARNs ont été décrits dans la littérature entre de nombreux types cellulaires et dans des contextes physiologiques et pathologiques variés. Cette figure en présente quelques exemples.

II-3-b) Utilisation pronostique des miARNs comme biomarqueurs

Le transfert de miARN a été décrit dans de nombreuses pathologies cardio-vasculaires, comme l'athérosclérose (Zhang et al., 2010), dans de nombreux cancers, mais également dans des pathologies infectieuses, notamment parasitaires (Buck et al., 2014 ; Schorey et al., 2015) et virales (Dreux et al., 2012 ; Haneklaus et al., 2012 ; Théry et al., 2009). On sait par exemple que des virus comme l'Epstein-Barr Virus (EBV) codent pour des miARNs, qui sont retrouvés dans les cellules infectées (Pfeffer, 2004). Ainsi, le profil des miARNs sécrétés par les VE peut refléter leur état d'activation, ou une infection par exemple. La découverte de ces mécanismes de communications intercellulaire, et de leurs dérégulations dans des situations pathologiques a donc généré de nombreuses pistes d'utilisation de micro-ARNs comme biomarqueurs.

La présence de ces miARNs au sein de vésicules extracellulaires permet en effet de les préserver de la dégradation par les nucléases, et les rend facilement accessibles par de simples prélèvements de différents fluides biologiques (plasma, urine, salive...), c'est-à-dire de façon non ou peu invasive et donc potentiellement intéressante en clinique. On sait par exemple que les micro-ARN circulants, détectables dans le plasma de femmes enceintes au cours du premier trimestre de grossesse, peuvent prédire la naissance avant terme (Cook et al., 2019).

Le profil des micro-ARNs circulants pourrait également permettre de prédire la sévérité ou la résistance aux traitements de certaines pathologies, notamment en oncologie. Un panel de 5 miARNs dosés dans le plasma permet de détecter le développement de cancers gastriques à des stades précoces (Zhu et al., 2014). Plusieurs études ont permis de mettre en avant des miARNs permettant de prédire la résistance aux traitements, notamment de cancers du sein (miR-125b) ou de l'estomac (Matuszcak, 2014 ; Wang et al., 2012). En dehors du champ de la cancérologie, les modifications du profil d'expression de miARNs dans un tissu ou

dans la circulation ont pu montrer un intérêt pronostique ou prédictif, dans la détection précoce de l'hépatite aigüe (Elfimova et al., 2012), de maladies neurodégénératives (Kocerha et al., 2011), la réponse au traitement de la tuberculose (Wagh et al., 2017) ou de l'épilepsie (Wang et al., 2015).

Cette utilisation des miARNs comme biomarqueurs est actuellement testée lors d'essais cliniques, comme le miR-155 libre dans le diagnostic du cancer de la vessie (NCT03591367) ou le miR-146a dans la périodontite chronique (NCT03721159). Un essai mené par l'Assistance Publique / Hôpitaux de Paris (APHP) étudie et compare actuellement le profil d'expression de 25 miRs de biopsies endoscopiques et des selles, chez des patients souffrant de la maladie de Crohn ou de rectocolite hémorragique et des volontaires sains (NCT02020382). Le site <https://clinicaltrials.gov/> recense à ce jour plus de 545 essais portant les mots-clés « micro-RNA » et « Biomarkers ».

II-3-c) Utilisation thérapeutique du transfert de miARNs

Outre cette utilisation des micro-ARNs comme biomarqueurs, l'étude de ces mécanismes pourrait déboucher sur des stratégies thérapeutiques d'administration de miARNs ou d'inhibiteurs. Plusieurs stratégies ont été développées, notamment l'administration directe de micro-ARNs, d'analogues modifiés ou d'inhibiteurs, de façon systémique ou locale (intraveineux, sous-cutané...), ou leur administration au sein de vecteurs. Ces vecteurs peuvent être des vésicules « natives » récoltées à partir de surnageants de culture, ou des vésicules artificielles dans lesquelles ces molécules ont été chargées. Ces méthodes d'administration ont fait l'objet d'avancées récentes (Ebert and Sharp, 2010 ; Stenvang et al., 2012 ; Wang et al., 2018 ; Zhang et al., 2013).

II-3-c-i) Stratégies thérapeutiques de surexpression ou d'inhibition des micro-ARNs

Des miARNs synthétiques, ou « *mimics* » analogues aux micro-ARNs « natifs » peuvent être injectés *in vivo*, comme par exemple le mimic du let-7b injecté en intratumoral dans un modèle murin de cancer du poumon (Trang et al., 2010). Ces miRs peuvent être injectés de façon systémique, seuls ou au sein de vecteurs lipidiques afin de favoriser leur stabilité dans la circulation et leur internalisation par les cellules cibles. Wiggins, Trang et leurs collègues l'ont démontré avec succès dans un modèle murin, en injectant des analogues du miR-34 et du let-7c à l'aide d'une émulsion de phospholipides neutres (« Max Suppressor *in vivo* RNA-Lancer II », BIOO Scientific Corp). Ils ont pu observer une diminution du volume tumoral chez les souris traitées suite à cette injection (Trang et al., 2011 ; Wiggins et al., 2010). Des stratégies utilisant des nanoparticules de synthèse comme vecteurs permettent également de délivrer un miARN à une cellule cible dans un but thérapeutique (Lee et al., 2019).

D'autres méthodes de transport d'acides nucléiques d'intérêt ont été développées, comme la technologie des EDV (EnGeneIC Dream Vector) Nanocells (EnGeneIC Ltd), qui consiste à modifier le cycle de division cellulaire de bactéries afin de générer des « mini »-cellules, non viables, de les charger en molécules d'intérêt, et de les « *coater* » avec des anticorps dirigés contre des récepteurs tumoraux de surface afin de les diriger de façon spécifique sur les cellules cancéreuses et de favoriser leur endocytose (MacDiarmid et al., 2007). Cette stratégie a été utilisée avec succès *in vivo*, dans des modèles animaux (Glover et al., 2015 ; MacDiarmid et al., 2007), et a même été testée dans des essais cliniques de phase I, par exemple pour délivrer des analogues du miR-16 et du miR-34a à des tumeurs dans le but d'inhiber leur prolifération (Reid et al., 2016).

Concernant l'inhibition de ces micro-ARNs, on peut utiliser des oligonucléotide antisens « bloqués » (« *locked-nucleotid acid* » ou LNA), ou des « éponges » à micro-ARNs. Un

LNA est un ARN dont le résidu ribose est modifié avec un pont méthylène, qui ne bloque pas la fixation à une séquence complémentaire mais augmente les propriétés d'hybridation et notamment la température de fusion moléculaire, permettant ainsi d'empêcher le micro-ARN dont il est complémentaire de se fixer sur sa cible tout en induisant sa dégradation. Une équipe a par exemple établi la preuve de concept de l'utilisation de ces molécules, en montrant que le blocage du miR-222 par un inhibiteur de type LNA dans un modèle de leucémie permettait de diminuer la viabilité de ces cellules (Dehkordi et al., 2017).

Autre outil d'inhibition des miARN, les « éponges » à micro-ARN sont des séquences portant de nombreux sites de fixation pour les miARNs d'intérêt (Ebert and Sharp, 2010) pouvant ainsi « titrer » ces séquences ciblées et les empêcher de se fixer sur leur ARNm cibles. L'inhibition du miR-326 par une stratégie de type « éponge » a été entre autres testée *in vivo* dans un contexte auto-immun en lien avec le développement de la sclérose en plaque (Du et al., 2009).

II-3-c-ii) Utilisation thérapeutique du transfert de microARN : preuves de concept

Par conséquent, des stratégies thérapeutiques visant à interférer avec le transfert de miARN, ou à administrer un analogue ou un inhibiteur de micro-ARN ont été testées dans des modèles animaux. Certaines de ces stratégies thérapeutiques, ont démontré un intérêt dans de nombreux contextes pathologiques (neurologie, oncologie, auto-immunité, transplantation), dont de nombreux étant en lien avec le système immunitaire (Alvarez-Erviti et al., 2011 ; Cantaluppi et al., 2012 ; Chen et al., 2020 ; Ohno et al., 2013 ; Salama et al., 2014 ; Yan et al., 2016 ; Zou et al., 2016). L'utilisation de VE endogènes ou artificielles comme véhicule de miARN, de leurs inhibiteurs ou de stratégies équivalentes a donc déjà prouvé son

efficacité *in vivo*, mais également lors d'essais cliniques au sein de groupes de patients humains.

En effet, la première preuve de concept de l'utilisation d'un inhibiteur spécifique d'un miARN dans un but thérapeutique chez l'Homme a été faite dans le cadre du traitement du virus de l'hépatite C (HCV). Brièvement, le miR-122, exprimé par les hépatocytes, interagit avec le génome viral, cette interaction permettant de stabiliser ce dernier et participant à l'infection. En utilisant le miravirsén, un oligonucléotide modifié complémentaire au miR-122, dans le but de former un hétéroduplex stable avec ce miARN et d'inhiber sa fixation sur le génome viral, Janssen *et al.* ont montré lors d'un essai clinique une réduction prolongée de la charge virale de façon dose-dépendante (Janssen et al., 2013). Cette étude, même si elle correspond à un contexte pathologique particulier, permet d'établir la preuve de concept de l'inhibition des micro-ARNs comme une stratégie thérapeutiques d'intérêt, d'autant plus que leur ciblage *in vivo* est l'objet d'avancées récentes (Ebert and Sharp, 2010 ; Stenvang et al., 2012 ; Wang et al., 2018 ; Zhang et al., 2013).

D'autres essais cliniques ont été démarrés. L'essai NCT02855268 (ClinicalTrials.gov) concernant la molécule Lademirsén (SAR339375, RG-012), mené par Regulus et Sanofi, est actuellement en phase 2. Cette molécule est un inhibiteur du micro-ARN pro-fibrotique miR-21. Elle est injectée en sous cutané de façon hebdomadaire, dans le but d'évaluer la sûreté, la tolérance, l'immunogénicité, la pharmacocinétique et l'efficacité de ce traitement pour éviter le déclin de la fonction rénale dû au syndrome d'Alport. La fin de cet essai est estimée pour 2023. D'autres essais au stade préclinique ont été annoncés par la société Regulus : le RGLS4326 qui inhibe le miR-17 afin de diminuer la formation de kystes dans le cadre de la polykystose rénale type dominant est testé dans le cadre d'un essai de phase 1, et des essais pré-cliniques sont en cours, concernant entre autres l'oligonucléotide RGLS5579, qui est un inhibiteur du

miR-10b, utilisé de façon complémentaire au cours du traitement du glioblastome (<http://regulusrx.com/programs/pipeline/>).

La société miRagen recrute également pour un essai de phase 1 de la drogue MRG-110, un LNA antisens ciblant le miR-92 pour faciliter la cicatrisation et l'insuffisance cardiaque. Des essais de phase 1 (MRG-201, inhibiteur du miR-29 utilisé pour prévenir la formation de tissu cicatriciel chéloïdien) et de phase 2 (MRG-106 ou Cobomarsen, ciblant le miR-155 dans le lymphome), sont également menés par la même compagnie. Enfin, l'étude MesomiR (NCT02369198), en phase 1, étudie l'impact de l'administration en intraveineuse d'un analogue du miR-16 dans le mésothéliome et le cancer bronchique non à petites cellules. Le mimic est encapsulé dans des EDV (technologie décrite plus haut) coatées avec un anticorps anti-EGFR pour être dirigées contre les cellules tumorales surexprimant ce récepteur.

II-3-d) Les cellules endothéliales : des cibles privilégiées du transfert de micro-ARN

De par leur localisation, au contact direct de la circulation sanguine, les cellules endothéliales (CE) sont des cibles privilégiées des VE circulantes, en provenance de nombreux types cellulaires et notamment des cellules immunitaires (cf **Tableau III**). Elles peuvent donc en théorie recevoir à distance le contenu de VE, dont les micro-ARNs qu'elles portent, en provenance de l'organisme entier, et ainsi participer à des phénomènes physiopathologiques systémiques. En outre, ces cellules ont une capacité significative d'endocytose des VE, grâce à des mécanismes actifs impliquant la clathrine (Banizs et al., 2018). Par exemple, les plaquettes activées par la thrombine relarguent des VE contenant le miR-223, qui est transféré aux cellules endothéliales dans lesquels il régule l'expression de gènes cibles (Laffont et al., 2013), tandis que les neurones participent au maintien de l'intégrité du réseau vasculaire cérébral via le transfert du miR-132 (Xu et al., 2017).

De nombreuses cellules immunitaires relarguent des VE à destination des CE. Par exemple, le miR-150 transféré par les VE de monocytes induit la migration endothéliale (Zhang et al., 2010). Certains des mécanismes impliqués dans des pathologies liées au système immunitaire peuvent également impliquer d'autres types cellulaires ; comme par exemple les cardiomyocytes, qui dans un modèle de diabète auto-immun chez le rat produisent des exosomes contenant le miR-320. Une fois transféré aux CE, ce dernier interagit avec plusieurs voies de signalisation, inhibe la migration et la formation de tubes endothéliaux, ce qui participe en partie à l'angiogenèse insuffisante observée dans le diabète de type 2 (Wang et al., 2014). Des cellules cancéreuses peuvent utiliser ce mécanisme pour transférer des miARNs capables d'induire une néo-angiogenèse pro-tumorale, comme évoqué précédemment, en particulier pour répondre à des conditions d'hypoxie dans le micro-environnement de la tumeur. Par exemple, des lignées issues de leucémie ou de myélome multiple sous hypoxie prolongée produisent, *in vitro*, des VE transférant respectivement le miR-210 et le miR-135b aux cellules endothéliales, favorisant l'angiogenèse (Tadokoro et al., 2013 ; Umezu et al., 2014).

A l'inverse, les cellules endothéliales sont également sources de VE pouvant transporter des micro-ARNs, pouvant avoir des rôles protecteurs ou pathogéniques dans différentes pathologies cardiovasculaires (athérosclérose) par exemple (Hergenreider et al., 2012), parfois de façon auto-typique, avec pour cibles d'autres cellules endothéliales. Le transfert entre CE du miR-214 permet par exemple de réguler l'angiogenèse (van Balkom et al., 2013). Ces phénomènes sont complexes, et la production, l'encapsulation puis la capture des miARNs par les acteurs concernés varie non seulement en fonction du type cellulaire mais également de son état d'activation et des stimuli qu'il a pu recevoir, comme par exemple la

stimulation au TNF α qui modifie le profil en miARNs des VE issues des cellules endothéliales (Alexy et al., 2014).

Enfin, les neutrophiles sont également sources de VE pouvant transférer des miARNs biologiquement actifs aux CE. En effet, les neutrophiles, dans le cadre de l'athérosclérose, s'accumulent dans les vaisseaux touchés et participent à mettre en place un micro-environnement pro-inflammatoire. Gomez et ses collègues ont pu démontrer que cela passe en partie par un transfert du miR-155 aux CE par des VE de neutrophiles, qui induit un phénotype inflammatoire (induction de l'expression membranaire d'ICAM-1, de VCAM-1, de CCL2) de ces cellules via l'activation de la voie NF κ B (Gomez et al., 2020). Les auteurs avancent que ces changements facilitent le recrutement de monocytes *in situ* et donc le développement des plaques athérosclérotiques. Les miARNs issus de neutrophiles semblent donc intéressants à étudier dans le cadre de pathologies impliquant des lésions vasculaires.

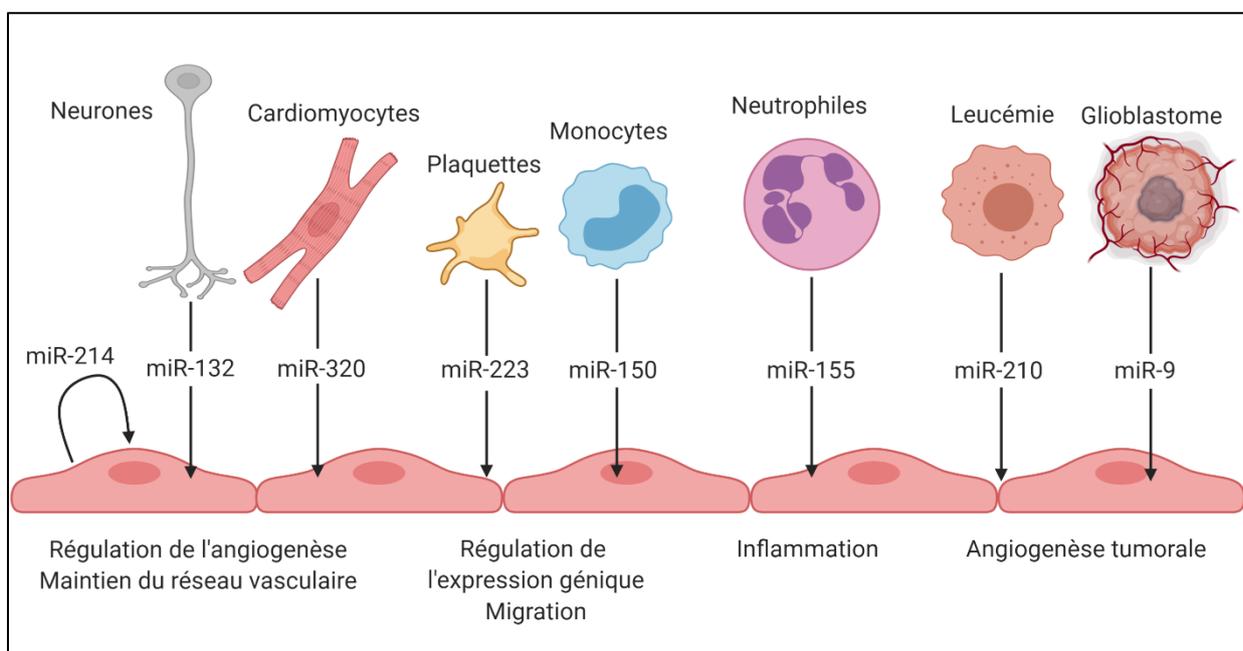


Figure 16 – Exemples de transferts de micro-ARNs aux cellules endothéliales

Des transferts de miARNs ont été décrits dans la littérature entre de nombreux types cellulaires et à destination des cellules endothéliales (CE). Cette figure en présente quelques exemples.

II-3-e) Le transfert de micro-ARN entre neutrophiles et cellules endothéliales : un rôle des miARNs dans les VAA ?

Les neutrophiles de patients atteints de vascularites associées aux ANCA en phase aiguë produisent davantage de VE que les volontaires sains, et que les patients atteints d'autres néphropathies ou de vascularites en phase de rémission (Daniel et al., 2006; Hong et al., 2012). Cette induction est en partie due à la stimulation par les ANCA de neutrophiles pré-activés par un contexte inflammatoire. Ces VE portent la protéinase 3 et la myéloperoxidase, et induisent l'expression membranaire d'ICAM-1 ainsi que la production d'IL-6, d'IL-8, d'espèce réactives de l'oxygène et de thrombine par l'endothélium (Hong et al., 2012). Ces données ont permis de mettre en avant les VE de neutrophiles comme sujet de recherche d'intérêt dans le cadre de l'étude des mécanismes physiopathologiques conduisant au développement des VAA, et notamment dans les mécanismes des lésions endothéliales, qui ne sont pas encore totalement élucidés.

La littérature décrit par ailleurs l'impact de VE issues de neutrophiles sur l'endothélium. Ces vésicules peuvent être internalisées par les CE et y induire une régulation de l'expression génique (Dalli et al., 2013). En particulier, les VE sécrétées par des neutrophiles activés activent la voie JNK1 dans les cellules endothéliales, induisant un phénotype de pro-thrombotique et pro-inflammatoire, caractérisé par une sécrétion accrue de CCL2/MCP-1 (*Chemokine Ligand 2 / Monocyte Chemoattractant Protein-1*), d'IL-6, et d'IL-8 (Mesri and Altieri, 1998, 1999). Le transfert de MPO aux CE par les VE de neutrophiles activés induit des lésions vasculaires directes : modification de leur morphologie et déstabilisation de la barrière endothéliale (Pitanga et al., 2014).

Les VE de neutrophiles, qui ont par ailleurs des fonctions immunorégulatrices (Eken et al., 2008), semblent donc être des acteurs potentiels dans les mécanismes de lésions

endothéliales au cours des VAA. Cependant, leur contenu, et notamment les micro-ARNs qu'elles transportent, n'étaient pas décrits.

III - OBJECTIFS DE LA THESE

III-1) Hypothèse de travail

L'hypothèse de travail à l'origine de mon travail de thèse est donc que les VE relarguées par les neutrophiles suite à leur activation par les ANCA transportent des micro-ARNs, et les transfèrent aux cellules endothéliales microvasculaires au cours des VAA, participant ainsi au développement des lésions vasculaires (**Figure 16**).

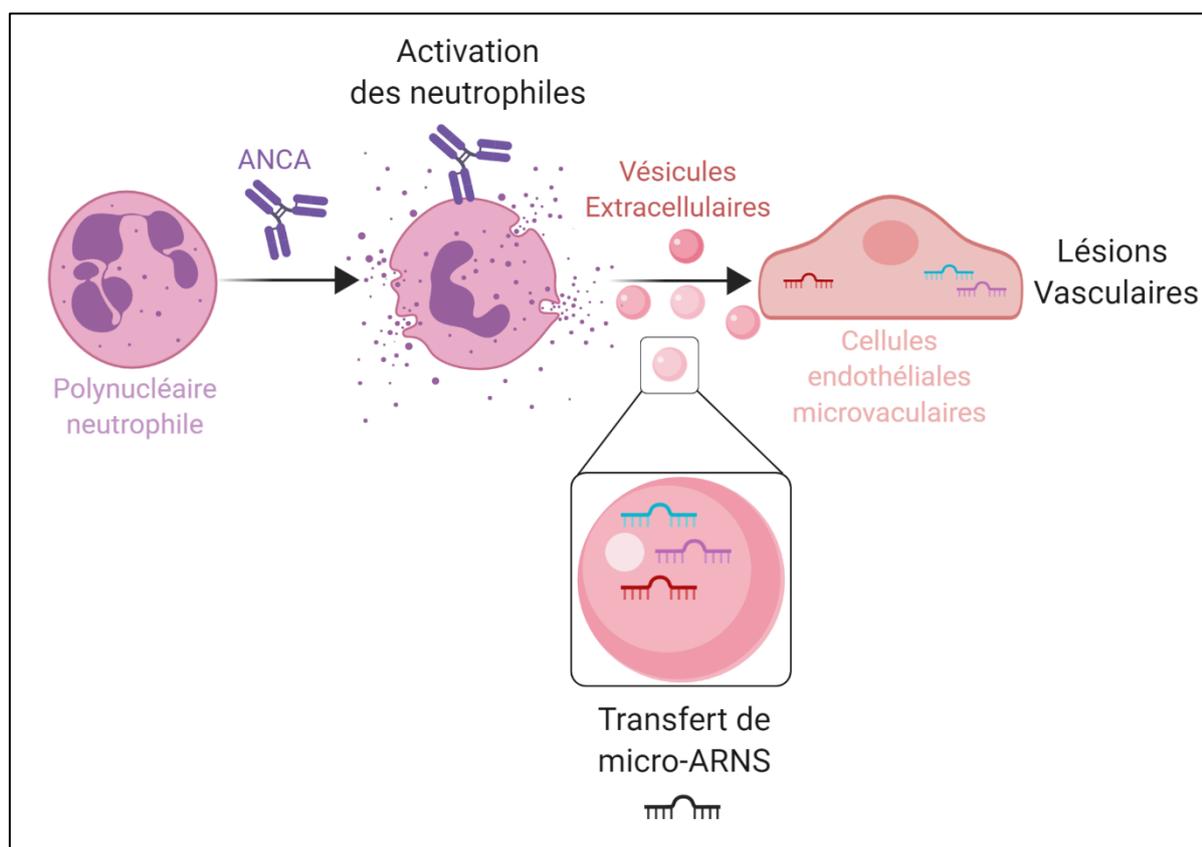


Figure 16 – Hypothèse de Travail : Les neutrophiles activés par les ANCA produisent des VE capables de transférer des miARNs aux cellules endothéliales, participant aux lésions vasculaires observées au cours des VAA

III-2) Objectifs

Le premier objectif de ce travail était donc de déterminer si les neutrophiles activés par les ANCA relarguent des VE chargées en micro-ARNs qui vont cibler et être internalisées par les CE microvasculaires, et d'identifier les miARNs transférés. Pour cela, nous avons mis en place un modèle d'activation *in vitro* des neutrophiles (**Figure 17**). Brièvement, des neutrophiles de volontaires sains sont pré-activés durant 15 minutes avec 2 ng/mL de TNF α , afin d'induire une expression membranaire de PR3, puis activés avec 5 μ g/mL d'ANCA anti-PR3 monoclonal pendant 4h. Leurs VE sont ensuite collectées par précipitation, et coincubées 24 heures avec des cellules endothéliales microvasculaires dermiques humaines. Ces cellules sont ensuite lysées, leur profil en micro-ARNs criblé à l'aide de plaques de TLDA (Taqman Low Density Array), et les résultats sont validés par des qPCR spécifiques.

Une fois les miARNs identifiés, le second objectif de ces travaux était de screener les principaux impacts biologiques de ces miARNs. Pour cela, nous avons mis en place un modèle de surexpression *in vitro* miARNs identifiés à l'étape précédente par transfection de leurs mimics spécifiques, et étudié 48h après transfection leur impact sur l'apoptose, la prolifération, la sécrétion de cytokines et chimiokines, la signalisation intracellulaire, ainsi que sur la capacité de ces CE à cicatriser une lésion et à former des tubes endothéliaux au sein d'une matrice extracellulaire.

La troisième étape consistait ensuite à valider les résultats obtenus suite à la transfection de fortes concentrations de mimics dans un modèle plus physiologique. Pour cela, nous avons coincubé des CE avec des VE de neutrophiles activés par des ANCA ou des IgG totales issues de plasmaphèreses de patients. Nous avons réalisé les mêmes expériences en utilisant des cellules microvasculaires préalablement transfectedes avec des inhibiteurs des micro-ARNs

d'intérêt (« antagomiRs »), afin de quantifier la part de chaque micro-ARN dans l'effet global des VE sur les CE.

Enfin, nous avons cherché à comparer les quantités de micro-ARN d'intérêt retrouvées dans des biopsies rénales de patients atteints de vascularites en phase aigüe avec d'autres patients en phase non inflammatoire, ainsi qu'à des patients atteints d'autres pathologies rénales inflammatoires (lupus).

Ces résultats ont fait l'objet d'un article en cours de reviewing pour *Kidney International*.

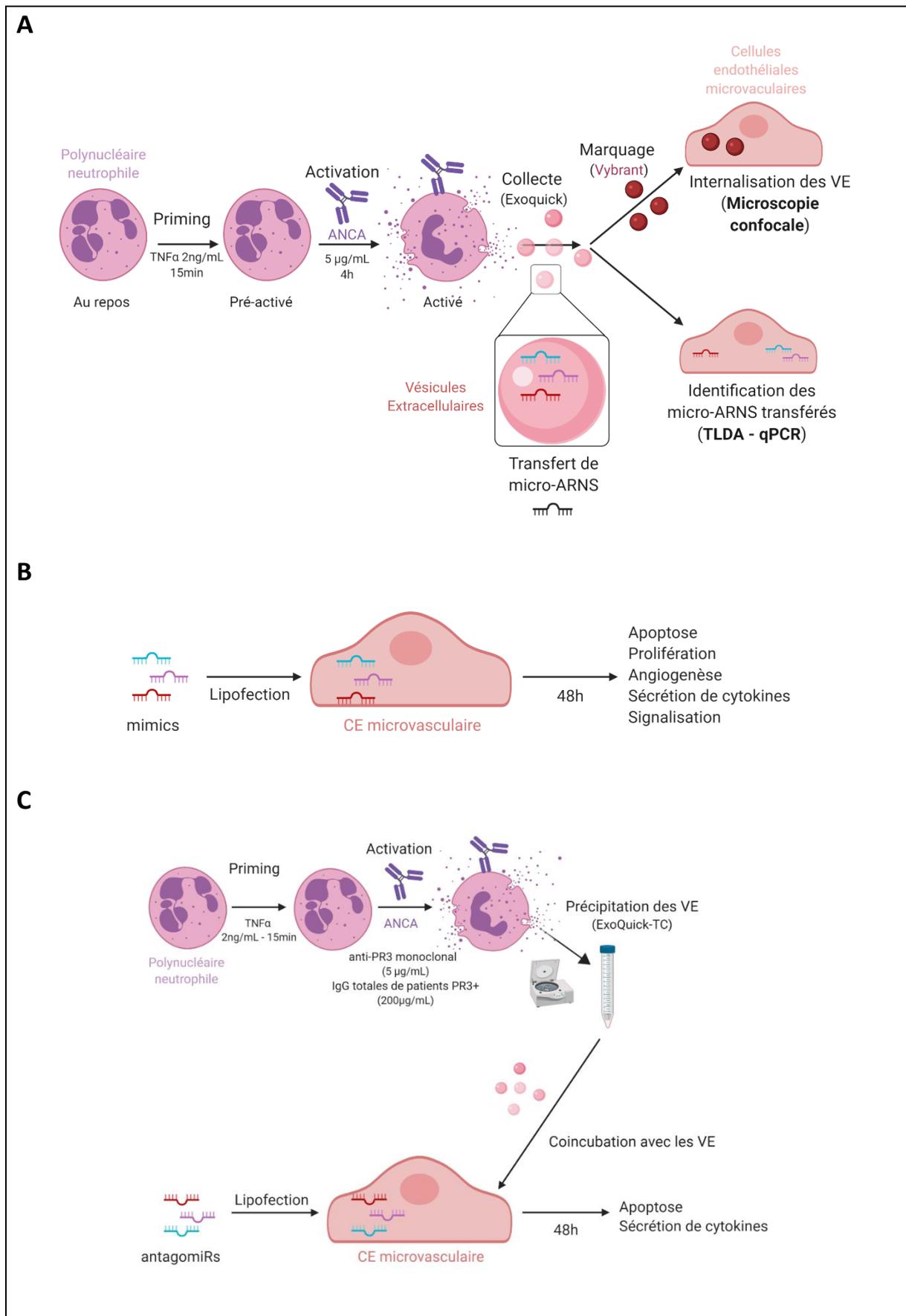


Figure 17 – Description des modèles *in vitro* utilisés lors de notre étude

Figure 17 – Description des modèles *in vitro* utilisés lors de notre étude

A. Modèle d'activation *in vitro* de neutrophiles par des ANCA anti-PR3, collecte des EV produites, identification des micro-ARNs transférés

Les neutrophiles sont primés à l'aide de 2ng/mL de TNF α (15min), ce qui induit l'externalisation de la Protéinase 3, accessible au binding par des ANCA anti-PR3 (5 μ g/mL, 4h). Les surnageants de culture sont collectés, les cellules et gros débris culottés, et les VE concentrées par précipitation en suivant le protocole Exoquick-TC décrit précédemment. Les VE sont co-incubées avec des CE microvasculaires dermiques humaines (HDMEC), les micro-ARNs induits par cette co-incubation sont identifiés par Taqman Low Density Arrays (TLDA), et les résultats sont vérifiés par des qPCR spécifiques de ces miARNs. Parallèlement, une partie des VE collectées sont marquées à l'aide de Vybrant, permettant de visualiser leur capture par les HDMEC en microscopie confocale.

B. Modèle de surexpression *in vitro* d'analogues de micro-ARNs

Les cellules endothéliales (CE) microvasculaires dermiques sont transfectées avec 10nM de miRNA mimics (Ambion, Life Technologies) à l'aide de Lipofectamine[®]RNAimax (ThermoFisher), ou avec un mimic contrôle négatif. 48h plus tard, les principales fonctions biologiques de la cellule endothéliale ont été analysées par cytométrie en flux (apoptose, prolifération), qPCR et Western Blot (Signalisation), qPCR et ELISA (Sécrétion de cytokines et chimiokines), culture en Matrigel (formation de tubes endothéliaux) et expérience de wound-healing (cicatrisation).

C. Modèle de co-incubation des cellules endothéliales microvasculaires avec les VE issues de neutrophiles activés par les ANCA

Les VE de neutrophiles sont collectées par précipitation et centrifugation (ExoQuick-TC) suite à un priming au TNF α (2ng/mL, 15min) puis une activation (4h) à l'aide d'anti-PR3 monoclonaux (5 μ g/mL) ou d'IgG totales de patient VAA possédant des anti-PR3 circulants (200 μ g/mL). Ces VE sont co-incubées avec des cellules endothéliales microvasculaires dermiques transfectées ou non avec des antagomiRs (inhibiteurs spécifiques des miARN précédemment identifiés, ou un antagomiR contrôle), et les paramètres biologiques d'intérêt sont étudiés 48h après cette co-incubation.

RESULTATS

RESULTATS

ARTICLE : *Neutrophil-derived extracellular vesicles induce endothelial damage through the transfer of microRNAs in ANCA-associated vasculitis*

Neutrophil-derived extracellular vesicles induce endothelial damage through the transfer of microRNAs in ANCA-associated vasculitis

Alexandre Glémain¹, Mélanie Néel¹, Antoine Néel^{1,2}, Gwennan André-Grégoire^{3,4}, Julie Gavard^{3,4}, Bernard Martinet¹, Rozenn Le Bloas¹, Kevin Riquin¹, Mohamed Hamidou^{1,2}, Fadi Fakhouri¹ and Sarah Bruneau¹

¹Université de Nantes, CHU Nantes, Inserm, Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie, UMR 1064, ITUN, F-44000 Nantes, France

²CHU Nantes, Nantes Université, Service de Médecine Interne, Nantes, France

³Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes-Angers (CRCINA), Team SOAP, Inserm, CNRS, Université de Nantes, Université d'Angers, France

⁴Institut de Cancérologie de l'Ouest (ICO), René Gauducheau, Saint-Herblain, France

Correspondence should be addressed to: Sarah Bruneau, Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie (CRTI), Inserm UMR1064, 30 boulevard Jean Monnet, 44093 Nantes cedex 01, France. Phone: +33 (0)2 40 08 46 89 ; Fax: +33 (0)2 40 08 74 11 ; e-mail: sarah.bruneau@univ-nantes.fr

Running Head: Neutrophil-derived miRNAs in ANCA vasculitis

Abstract

Activation of neutrophils by ANCA (Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies) and subsequent microvascular endothelial cell (EC) damage, especially in the kidney, is the main feature of ANCA-associated vasculitis. Here, we demonstrate that upon ANCA activation, neutrophils release extracellular vesicles (EVs) that are internalized by microvascular endothelial cells, thus leading to the transfer of miR-223, miR-142-3p and miR-451. We show that the induced expression of miR-142-3p and miR-451 in ECs results in a dramatic increase in cell apoptosis, impaired angiogenic repair, and increased the secretion of IL-6, IL-8, CXCL10 and CXCL11. The deleterious effect of miR-142-3p may be due in part to its ability to block the activation of ERK1/2 and eNOS and the expression of proangiogenic genes (RAC1, ROCK2 and CLIC4). Importantly, miR-223, miR-142-3p and miR-451 are markedly increased in kidney biopsies from patients with ANCA-associated vasculitis. Taken together, our results suggest that miR-142-3p and miR-451 released by activated neutrophils can target ECs to trigger an inflammatory cascade and induce direct vascular damage, and that therapeutic strategies based on the inhibition of these miRNAs in ECs may have implications for ANCA-associated vasculitis and other neutrophil-mediated inflammatory diseases.

Keywords: ANCA-associated vasculitis, neutrophils, endothelial cells, extracellular vesicles, micro-RNAs

Translational statement: This study demonstrates that upon ANCA activation, neutrophils release extracellular vesicles loaded with miR-223, miR-142-3p and miR-451, which are subsequently taken up by microvascular endothelial cells. The induced expression of miR-142-3p and -451 in endothelial cells has dramatic consequences, characterized by a strong induction of cell apoptosis, the blockade of angiogenic repair responses and the induction of

inflammatory responses. Therefore, we suggest that therapeutic targeting of these two miRNAs in endothelial cells will have promising implications for ANCA-associated vasculitis, but also other neutrophil-mediated inflammatory diseases.

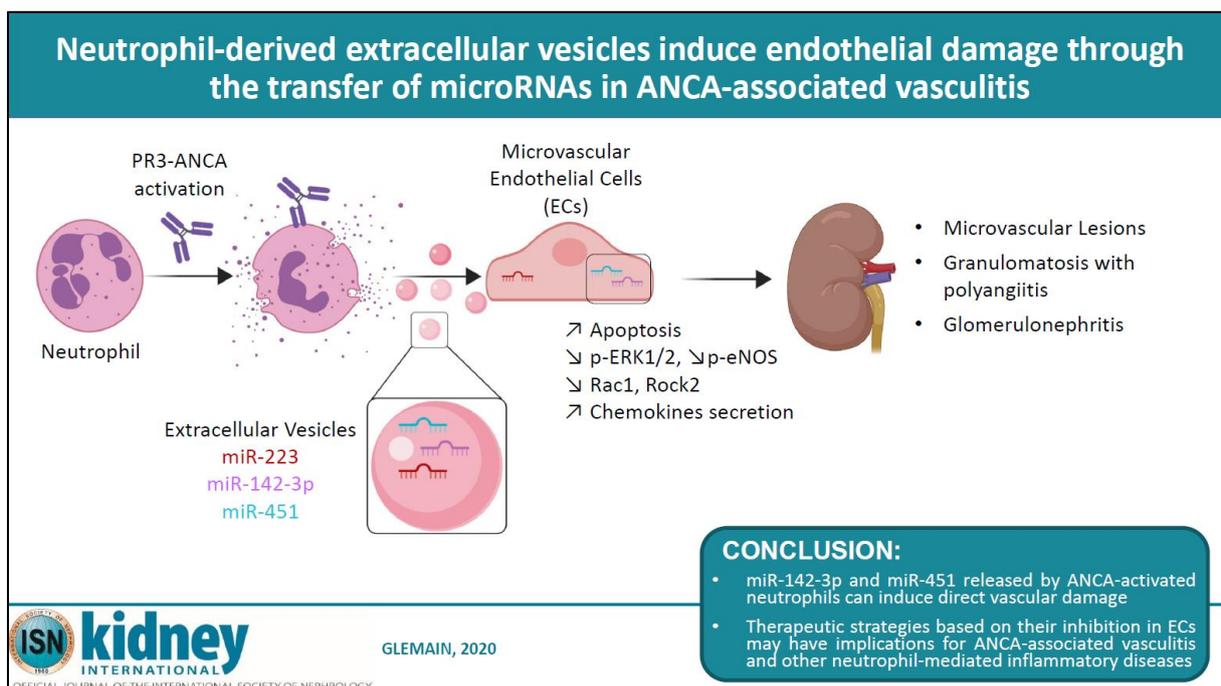


Figure 0 – Visual Abstract

Activation of neutrophils by ANCA (Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies) and subsequent microvascular endothelial cell (EC) damage, especially in the kidney, is the main feature of ANCA-associated vasculitis. Here, we demonstrate that upon ANCA activation, neutrophils release extracellular vesicles (EVs) that are internalized by microvascular endothelial cells, thus leading to the transfer of miR-223, miR-142-3p and miR-451. We show that the induced expression of miR-142-3p and miR-451 in ECs results in a dramatic increase in cell apoptosis, impaired angiogenic repair, and increased the secretion of IL-6, IL-8, CXCL10 and CXCL11. The deleterious effect of miR-142-3p may be due in part to its ability to block the activation of ERK1/2 and eNOS and the expression of proangiogenic genes (RAC1, ROCK2 and CLIC4). Importantly, miR-223, miR-142-3p and miR-451 are markedly increased in kidney biopsies from patients with ANCA-associated vasculitis. Taken together, our results suggest that miR-142-3p and miR-451 released by activated neutrophils can target ECs to trigger an inflammatory cascade and induce direct vascular damage, and that therapeutic strategies based on the inhibition of these miRNAs in ECs may have implications for ANCA-associated vasculitis and other neutrophil-mediated inflammatory diseases.

Introduction

ANCA (Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies)-associated vasculitides (AAV) are severe autoimmune diseases characterized by microvascular endothelial cell (EC) damage, in particular in the kidney, resulting from ANCA-mediated neutrophil activation. Despite strong immunosuppressive therapy, 25% of patients evolve towards end-stage renal disease. Therefore, the identification of new therapeutic targets constitutes a major clinical challenge to improve the overall bad renal prognosis of these patients.

Extracellular vesicles (EVs) are small membrane vesicles secreted by cells into surrounding biofluids that actively participate in intercellular crosstalks through the delivery to distant recipient cells of a wide range of bioactive material such as lipids, proteins, and nucleic acids, notably micro-RNAs (miRNAs) 1. Over the past, the transfer of miRNAs through EV release and uptake has emerged as a privileged mechanism of intercellular communication between various cell types, involved not only in physiological processes such as cell adhesion, migration and differentiation 2,3, but also in a large variety of pathological processes such as cardiovascular diseases or cancer 4,5. Endothelial cells (ECs) are particularly susceptible to be targeted by miRNAs released by other cell types as they are directly and continuously exposed to circulating EVs. This process has been particularly studied in cancer, where compelling evidence demonstrates that tumor cells release EVs that deliver specific miRNAs to ECs, promoting in turn tumor-associated angiogenic responses 6-9. Like many other immune cells, neutrophils release EVs with immunoregulatory functions 10. Interestingly, circulating levels of neutrophil-derived EVs are markedly increased in association with several inflammatory conditions, notably ANCA-associated vasculitis (AAV) 11. In vitro activation of neutrophils with ANCA has been found to stimulate the release of EVs that further induce ICAM-1, IL-6 and IL-

8 expression in ECs, and the release of reactive oxygen species (ROS) 12. However, the mechanisms by which these EVs can damage ECs, and the pathophysiological role of the miRNAs they may contain are still unknown.

Here, we demonstrate that EVs released by neutrophils upon ANCA stimulation, but also other inflammatory stimuli, carry three miRNAs that are subsequently taken up by ECs, namely miR-223, miR-142-3p and miR-451. We show that, while miR-223 has little effect on EC responses, the induced expression of miR-142-3p and miR-451 in ECs results in profound EC damage, characterized by increased cell apoptosis and impaired repair responses. Importantly, these three miRNAs are increased in kidney biopsies from patients with AAV. Collectively, our data define a new mechanism whereby neutrophils induce EC damage during inflammation through the release of miRNA-loaded EVs, and suggest that therapeutic strategies targeting miR-142-3p and miR-451 in ECs may have implications for the treatment of AAV and other neutrophil-mediated inflammatory diseases.

RESULTS

Activated neutrophils release EVs that transfer miR-223, miR-142-3p and miR-451 to microvascular endothelial cells.

To study whether activated neutrophils release miRNA-loaded EVs that can damage the endothelium in ANCA-associated vasculitis (AAV), freshly isolated neutrophils from healthy donors were primed with TNF α (2 ng/mL) for 15 minutes, and further activated with anti-PR3 ANCA (clone CLB12.8) (5 μ g/mL) for 4 hours. EVs released in the culture supernatant were collected using the Exoquick reagent (System Biosciences) and analyzed using tunable resistive pulse sensing (TRPS, qNano, IZON). As illustrated in **Figure 1A-B**, and consistent with previous reports^{11,12} we found that activation of neutrophils with ANCA stimulated the release of EVs. Most of the EVs released upon neutrophil activation were small particles of a mean diameter below 100 nm (**Figure 1C**).

To determine whether EVs could be taken up by ECs, EVs were stained with the fluorescent lipophilic dye Vybrant DiD and co-incubated with primary cultures of human microvascular dermal endothelial cells (HDMEC). Confocal microscopy and flow cytometry analyzes showed that neutrophil-derived EVs were internalized very efficiently by 100% of HDMEC within 24 hours (**Figure 1D-E**).

To determine if the uptake of neutrophil-derived EVs by HDMEC resulted in the transfer of miRNAs carried by these EVs, we analyzed the miRNA expression profiles in HDMEC before and after 24 hours of co-incubation with these EVs, using TaqMan Low Density Arrays (TLDA, ThermoFisher Scientific) (**Supplementary Table 1**). We thus identified twelve miRNAs that were significantly upregulated in HDMEC after co-incubation with neutrophil-derived EVs, three of which were confirmed to be increased after a validation step by qPCR in five

additional experiments, namely miR-223, miR-142-3p and miR-451 (**Figure 1F**). Of note, the basal expression of these three miRNAs in resting ECs was barely detectable (Ct>30). qPCR analyzes showed that only the mature forms of these miRNAs were upregulated following co-incubation with EVs, while their precursors (primary miRNAs or “pri-miRNAs”) remained unchanged, which strongly supports a direct transfer of these miRNAs into ECs via EVs rather than an upregulation of their biosynthesis pathways. Consistent with this observation, we found that EVs released by PR3 ANCA-activated neutrophils were loaded with miR-223, miR-142-3p and miR-451 (**Supplementary Figure 1**). Neutrophil-derived EVs were also able to transfer these three miRNAs to human microvascular pulmonary ECs (HPMEC) and to human aortic ECs (**Supplementary Figure 2**). Importantly, activation of neutrophils with IgG purified from the plasma of two patients with active anti-PR3 AAV caused an EV release that induced the most important miR-223, miR-142-3p and miR-451 transfer to HDMEC upon co-incubation, but this phenomenon was also observed after activation of neutrophils with other inflammatory stimuli, i.e. fMLP, PMA and LPS (**Figure 1H**). Besides, stimulation of TNF α -primed neutrophils with a control IgG also resulted in the transfer of miR-223, -142-3p and -451 to ECs through the release of EVs, although in a lesser extent than PR3-ANCA stimulation, suggesting that the activation of neutrophils through Fc γ R stimulation can also induce this release of miRNA-loaded EVs (**Supplementary Figure 3**). To investigate the clinical relevance of this data, neutrophils isolated from four relapsing PR3+ AAV patients were cultured for 4 hours at 37°C without additional stimulation, considering that they had already been activated *in vivo*. Secreted EVs from these cells were able to transfer miR-223, miR-142-3p and miR-451 (**Figure 1I**). This suggests that the release of these three miRNAs by neutrophils and their subsequent uptake by ECs is a shared process between various inflammatory conditions.

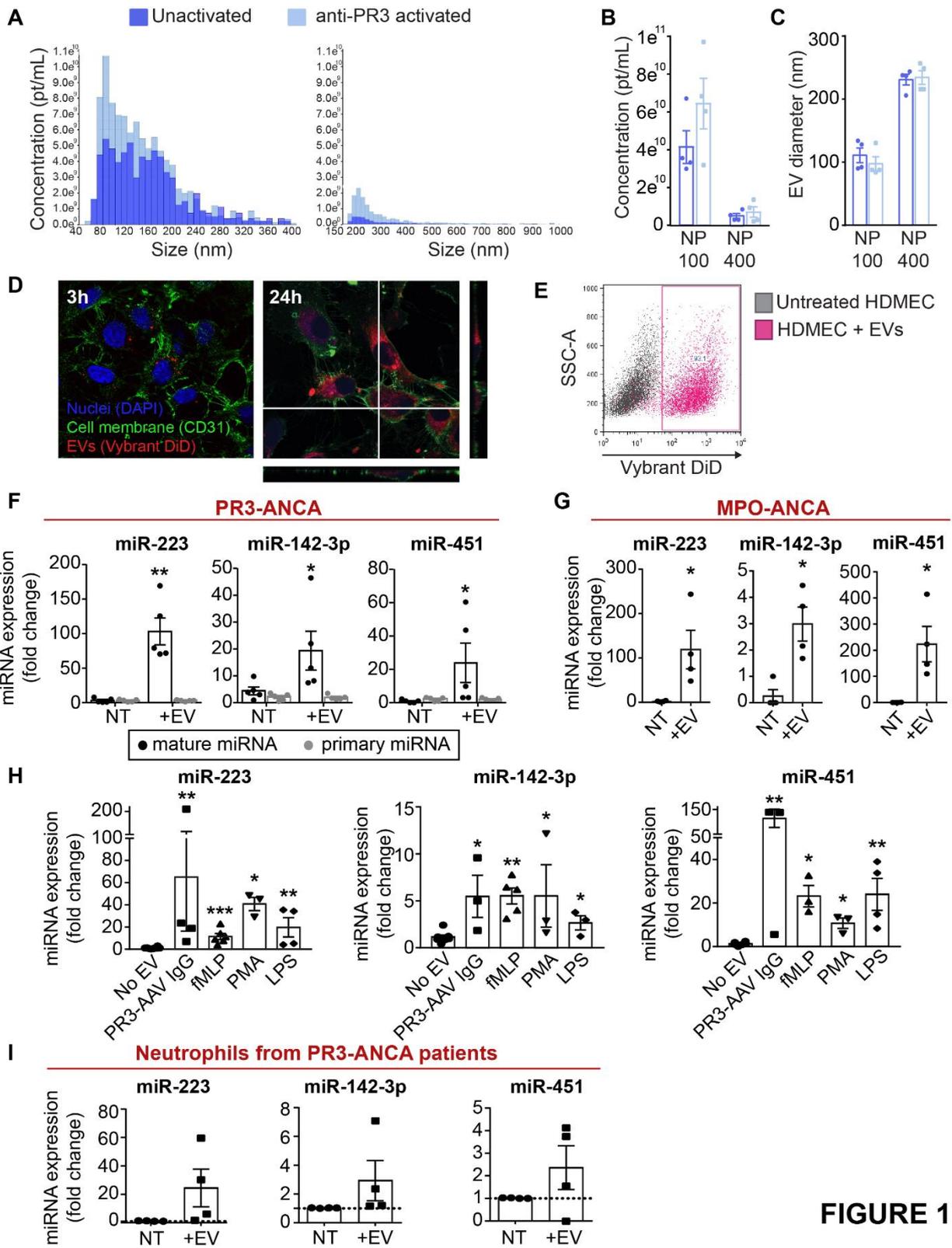


FIGURE 1

Figure 1. Neutrophil activation induces the release of extracellular vesicles that ensure the transfer of miR-223, miR-142-3p and miR-451 to microvascular endothelial cells.

Neutrophils from healthy volunteers were primed for 15 min with 2 ng/mL of TNF α , and subsequently activated with 5 μ g/mL of mouse monoclonal anti-PR3 IgG1 (clone CLB12.8) for 4 hours. EVs released in the culture medium were isolated using the Exoquick™ Reagent. (A) EVs released by anti-PR3-activated neutrophils and unactivated neutrophils were analyzed by tunable resistive pulse sensing (TRPS, qNano, IZON). Representative diagrams of size distribution obtained with the NP100 (left) and NP400 nanopores (right) are shown (from n=4 experiments). pt = particle. (B-C) Mean concentration and size diameter of neutrophil-derived EVs (\pm SEM) from 4 independent experiments. (D) EVs released by anti-PR3 activated neutrophils were stained with the lipophilic red fluorescent dye Vybrant® DiD and co-incubated for 3 hrs and 24 hrs with HDMEC. The cell membrane of HDMEC is visualized with a CD31 staining (in green), and their nuclei with DAPI (in blue). EV uptake by HDMEC was visualized by confocal microscopy on a Nikon Eclipse T1 microscope and the Nikon NIS-Elements software (X60 magnification). Representative images from n=3 experiments are shown. An orthogonal view is illustrated at 24 hrs and shows that EV are localized inside the cytoplasm of HDMEC, under the plasma membrane. (E) Representative dot plot from n=3 flow cytometry analyzes of HDMEC co-incubated for 24 hrs with labelled EV, showing that most of the cells (here 93.1%) have taken up neutrophil-derived EVs. (F) qPCR analyzes of the expression of miR-223, miR-142-3p and miR-451 in HDMEC co-incubated for 24 hrs with EVs released by anti-PR3 activated neutrophils (+EV) vs. resting HDMEC (NT). The scatter plots represent each individual value and the mean fold change (\pm SEM) in the expression of the mature (black dots) and primary forms (grey dots) of these miRNAs, from five independent experiments. (G-H) qPCR analyzes of the expression of miR-223, miR-142-3p and miR-451 in HDMEC co-incubated for 24 hrs with EVs released by neutrophils from healthy volunteers upon their activation with (G) 5 μ g/mL of anti-MPO monoclonal antibodies, (H) 200 μ g/mL of IgG purified from the plasma of patients with anti-PR3 ANCA (AAV-IgG), 1 μ M fMLP, 20 nM PMA, or 100 ng/mL LPS, and (I) EVs released by neutrophils from PR3-AAV patients over 4 hrs of cell culture. The scatter plots represent individual values and the mean fold change (\pm SEM) in miRNA expression vs. untreated HDMEC (No EV) from n \geq 3 independent experiments. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

miR-142-3p and miR-451 induce EC apoptosis and impair endothelial repair responses

We next dissected the consequences of an overexpression of miR-223, miR-142-3p and miR-451 in ECs, by transfecting HDMEC with synthetic analogues of these miRNAs (“miRNA mimics”) (Supplementary Figure 4) vs. a negative control mimic, in the presence or the absence of TNF α , in order to reproduce a pro-inflammatory microenvironment. Phenotypically, HDMEC exhibited severe cellular damages following miR-142-3p transfection, and an elongated profile characteristic of activated ECs after miR-451 transfection (Supplementary Figure 5).

Analysis of HDMEC apoptosis by flow cytometry using Annexin V staining showed a significant pro-apoptotic effect of miR-142-3p, which was most dramatic in the presence of TNF α ($P<0.001$) (**Figure 2A**). No overt impact on proliferation was however noted (**Figure 2B**). miR-451 overexpression also increased HDMEC apoptosis at steady state ($P<0.001$), but had little additional effect in the presence of TNF α . On the other hand, miR-451 overexpression had a moderate anti-proliferative effect in HDMEC ($P<0.05$), as assessed by BrdU incorporation assay (**Figure 2B**). To determine whether these miRNAs might interfere with EC repair and angiogenic responses, we performed *in vitro* wound-healing and tube formation assays. As illustrated in **Figure 2C**, we found that miR-142-3p completely abolished EC wound healing ($P<0.001$), which mirrors its marked pro-apoptotic effect. In contrast, miR-223 overexpression accelerated HDMEC wound healing ($P<0.001$), suggesting a protective effect. Besides, miR-142-3p (and miR-451, in a lesser extent) dramatically decreased HDMEC angiogenic responses *in vitro* in tube formation assays ($P<0.05$) (**Figure 2D**), which again probably resulted in part from its strong effect on EC apoptosis.

FIGURE 2

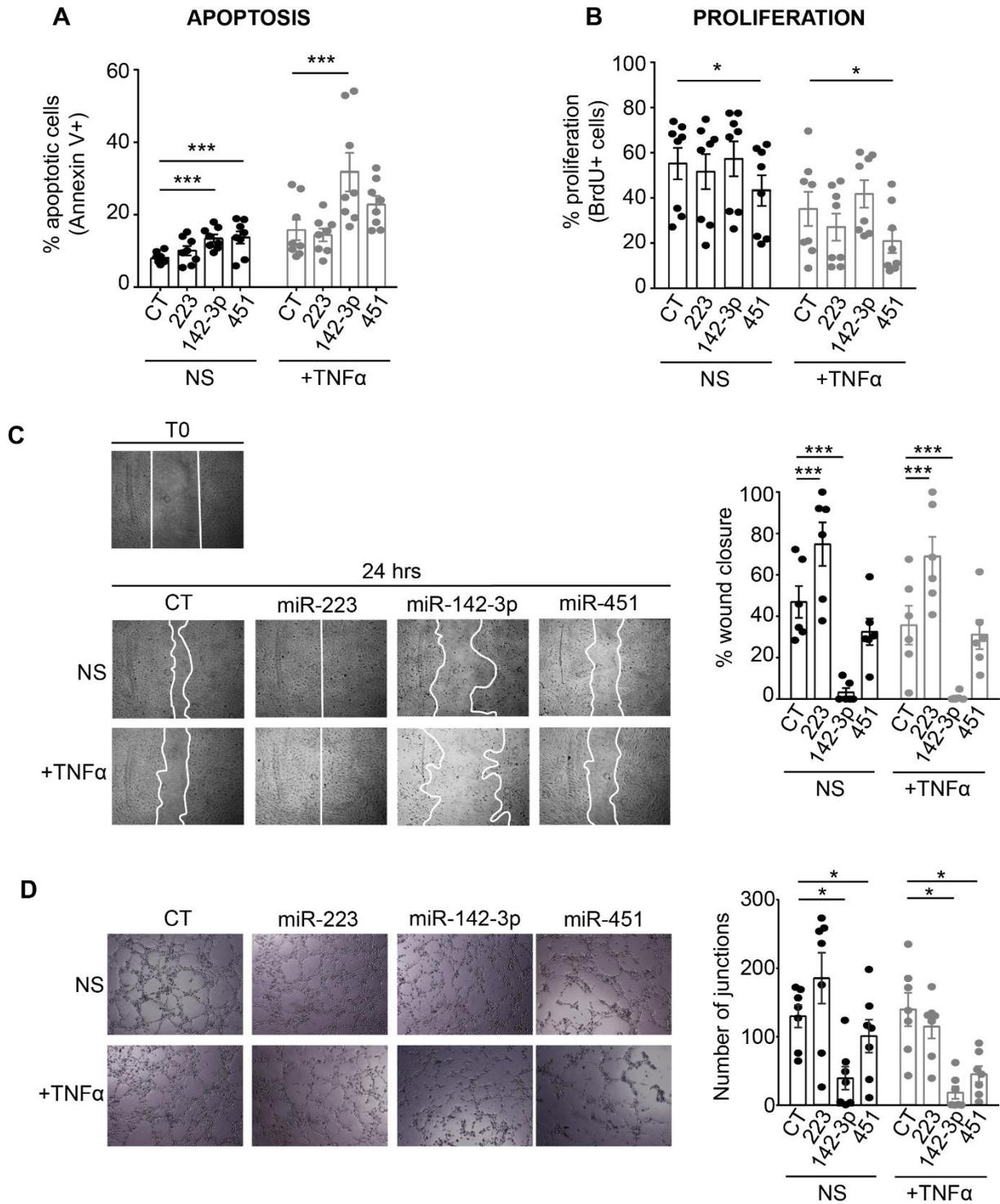


Figure 2. miR-142-3p and miR-451 induce profound microvascular endothelial cell damage.

HDMEC were transfected with 10 nM of mimics of miR-223, miR-142-3p, miR-451 or a negative control mimic, and TNF α (100 U/mL) was added to the culture medium 24 hours after transfection. Cell responses were evaluated at 48 hours after transfection: **(A)** HDMEC apoptosis was analyzed by flow cytometry using Annexin V stainings. The scatter plot represents the percentages (and mean \pm SEM) of apoptotic cells (Annexin V+) from 8 independent experiments. **(B)** HDMEC proliferation was assessed by analyzing by flow cytometry the percentage of cells that incorporated BrdU during the last 24 hours of cell culture. The scatter plot represents the percentages of proliferative cells (BrdU+) from 8 independent experiments (with mean \pm SEM). **(C)** A linear "scratch" was created in HDMEC monolayers 48 hours after mimic transfection, and the migration of cells into this wound was measured after 24 additional hours of cell culture. Representative photomicrographs (10X magnification) of wounds at 0 hr and after 24 hrs are shown, the white lines highlighting the wound for each group of cells. The scatter plot shows the percentages of wound closure from 6 independent experiments (with mean \pm SEM). **(D)** HDMEC were seeded on top of a Matrigel matrix and cultured for an additional 6 hours to allow the formation of tube-like structures. A representative photomicrograph of each condition is shown (40X), and the scatter plot shows quantitative analysis of the mean number of junctions between tubes per field (four fields per condition) (\pm SEM), from 7 independent experiments. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

miR-142-3p inhibits critical genes and signaling pathways in EC

To identify intracellular signaling pathways that could be impacted by miR-223, miR-142-3p and miR-451 overexpression in EC, we performed a phospho-kinase array in order to profile the relative levels of phosphorylation of multiple kinases and some of their protein substrates in HDMEC transfected with a mix of miR-223, miR-142-3p and miR-451 mimics, in comparison with control mimic-transfected cells. As illustrated in **Supplementary Figure 6**, this array highlighted a marked inhibitory effect of these miRNAs on several signaling pathways, notably eNOS- and p44/42-MAPK (ERK1/2)-mediated signals. Additional Western blot analyzes showed that miR-142-3p strongly inhibited the induction of eNOS and ERK1/2 phosphorylation/activation upon TNF α exposure (**Figure 3A**), which may explain in part its potent deleterious effect on EC apoptosis and repair responses, especially in the presence of TNF α . In contrast, miR-223 and miR-451 had little effect on the regulation of these pathways (data not shown). Given the strong inhibitory effect of miR-142-3p on EC angiogenic repair

responses, we performed in silico analysis of its predicted and/or experimentally determined direct target genes using the DianaTools and Targetscan databases (<http://snf-515788.vm.okeanos.grnet.gr/> and http://www.targetscan.org/vert_72/). Genes related to cell proliferation, migration and motility, were further selected for qPCR analysis. As illustrated in **Figure 3B**, we found that miR-142-3p markedly downregulated the expression of three genes critical for EC migration and angiogenic responses¹³⁻¹⁵, RAC1, ROCK2 and CLIC4 ($P<0.05$), in the presence or the absence of TNF α . Thus, beyond its potent deleterious effect on EC viability, miR-142-3p may additionally interfere with vascular repair responses through the blockade of EC migration.

FIGURE 3

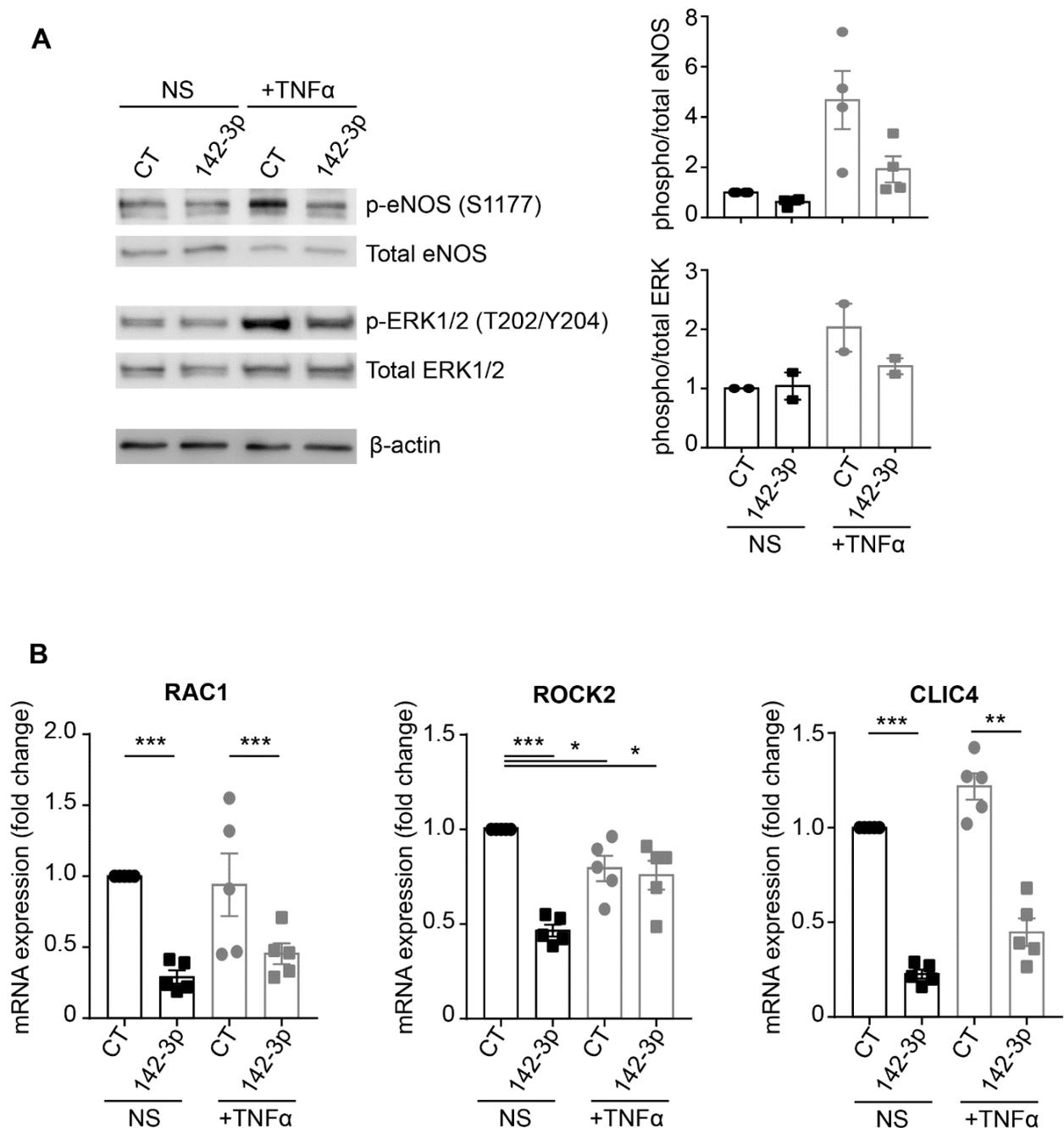


Figure 3. miR-142-3p inhibits critical genes and pathways in microvascular endothelial cells.

HDMEC were transfected with 10 nM of a miR-142-3p mimic or a negative control mimic, 100 U/mL of TNF α was added to the culture medium 24 hours after transfection, and analyzes were performed after an additional 24 hours of cell culture. (A) The expression of phospho-eNOS (S1177), total eNOS, phospho-ERK1/2 (T202/Y204), total ERK1/2 and β -actin was analyzed by Western blot. Representative results of ≥ 2 independent experiments are shown. Scatter plots represent the quantification of protein bands by densitometry, expressed as the ratio of phosphorylated eNOS / total eNOS (top graph) and of phosphorylated ERK1/2 / total ERK1/2 (lower graph) (with mean \pm SEM). (B) The mRNA expression of RAC1, ROCK2 and CLIC4 were analyzed by qPCR. Scatter plots show the fold changes in mRNA expression (with mean \pm SEM) from 5 independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

miR-142-3p and miR-451 induce the expression of pro-inflammatory chemokines and cytokines by EC that may participate in EV-induced inflammation.

To identify other key genes regulated by miR-223, miR-142-3p and miR-451 in EC, we performed qPCR analysis on HDMEC transfected with each individual miRNA mimic or a negative control mimic, using custom qPCR-based arrays. Of a total of 92 genes related to EC biological responses examined in this array (**Supplementary Table 2**), we found 4 genes encoding for pro-inflammatory cytokines and chemokines that were markedly upregulated in HDMEC upon miR-142-3p and/or miR-451 overexpression. miR-142-3p overexpression induced the expression of IL-6, CXCL10 and CXCL11 ($P<0.05$), while miR-451 overexpression enhanced IL-8, CXCL10 and CXCL11 mRNA expression ($P<0.05$) (**Figure 4A**). These molecules were also increased in the culture medium of mimic-transfected HDMEC as assessed by ELISA (**Supplementary Figure 7**) although in a lesser extent, which we attributed to result from the important cell death induced by miR-142-3p and -451 overexpression. This suggests that miR-142-3p and miR-451 overexpression in EC might participate in the induction of an inflammatory response of these cells.

Hence, we tested whether EV released by PR3 ANCA-activated neutrophils were able to induce the secretion of these cytokines and chemokines by EC. Indeed, we found that EV produced by neutrophils upon stimulation with IgG isolated from PR3-AAV patients significantly induced the secretion of IL-6 ($P<0.01$), IL-8 ($P<0.5$), CXCL10 ($P<0.001$), and CXCL11 ($P<0.01$), as compared to EV from non-stimulated (NS) neutrophils (**Figure 4B**).

To assess whether this proinflammatory effect of EVs resulted from the transfer of miR-142-3p and miR-451, as suggested by the series of miRNA mimic overexpression assays, HDMEC were transfected with specific miRNA inhibitors, or “AntagomiR” before coincubation

with activated neutrophil-derived EVs. 48 hours later, levels of IL-6, IL-8, CXCL10 and CXCL11 released in the culture supernatant were measured by ELISA (**Figure 4C**). Although EVs induced the release of these molecules ($P<0.5$, $n=5$) as described above, miR-142-3p and miR-451 inhibitors failed to diminish this secretion, while they efficiently prevented the induction of IL-6, IL-8, CXCL10 and CXCL11 mRNA expression upon miR-142-3p and -451 mimic transfection (**Supplementary Figure 8**). This suggests that the transfer of these miRNAs is not solely responsible for the induction of endothelial inflammation by EVs, which might exert other proinflammatory actions on EC.

FIGURE 4

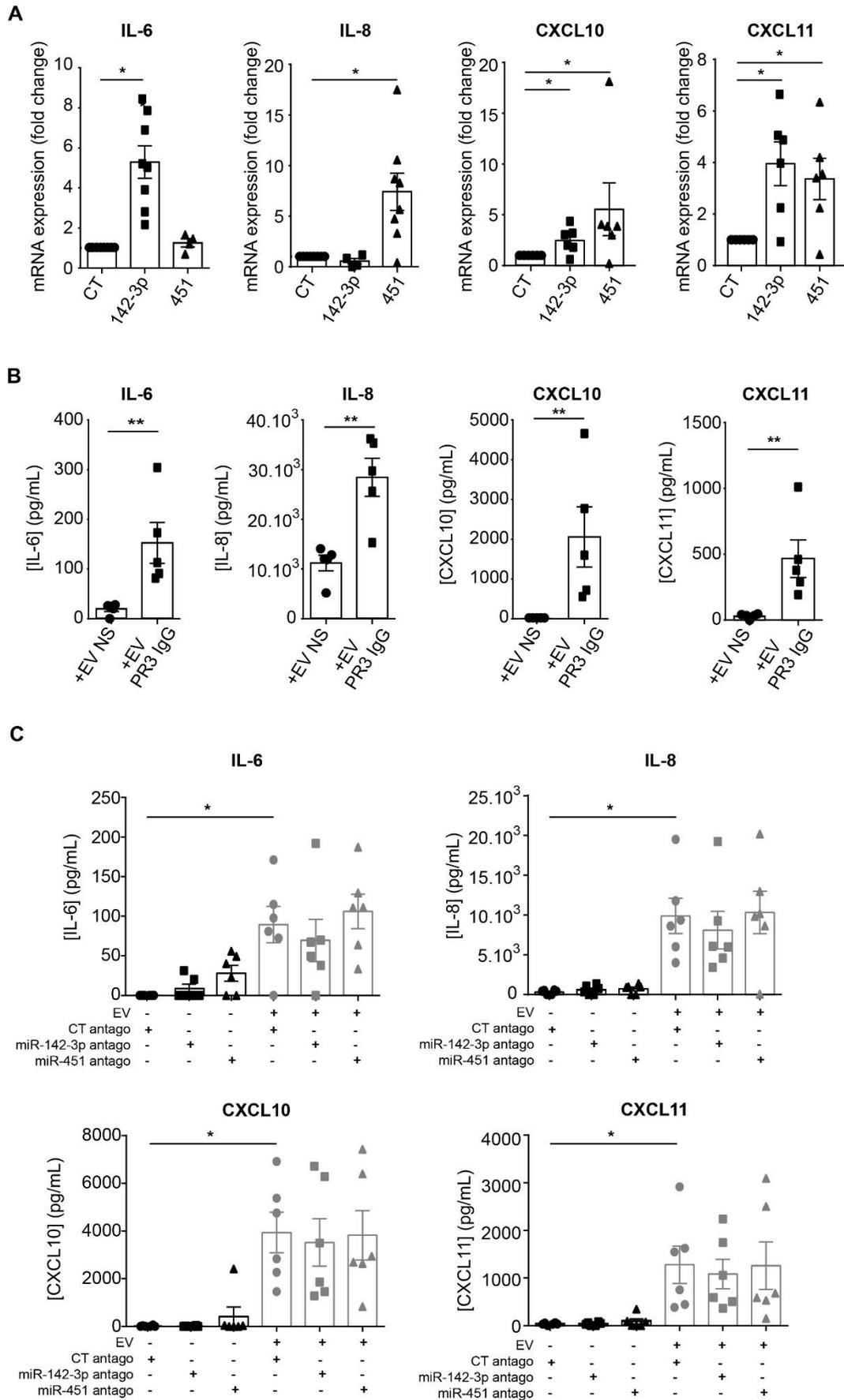


Figure 4. miR-142-3p and miR-451 induce the expression of pro-inflammatory cytokines and chemokines by microvascular endothelial cells but are not the sole players of EV-induced inflammation.

(A) HDMEC were transfected with 10 nM of mimics of miR-142-3p and miR-451, or a negative control mimic (CT). The mRNA expression of IL-6, IL-8, CXCL10 and CXCL11 was analyzed by qPCR forty-eight hours after transfection. Scatter plots show the fold changes in mRNA expression (with mean \pm SEM), from ≥ 6 independent experiments.

(B) IL-6, IL-8, CXCL10 and CXCL11 protein expressions were analyzed by ELISA in the culture supernatant of HDMEC after 48 hrs of co-incubation with EVs released by neutrophils activated with IgG from patients with PR3-AAV (EV-PR3 IgG) or by resting neutrophils (EV NS). Scatter plots represent the concentrations (pg/mL) of each molecule (with mean \pm SEM) from 5 independent experiments. (C) HDMEC were transfected with 20 nM of specific miR-142-3p and miR-451 inhibitors (antagomiR), or a negative control antagomiR, and EVs released by PR3 ANCA-activated neutrophils were added to the culture medium 24 hours later. After an additional 24 hrs of culture, IL-6, IL-8, CXCL10 and CXCL11 release was quantified in the culture supernatant by ELISA. The scatter plots represent the concentrations (pg/mL) of each molecule (with mean \pm SEM) from 6 independent experiments.

**P<0.05, **P<0.01.*

Neutrophil-derived EVs induce EC apoptosis in a miR-142-3p-dependent manner

Because we found that miR-142-3p and miR-451 robustly trigger EC apoptosis, while miR-223 seems to have little effect on EC responses, and was even protective in wound healing assays, we next analyzed the global effect on ECs of all miRNAs transferred by neutrophil-derived EVs. To this aim, we analyzed HDMEC apoptosis upon co-incubation with EVs released by PR3 ANCA-activated neutrophils in vitro. As illustrated in Figure 5A, EVs released by neutrophils upon PR3 ANCA-activation induced a strong increase in HDMEC apoptosis in the presence of TNF α ($P < 0.01$), while EVs released by resting neutrophils had no clear effect. On the other hand, EVs from activated neutrophils were unable to induce significant EC apoptosis in the absence of TNF α , suggesting that this process is dependent on the presence of an inflammatory stimuli. To evaluate whether the pro-apoptotic effect of EVs resulted from the transfer of miR-142-3p and/or miR-451, specific inhibitors of these two miRNAs (“Antagomirs”) were transfected in TNF α -primed HDMEC prior to their co-incubation with neutrophil-derived EVs. As shown in Figure 5 and Supplementary Figure 9, miR-142-3p inhibition markedly reduced the induction of EC apoptosis by neutrophil-derived EVs, while miR-451 inhibition had no significant impact on EV pro-apoptotic effect, either with EV released by neutrophils activated with IgG from PR3-AAV patients (Figure 5B) or with monoclonal anti-PR3 antibodies (Figure 5C). In both cases, the EV-dependent induction of apoptosis in HDMEC transfected with a miR-142-3p inhibitor was significantly lower than with a control antagomiR, implying that miR-142-3p plays a significant role in the induction of apoptosis by neutrophil EVs.

FIGURE 5

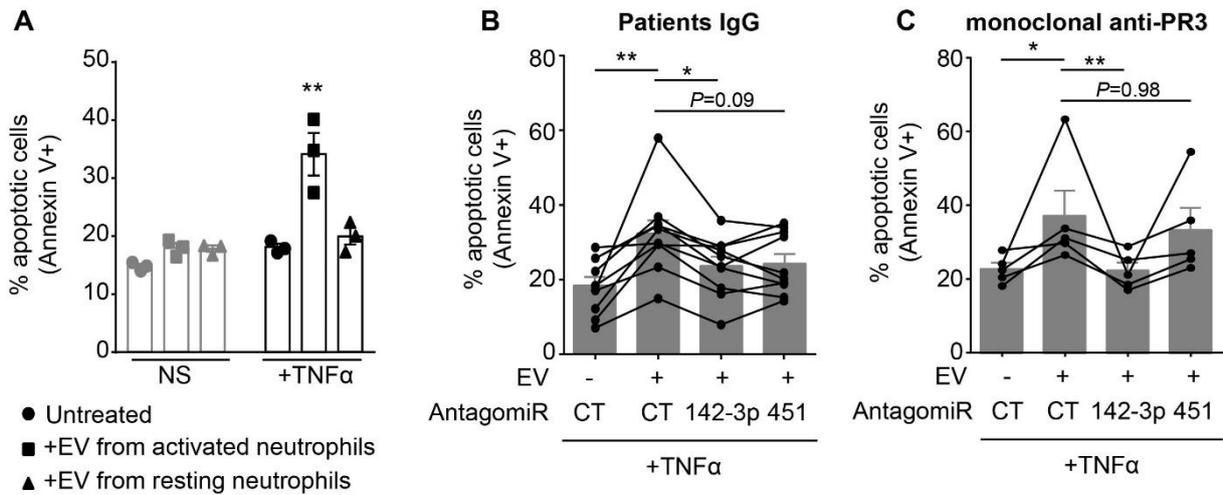


Figure 5. Extracellular vesicles released by ANCA-activated neutrophils induce microvascular EC apoptosis in the presence of TNF α through miR-142-3p-dependent mechanisms.

(A) Neutrophils from healthy volunteers were primed with 2 ng/mL of TNF α for 15 minutes, and further activated with 5 μ g/mL of murine monoclonal anti-PR3 IgG1 (clone PR3-G2). EVs released in the culture supernatant of these activated neutrophils or from neutrophils cultured for four hours without stimulation (“resting neutrophils”, NS) were isolated using the ExoquickTM reagent. HDMEC were co-incubated for 72 hours with these EVs, in the presence or absence of 100 U/mL TNF α , and apoptosis was assessed by flow cytometry using Annexin V staining. The scatter plot shows the percentages of apoptotic HDMEC (Annexin V+) for each condition from 3 independent experiments (with mean \pm SEM).

(B-C) HDMEC were transfected with 20 nM of specific miR-142-3p and miR-451 inhibitors (antagomiR), or a negative control antagomiR and 24 hrs later, EVs released by neutrophils activated with IgG purified from PR3-AAV patients (B) or with murine monoclonal anti-PR3 IgG1 (clone PR3-G2) (C) were added to the culture medium. HDMEC apoptosis was evaluated after additional 48 hrs of culture. The scatter plots represent the percentages of apoptotic HDMEC (Annexin V+) for each condition (with mean \pm SEM) from respectively n=8 and n=5 independent experiments. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

miR-223, miR-142-3p and miR-451 are increased in kidney biopsies from patients with AAV

Finally, we analyzed the levels of expression of miR-223, miR-142-3p and miR-451 in kidney biopsies from eight patients with ANCA-associated vasculitis (**Table 1**), as compared to patients with non-proliferative glomerulonephritides (minimal change disease (n=4) and membranous nephropathy (n=1)) and to patients with other proliferative glomerulonephritides (lupus nephritis (n=5), IgA nephropathy (n=3) and membranoproliferative glomerulonephritis (n=1)) (**Table 2**). As illustrated in **Figure 6**, we found that miR-223, -142-3p and -451 were increased in AAV kidney biopsies, although their expression was not correlated with the type of ANCA involved, nor with other clinico-biological parameters. In addition, while these three miRNAs tended to be expressed at higher levels in AAV kidney biopsies as compared to proliferative glomerulonephritis control diseases, this was not statistically significant. Altogether, these results seem to be consistent with an overexpression of miR-223, -142-3p and -451 in inflammatory microvascular lesions, that seems particularly important in the AAV context.

Age (yrs)	Sex	ANCA subtype	Diagnosis	Context	BVAS	ANCA titer (AULN)	Hematuria	Proteinuria (uPCR, g/g)	CRP (mg/L)	eGFR (ml/min/1.73m ²)	% abnormal glomeruli	Extrarenal involvement						miRNA expression (fold change)		
												ENT	Lung	Skin	Nerve	A/M	Const.	miR-223	miR-142-3p	miR-451
18	F	MPO	MPA	Newly diagnosed, untreated	12	1.1	++	0.95	50	63	50	0	0	1	0	0	0	1.80	3.22	14.29
75	F	MPO	MPA	1st relapse, off therapy	30	26.8	+++	3.4	140	16	34	0	DAH	1	1	0	5.77	6.39	1.54	
66	F	PR3	GPA	Newly diagnosed, untreated	25	25	+++	0.55	126	36	33	1	Nod	0	0	1	2.83	2.20	4.46	
78	F	MPO	MPA	Newly diagnosed, untreated	12	5.6	+++	0.99	42	11	76	0	0	0	0	0	2.26	2.64	0.55	
67	M	PR3	GPA	Newly diagnosed, untreated	23	31	+++	1.38	85	6	100	1	0	1	0	1	2.36	1.01	1.42	
59	M	MPO	MPA	Newly diagnosed, untreated	17	26.8	+	0.45	114	15	50	0	Nod	1	0	1	4.12	1.37	0.41	
65	M	PR3	GPA	Newly diagnosed, untreated	13	22.6	+++	0.6	60	128	24	1	DAH	1	0	0	0.64	0.29	0.20	
57	M	MPO	MPA	Newly diagnosed, untreated	26	7	++	3.6	127	7	90	1	DAH	0	0	1	0.96	0.56	0.08	

Table 1: Clinical and biological characteristics of patients with ANCA-Associated Vasculitis

*MPO: myeloperoxidase, PR3: proteinase 3, MPA: microscopic polyangiitis, GPA: granulomatosis with polyangiitis, BVAS: Birmingham Vasculitis Activity Score, uPCR: urine protein/creatinine ratio, CRP: C-reactive protein, eGFR: estimated glomerular filtration rate (CKD-EPI), ENT: ear-nose-throat, DAH: diffuse alveolar hemorrhage, Nod: nodules, A/M: arthralgia/myalgia, Const.: constitutional symptoms (fever, weight loss)

	Age	Sex	Diagnosis	Treatment	Proteinuria (uPCR, g/g)	eGFR (ml/min/1.73m ²)
Proliferative GN	48	M	SLE-GN, Class III	HCQ, Cs	5.7	117
	42	F	SLE-GN, Class IV	MTX, Cs	2.4	100
	32	F	SLE-GN, Class IV	HCQ, Cs	1.6	117
	21	F	SLE-GN, Class IV	HCQ, MTX, Cs	0.7	91
	43	F	SLE-GN, Class IV	None	3.5	60
	76	F	Cryo-MPGN	None	0.7	42
	27	F	IgA-Vas	None	1.7	104
	65	M	IgA-GN	None	0.6	29
	76	F	IgA-GN	None	2.3	18
	Non-proliferative GN	25	F	MCD	None	7.5
77		M	MCD	None	8.8	62
19		M	MCD	None	13	131
52		M	MCD	None	3	57
63		F	pMN	None	3.5	93

Table 2: Clinical and biological characteristics of control patients with proliferative and non-proliferative glomerulonephritis

* *Cryo*: cryoglobulinemia, *Cs*: corticosteroids, *eGFR*: estimated glomerular filtration rate (CKD-EPI), *GN*: glomerulonephritis, *HCQ*: hydroxychloroquine, *Vas*: vasculitis, *MCD*: minimal change disease, *MPGN*: membranoproliferative glomerulonephritis, *pMN*: primary membranous nephropathy, *MTX*: methotrexate, *SLE*: systemic lupus erythematosus, *uPCR*: urine protein/creatinine ratio.

FIGURE 6

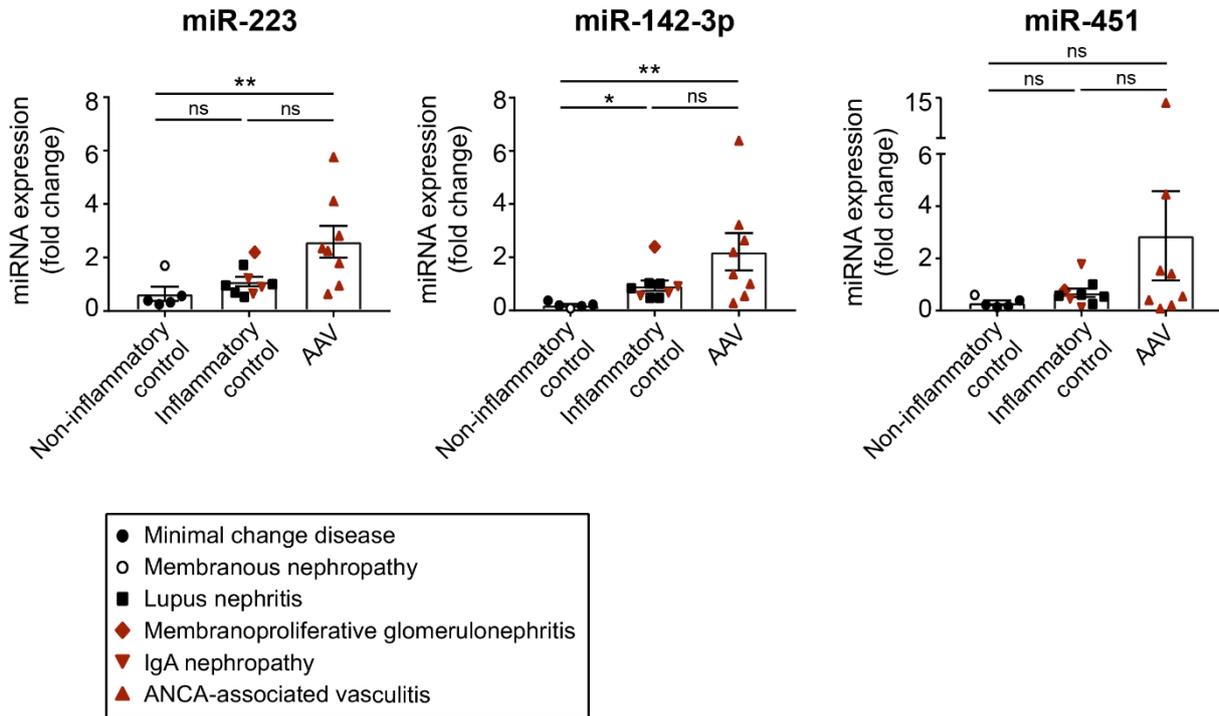


Figure 6. miR-223, miR-142-3p and miR-451 are augmented in kidney biopsies from patients with active ANCA-associated vasculitis.

*miR-223, miR-142-3p and miR-451 levels were measured by qPCR in kidney biopsies from eight patients with ANCA-associated vasculitis, five patients with a control non-inflammatory renal disease (minimal change diseases (black dots) and membranous nephropathy (empty black dot)), and nine patients with other inflammatory renal diseases (lupus nephritis (squares), membranoproliferative glomerulonephritis (diamond) and IgA nephropathy (inverted triangles)). Patients under immunosuppressive therapy are shown in red. A table compiling patients' clinical characteristics is shown in **Table 1**. The graphs illustrate the fold change in each miRNA expression (\pm SEM). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.*

DISCUSSION

Here, we describe for the first time a mechanism whereby ANCA-activated neutrophils induce endothelial damage through the release of miRNA-loaded EVs. We demonstrate that upon activation, neutrophils release EVs that are taken up by ECs, thus ensuring the transfer of miR-223, miR-142-3p and miR-451, three miRNAs that are normally expressed at very low levels in resting ECs.

While miR-223 has little effect on EC responses, we show that the induced expression of miR-142-3p and miR-451 in ECs results in profound endothelial damages, especially in pro-inflammatory conditions, characterized notably by a dramatic increase in cell apoptosis, impaired vascular repair responses, and induction of the secretion of pro-inflammatory chemokines and cytokines. We suggest that, while all ECs (micro- and macrovascular) have the ability to capture neutrophil-derived miRNAs, this process is particularly important in the pathophysiology of AAV, where neutrophils are strongly activated, release neutrophil extracellular traps (NETs) and thus get “trapped” in significant numbers in the microvasculature, resulting in a continuous local release and uptake by the endothelium of very high concentrations of EVs^{16,17}. In accordance with this model, we report that miR-223, miR-142-3p and miR-451 are high in kidney biopsies from patients with AAV, although this increase might reflect both the increased infiltration of leukocytes at the inflammatory site and the uptake of neutrophil-derived miRNA-loaded EVs by ECs..

The most striking effect of neutrophil-derived EVs in our model is the strong induction of EC apoptosis. Pro-apoptotic properties of EVs from different origins have been reported in several models, where it was shown to result from various processes, involving notably the generation of ROS¹⁸. Here, we show that the pro-apoptotic effect of neutrophil-derived EVs

is mediated mostly through the transfer of miR-142-3p to targeted ECs. While miR-142-3p overexpression was found to induce apoptosis both in unstimulated and TNF α -stimulated ECs, we found that neutrophil-derived EVs were only able to induce significant apoptosis in the presence of TNF α . We suggest that this is due to the fact that miR-142-3p overexpression was very high in our overexpression model using miRNA mimics compared to the levels of miR-142-3p transferred through EVs in our co-incubation model.

Like most miRNAs, miR-142-3p has hundreds of mRNA targets, and its effects on EC responses are probably mediated through direct and indirect regulatory effects on a variety of genes and pathways. In this study, we demonstrate that one of its major effects in ECs is the inhibition of ERK1/2 and eNOS-mediated signals, two intracellular pathways that are essential for the maintenance of endothelial homeostasis^{19,20}, and for the protection of EC from inflammation-induced apoptosis²¹. The blockade of these pathways by miR-142-3p may explain, at least in part, its strong apoptotic effect in the presence of TNF α . We also demonstrate that miR-142-3p inhibits the expression of RAC1, ROCK2 and CLIC4, three genes that are critical for EC migration and angiogenic responses¹³⁻¹⁵. This suggests that miR-142-3p abolishes vascular repair responses not only through induction of EC apoptosis, but also through the inhibition of EC migration.

Another consequence of the induced expression of miR-142-3p and miR-451 in EC is the induction of IL-6, IL-8, CXCL10 and CXCL11, three potent pro-inflammatory and leukocyte chemoattractant molecules. This suggests that the release of EVs by activated neutrophils may result in the triggering of an inflammatory cascade that will induce the recruitment at the inflammatory site of additional immune cells such as monocytes and T cells, thus resulting in the amplification and the maintenance of inflammation. However, inhibition of miR-142-3p

and -451 in ECs using specific antagomirs did not prevent the release of IL-6, IL-8, CXCL10 and CXCL11 induced by EVs from activated neutrophils. This could suggest that these miRNAs were not completely inhibited with our antagomir strategy and that remaining miRNAs were sufficient to induce the expression of these cytokines and chemokines. However, co-transfection of miR-142-3p and miR-451 mimics along with their specific antagomirs prevented the induction of IL-6, IL-8, CXCL10 and CXCL11 in HDMEC, indicating a very good efficiency of our antagomirs. This, this suggests that the transfer of miR-142-3p and -451 to ECs is not the main player in EVs proinflammatory effects and that additional mechanisms are involved. In fact, EVs are complex vessels that carry a variety of biologically active molecules such as nucleic acids, lipids and proteins and that can thus regulate a wide range of cellular responses through direct binding of cellular receptors or transfer of their various contents to the target cell. For instance, it has been shown that EVs from different origins can activate NF- κ B signaling in ECs, thus resulting in endothelial activation and the secretion of IL-6 and IL-8^{22,23}. This is therefore likely that different mechanisms contribute to EVs proinflammatory actions observed in our model.

While the induced expression of miR-142-3p and miR-451 in EC appears to have dramatic consequences for vascular integrity, miR-223 seems to have a rather protective effect in ECs. Indeed, we show that this miRNA accelerates vascular repair in wound-healing assays, and it was previously reported to inhibit the expression of tissue factor in ECs²⁴ and the induction of ICAM-1 expression upon TNF α stimulation²⁵. Since this miRNA seems to be transferred in great quantity to EC through neutrophil-derived EVs, this raises the question whether its expression might counterbalance the deleterious effects of miR-142-3p and miR-451. However, our co-incubation experiments demonstrate that neutrophil-derived EVs have an overall deleterious effect on ECs, characterized notably by a strong induction of apoptosis

in the presence of TNF α , suggesting that the transfer of miR-223 is not sufficient to protect ECs from miR-142-3p and miR-451 induced injury.

Altogether, our studies unravel a new mechanism of neutrophil-induced vascular damage through the release and uptake of miR-142-3p and miR-451 loaded extracellular vesicles. Our findings suggest that this process may be critical in the pathogenesis of a number of inflammatory diseases besides ANCA-associated vasculitis, such as systemic lupus erythematosus and sepsis, which are characterized by a strong neutrophil activation and subsequent vascular damage. Micro-RNA targeting is an innovative therapeutic strategy that has shown great promises in preclinical studies and already reached clinical development in cancer and hepatitis C ^{26,27}. Thus, the targeting of miR-142-3p and miR-451 in ECs, cells that normally express very little amounts of these two miRNAs at resting state, may have implications for the treatment of various inflammatory vascular diseases.

METHODS

Full details of antibodies, reagents and additional methods can be found in Supplemental Material.

Subjects and ethics statement

Neutrophils from healthy volunteers were isolated from blood collected at the Etablissement Français du Sang (EFS, Nantes, France) with written informed consent. Plasma and neutrophils were also collected from the blood of AAV patients who gave written informed consents, and were integrated into the NALVANCA biocollection, located in the BRC of the Nantes University Hospital, under the responsibility of Dr. Néel. Each experiment was performed using a different blood donor. Residual human biological samples were collected during the treatment of patients, with written informed consents (consent form validated by CPP Ouest IV on 07/04/2015) and the samples were integrated into the collection of human biological samples DIVAT nephro, located in the BRC of the Nantes University Hospital, under the responsibility of Dr. Giral. Plasma, neutrophils and kidney biopsy samples were integrated into the collections of human biological samples attached to the ‘Immuno-transplantation’ research program declared on 05/09/2011 under the n° DC-2011-1399 and in the following amending declarations (DC-2012-1555 ; DC-2013-1832 ; DC2014-2206 and DC-2017-1987 currently pending) at the Ministry of Research and having obtained a favorable decision from the CPP Ouest IV on 07/04/2015.

Neutrophil purification, activation, and EV isolation

Whole blood samples from healthy volunteers were separated on a Ficoll gradient, and the lower fraction containing red blood cells and granulocytes was gently mixed with one volume of 2% Dextran and left to sediment for 30 minutes. The supernatant containing neutrophils was collected, and after lysis of the remaining red blood cells, neutrophils were finally resuspended at 5×10^6 cells/mL in RPMI (Gibco, Life technologies) before performing the ANCA-mediated activation protocol. Neutrophils were primed for 15 min at 37°C with 2 ng/mL TNF α to induce PR3 externalization, and further activated for 4 hours with 5 μ g/mL of mouse monoclonal anti-PR3 ANCA (CLB12.8 or PR3G-2 clones, cf. figure legends), or with 200 μ g/mL of total IgG purified from the plasma of patients with active anti-PR3 AAV. Alternatively, neutrophils were activated for 4 hours at 37°C with 1 μ M fMLP, 20 nM PMA, or 100 ng/mL LPS. EVs released in the culture medium were collected by ultracentrifugation (see below) or using the Exoquick reagent (System Bioscience) according to the manufacturer's instructions. Their concentration and diameter were analyzed by Tunable Resistive Pulse Sensing (TRPS) using the qNano system (IZON ²⁶).

Assessment of EV uptake by HDMEC

EVs released by neutrophils upon *in vitro* ANCA-mediated activation were collected by ultracentrifugation. Briefly, the culture medium was centrifuged for 30 min at 10,000 g to pellet dead cells and larger particles, and the supernatant was further ultracentrifuged for 90 min at 100,000 g to pellet EVs. These EVs were stained with the fluorescent lipophilic dye Vybrant™DiD (ThermoFisher Scientific) for 20 min at 37°C, and added to the culture medium of HDMEC (EVs released by 25×10^6 activated neutrophils were added to a well of a 12-well

plate of confluent HDMEC) for 3 and 24 hours at 37°C. HDMEC were then washed extensively in PBS, and stained with anti-CD31 antibodies and DAPI. EV uptake was assessed by confocal microscopy on a Nikon Eclipse Ti inverted microscope and the Nikon NIS-Elements software, within the Cellular and Tissular Imaging Core Facility of Nantes University (MicroPICell). EV uptake was also evaluated by flow cytometry using a BD FACSCanto II flow cytometer and analyzed with FlowJo® 7.6.5 software (Tree Star Inc.).

Analysis of HDMEC apoptosis by flow cytometry

HDMEC apoptosis was assessed using the Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin-V-FITC and Propidium Iodide for flow cytometry (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The percentage of Annexin-V positive cells was analyzed using a BD FACSCanto II cytometer (BD Biosciences) and the FlowJo® 7.6.5 software (Tree Star Inc).

Analysis of HDMEC proliferation by BrdU incorporation assay

HDMEC proliferation was assessed by Bromo-deoxy-uridine (BrdU) incorporation assay using the APC BrdU Flow Kit (BD Biosciences) as per manufacturer's instructions. Briefly, HDMEC were transfected with miRNA mimics and 10 µM BrdU was added to the culture medium for the last 18 hrs of culture. HDMEC were then fixed, permeabilized, treated with 300 µg/mL DNase I, and stained with the APC-conjugated anti-BrdU antibody. The percentage of cells that had incorporated BrdU was analyzed by flow cytometry (BD FACSCanto II, BD Biosciences cytometer and FlowJo® 7.6.5 software).

Tube Formation Assay

To assess *in vitro* angiogenesis, HDMEC were collected 48 hours after miRNA mimic transfection and seeded on top of a 24-well plate (50,000 cells/well) coated with 250 μ L per well of matrigel basement membrane matrix (Corning®). After 6 hours of incubation at 37°C, the network of tubes formed was observed under an inverted microscope (Olympus IX71, x4) and 4 fields of view per condition were photographed (Olympus DP72 camera and CellSens Viewer acquisition software, Olympus). Pictures were analyzed using the “Angiogenesis Analyzer” macro (Gilles Carpentier) of the Fiji® software. Results are expressed as the number of junctions measured in the capillary network.

Wound-Healing Assay

HDMEC were transfected with miRNA mimics and 48 hours later, a linear wound was created in confluent cell monolayers by scratching with a pipet tip. After an additional 24-hour incubation, cell migration into the wound was assessed by microscopy (Nikon Eclipse TS100). Four images per condition (10X magnification) were taken with a Canon G11 camera and the area of the initial wound recovered by migrating cells was measured using the Fiji® software.

Statistical analysis

All data are presented as mean \pm SEM. Statistical analyzes were performed using the Mann-Whitney U test or using the non-parametric ANOVA test with the Dunn’s test for multiple comparisons except when mentioned, and *P* values < 0.05 were considered significant.

Acknowledgements

We wish to thank Philippe Hulin and Steven Nedellec from the Cellular and Tissular Imaging Core Facility of Nantes University (MicroPICell) for their expert technical assistance regarding confocal microscopy studies. This work was realized in the context of the IHU-Cesti project, which received French government financial support managed by the Agence Nationale de la Recherche via the Investments for the future program ANR-10-IBHU-005. The IHU-Cesti project is also supported by Nantes Metropole and the Pays de la Loire Region. This work was realized in the context of the LabEX IGO program supported by the Agence Nationale de la Recherche via the Investments for the future program ANR-11-LABX-0016-01. This work was supported by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-15-CE14-0023), a Young Researcher Award from the Fondation du Rein and a fellowship grant from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM ARF20140129163) to Dr. Sarah Bruneau. This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No.660773.

Authorship contributions

A.G. participated in research design, performed the studies, analyzed and interpreted the data and participated in the writing of the manuscript. M.N., G.AG, B.M., R.LB and K.R. assisted with experiments. J.G., A.N., M.H. and F.F. provided scientific and clinical expertise and edited the manuscript. F.F. and S.B. initiated the research. S.B. conceived and designed the study, assisted with experiments and analyzes of data, and wrote the manuscript.

Disclosure statement

The authors have no conflicting financial interests to disclose.

REFERENCES

1. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of cell biology*. 2013;200(4):373-83.
2. Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, et al. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney international*. 2010;78(9):838-48.
3. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*. 2007;9(6):654-9.
4. Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circ Res*. 2012;110(3):483-95.
5. Martins VR, Dias MS, Hainaut P. Tumor-cell-derived microvesicles as carriers of molecular information in cancer. *Curr Opin Oncol*. 2013;25(1):66-85.
6. Hsu YL, Hung JY, Chang WA, et al. Hypoxic lung cancer-secreted exosomal miR-23a increased angiogenesis and vascular permeability by targeting prolyl hydroxylase and tight junction protein ZO-1. *Oncogene*. 2017;36(34):4929-42.
7. Mao G, Liu Y, Fang X, et al. Tumor-derived microRNA-494 promotes angiogenesis in non-small cell lung cancer. *Angiogenesis*. 2015;18(3):373-82.
8. Umezu T, Tadokoro H, Azuma K, et al. Exosomal miR-135b shed from hypoxic multiple myeloma cells enhances angiogenesis by targeting factor-inhibiting HIF-1. *Blood*. 2014;124(25):3748-57.
9. Zhuang G, Wu X, Jiang Z, et al. Tumour-secreted miR-9 promotes endothelial cell migration and angiogenesis by activating the JAK-STAT pathway. *The EMBO journal*. 2012;31(17):3513-23.
10. Eken C, Gasser O, Zenhausern G, et al. Polymorphonuclear neutrophil-derived exosomes interfere with the maturation of monocyte-derived dendritic cells. *Journal of immunology*. 2008;180(2):817-24.
11. Daniel L, Fakhouri F, Joly D, et al. Increase of circulating neutrophil and platelet microparticles during acute vasculitis and hemodialysis. *Kidney International*. 2006;69(8):1416-23.
12. Hong Y, Eleftheriou D, Hussain AA, et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies stimulate release of neutrophil microparticles. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2012;23(1):49-62.
13. Bohman S, Matsumoto T, Suh K, et al. Proteomic analysis of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell differentiation reveals a role for chloride intracellular channel 4 (CLIC4) in tubular morphogenesis. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(51):42397-404.
14. Montalvo J, Spencer C, Hackathorn A, et al. ROCK1 & 2 perform overlapping and unique roles in angiogenesis and angiosarcoma tumor progression. *Current molecular medicine*. 2013;13(1):205-19.
15. Tan W, Palmby TR, Gavard J, et al. An essential role for Rac1 in endothelial cell function and vascular development. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2008;22(6):1829-38.
16. Halbwachs L, Lesavre P. Endothelium-neutrophil interactions in ANCA-associated diseases. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2012;23(9):1449-61.
17. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schonermarck U, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nature medicine*. 2009;15(6):623-5.
18. Winberg LK, Jacobsen S, Nielsen CH. Microparticles from patients with systemic lupus erythematosus induce production of reactive oxygen species and degranulation of polymorphonuclear leukocytes. *Arthritis research & therapy*. 2017;19(1):230.
19. Mavria G, Vercoulen Y, Yeo M, et al. ERK-MAPK signaling opposes Rho-kinase to promote endothelial cell survival and sprouting during angiogenesis. *Cancer cell*. 2006;9(1):33-44.
20. Sirasuga M, Fleming I. The eNOS signalosome and its link to endothelial dysfunction. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2016;468(7):1125-37.
21. Bulotta S, Barsacchi R, Rotiroti D, et al. Activation of the endothelial nitric-oxide synthase by tumor necrosis factor-alpha. A novel feedback mechanism regulating cell death. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(9):6529-36.
22. Tang N, Sun B, Gupta A, et al. Monocyte exosomes induce adhesion molecules and cytokines via activation of NF-κB in endothelial cells. *FASEB J*. 2016;30(9):3097-106.

23. Atehortúa L, Rojas M, Vásquez G, et al. Endothelial activation and injury by microparticles in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2019;21(1):34.
24. Li S, Chen H, Ren J, et al. MicroRNA-223 inhibits tissue factor expression in vascular endothelial cells. *Atherosclerosis.* 2014;237(2):514-20.
25. Li J, Tan M, Xiang Q, et al. Thrombin-activated platelet-derived exosomes regulate endothelial cell expression of ICAM-1 via microRNA-223 during the thrombosis-inflammation response. *Thrombosis research.* 2017;154:96-105.
26. Janssen HL, Reesink HW, Lawitz EJ, et al. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *The New England journal of medicine.* 2013;368(18):1685-94.
27. Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nature reviews Drug discovery.* 2017;16(3):203-22.
28. Billinge ER, Broom M, Platt M. Monitoring aptamer-protein interactions using tunable resistive pulse sensing. *Analytical chemistry.* 2014;86(2):1030-7.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

SUPPLEMENTAL METHODS

Antibodies and reagents

ANCA antibodies used in our *in vitro* neutrophil activation model were mouse monoclonal anti-PR3 IgG1. The CLB12.8 clone (Interchim) was initially used, but after its commercialization was discontinued another monoclonal mouse IgG1, the PR3G-2 clone (Hycult Biotech), that recognizes similar epitopes compared to the CLB12.8¹, was used. The control isotype antibody was the mouse IgG1 clone 11711 (R&D Systems). Total IgG from two patients with active anti-PR3 ANCA-associated vasculitis were isolated from plasma samples collected following plasma exchange treatment, onto Protein A columns (GE Healthcare), according to the manufacturer's instructions. Antibodies against phosphorylated p44/42 MAPK (T202/Y204), p44/42 MAPK, phosphorylated eNOS (S1177), eNOS, and β -actin were purchased from Cell Signaling Technology. Antibodies used in confocal microscopy studies were a purified anti-CD31 antibody (Abcam), and a secondary goat AlexaFluor 488 conjugated anti-mouse IgG (H+L) antibody (Invitrogen). DAPI was from ThermoFisher Scientific. Lipopolysaccharides (LPS) from E.Coli 0111:B4 and N-Formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) were from Sigma Aldrich. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) was purchased from InvivoGen. Human recombinant TNF α was obtained from R&D Systems.

Cell culture

Single donor primary human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC) were purchased from Clonetics (Lonza) and cultured in complete EGM-2MV medium (Lonza). Cells were used between passages 5 to 8.

miRNA profiling in HDMEC by Taqman Low Density Arrays

HDMEC were co-incubated for 24 hrs with EVs released by ANCA-activated neutrophils (EVs from 25×10^6 neutrophils per well of a 12-well plate), and after extensive PBS washes, miRNA expression profiles of HDMEC were analyzed by Taqman Low Density Arrays (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Briefly, RNA was extracted using the *mirVana*[™] miRNA Isolation kit (Invitrogen), and miRNAs were reverse transcribed using the Megaplex Primer Pools and the Taqman[™] MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). After a step of preamplification of miRNAs using the Megaplex[™] PreAmp Primers and the TaqMan[™] PreAmp Master Mix (Applied Biosystems), miRNA profiles were analyzed using the Taqman[™] Array Human MicroRNA A+B Cards set (Applied Biosystem) that enables the analysis of a selection of 754 human mature miRNAs, with a Vii[™] 7 real-time PCR thermocycler (Applied Biosystems). Results obtained were validated using specific qPCR (see below).

Transfection of miRNA mimics and miRNA inhibitors

HDMEC were transfected with 10 nM of miRNA mimics (hsa-miR-223-3p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-451a) and a negative control miRNA mimic (Ambion, Life Technologies), or 20 nM of miRNA inhibitors or “antagomiR” (hsa-miR-142-3p and hsa-miR-451a mirVana inhibitors) and a negative control antagomiR (Ambion, Life Technologies) using Lipofectamine® RNAimax (ThermoFisher) according to the manufacturer’s instructions. The overexpression efficiency was assessed 48 hours after transfection by specific qPCR.

Western Blot

HDMEC were lysed 48 hours after miRNA mimic transfection with radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (Cell Signaling Technology) containing protease and phosphatase inhibitors (ThermoFisher Scientific). Proteins were separated on a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel and transferred onto polyvinylidene fluoride membranes. After blocking for 1 hour in PBS-0.1% Tween-20 containing 5% bovine serum albumin, membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibodies, washed, and incubated with specific secondary peroxidase-coupled antibodies. Proteins of interest were finally detected with the SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific) using a LAS-400 Image Analyser (Fujifilm - LifeScience). Pictures were analyzed using the MultiGauge software (Fujifilm - Life Science).

Gene expression studies

Total mRNA was isolated from HDMEC 48 hours following miRNA mimic transfection using the miRNeasy isolation kit (Qiagen) and cDNA was generated using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. A TaqMan Custom Plate designed to analyze the expression of 92 genes of interest related to endothelial cell biology (ThermoFisher Scientific, **Supplementary Table 2**) was used to examine HDMEC responses to miRNAs of interest. Results were validated by quantitative RT-PCR as described above.

Quantitative real-time PCR

Quantitative real-time PCR was performed to analyze miRNA and gene expression levels in HDMEC. For miRNA expression analyses, total RNA enriched in miRNAs was extracted from HDMEC using the *mirVana*[™] miRNA Isolation kit (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcriptions (RT) and qPCR specific for each miRNA of interest were performed using the MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) and specific Taqman[™] miRNA expression assays (Applied Biosystems). For gene expression analysis, mRNA were extracted from HDMEC using the RNeasy isolation kit (Qiagen). cDNA was generated using the High Capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems) and qPCR was performed using specific Taqman[™] gene expression assays. Relative expression of each miRNA vs. the RNU48 control, and of each mRNA vs. the HPRT control, were calculated according to the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, as previously described ².

Protein Arrays

Expression of 43 human kinases and proteins in their total and phosphorylated forms was analyzed using the Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit (R&D Systems) according to the manufacturer's instructions.

Enzyme-linked immunosorbent assays

Secretion of IL-6, IL-8, CXCL10 and CXCL11 was analyzed in culture supernatants using the specific Human DuoSet ELISA kits (R&D Systems) according to the manufacturer's instructions.

miRNA quantification in kidney biopsies

Total RNA enriched in miRNAs was isolated from human kidney biopsies using the gentleMACS™ dissociator and the mirVana™ miRNA Isolation kit (ThermoFisher Scientific), according to the manufacturer's instructions. Specific miRNA reverse transcription, preamplification and quantitative real-time PCR were performed as described above.

SUPPLEMENTAL REFERENCES

- S1. Van Der Geld YM, Limburg PC, Kallenberg CG. Characterization of monoclonal antibodies to proteinase 3 (PR3) as candidate tools for epitope mapping of human anti-PR3 autoantibodies. *Clinical and experimental immunology*. 1999;118(3):487-96.
- S2. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.

SUPPLEMENTAL FIGURES AND TABLES

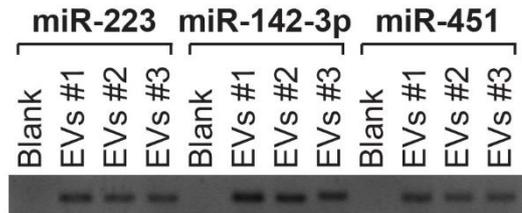


Figure S1. Extracellular vesicles released by activated neutrophils carry miR-223, miR-142-3p and miR-451

Neutrophils from healthy volunteers were primed for 15 min with 2 ng/mL of TNF α , and subsequently activated with 5 μ g/mL of mouse monoclonal anti-PR3 IgG1 (clone CLB12.8) for 4 hours. EVs released in the culture medium were isolated using the ExoquickTM Reagent, and the expression of miR-223, miR-142-3p and miR-451 in these EVs was assessed by PCR. The PCR products obtained were loaded on an agarose gel. The photomicrograph shows the expression of these three miRNAs in EVs released by ANCA-activated neutrophils from 3 independent experiments (EVs#1, EVs#2 and EVs#3).

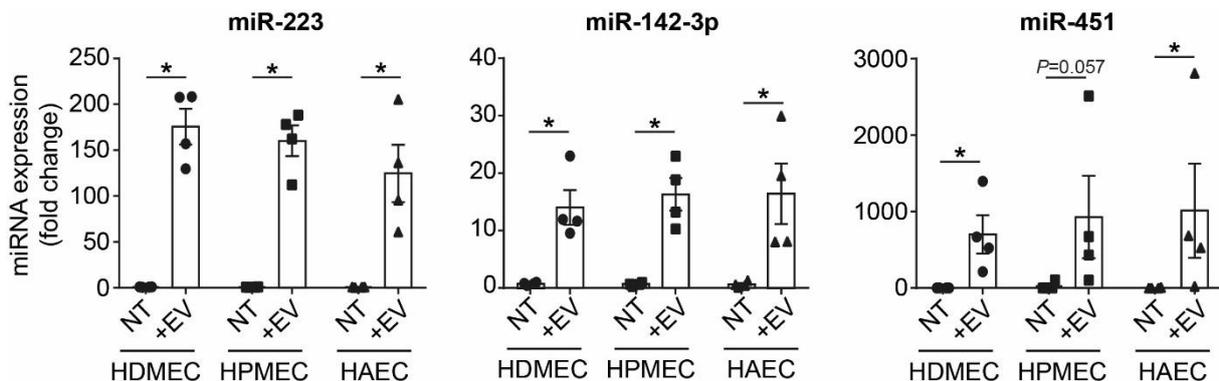


Figure S2. Extracellular vesicles released by PR3 ANCA-activated neutrophils can transfer miR-223, -142-3p and -451 to different types of endothelial cells.

Neutrophils from healthy volunteers were primed for 15 min with 2 ng/mL of TNF α , and subsequently activated with 5 μ g/mL of mouse monoclonal anti-PR3 IgG1 (clone PR3G-2) for 4 hours. EVs released in the culture medium were isolated using the ExoquickTM reagent and added to the medium of Human Dermal Microvascular Endothelial Cells (HDMEC), Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells (HPMEC) and Human Aortic Endothelial Cells (HAEC). After 24 hours of co-incubation, miR-223, miR-142-3p and miR-451 expressions were analyzed in these ECs by qPCR. The scatter plots represent individual values and the mean fold change (\pm SEM) in miRNA expression vs. untreated ECs (NT) from n=4 independent experiments. *P<0.05.

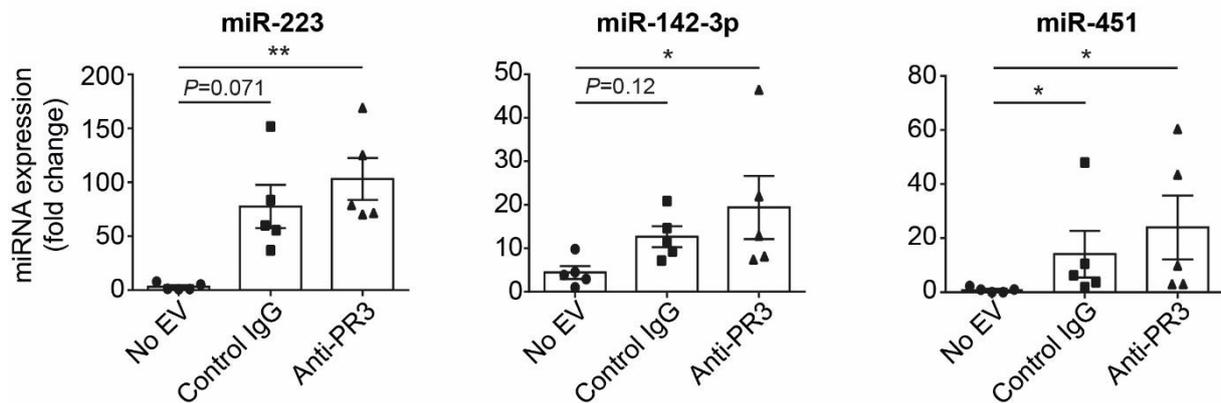


Figure S3. Activation of neutrophils through stimulation of Fcγ receptors also induces the release of extracellular vesicles that carry miR-223, -142-3p and -451 and transfer them to microvascular endothelial cells.

Neutrophils from healthy volunteers were primed for 15 min with 2 ng/mL of TNFα, and subsequently activated with 5 μg/mL of mouse monoclonal anti-PR3 IgG1 (clone CLB12.8) or a control mouse monoclonal IgG1 (clone 11711, R&D Systems) for 4 hours. EVs released by these neutrophils were isolated using the Exoquick™ Reagent and added to the culture medium of HDMEC. 24 hours later, miR-223, miR-142-3p and miR-451 expressions were analyzed in HDMEC by qPCR. The scatter plots represent individual values and the mean fold change (± SEM) in miRNA expression from 5 independent experiments. *P<0.05, **P<0.01.

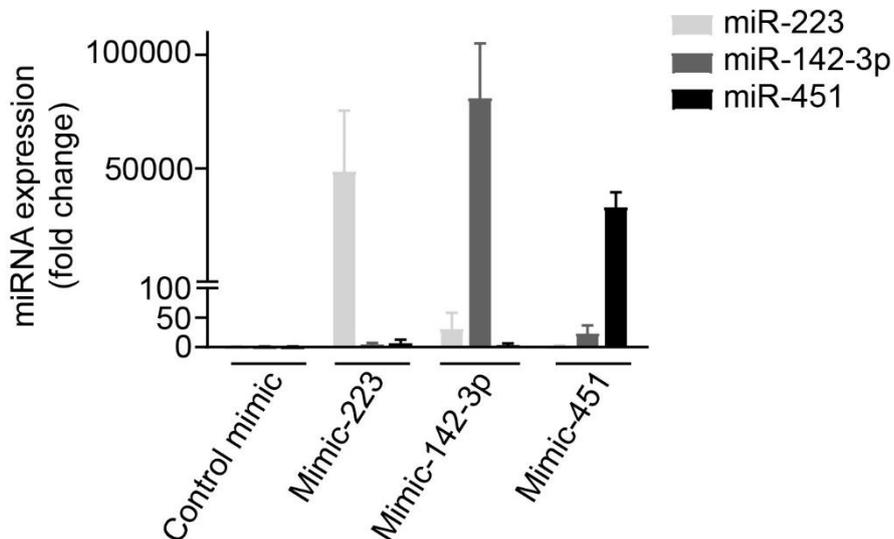


Figure S4. Assessment of miR-223, miR-142-3p and miR-451 overexpression in HDMEC upon transfection of their specific miRNA mimics

HDMEC were transfected with 10 nM of miRNA mimics for miR-223, miR-142-3p, miR-451 or a negative control mimic, and overexpression of these miRNAs was assessed 48 hours later by qPCR. The bar graph shows the mean fold change in miRNA expression for each (± SEM) from 3 independent experiments.

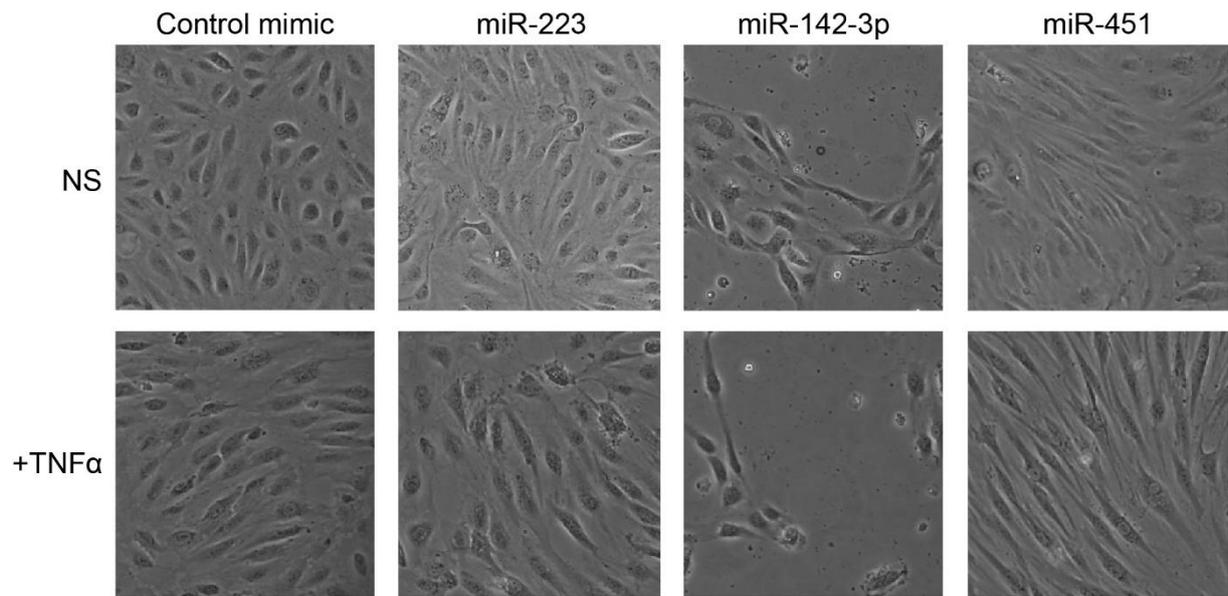


Figure S5. miR-142-3p and miR-451 overexpression induce phenotypic changes in HDMEC

HDMEC were transfected with 10 nM of miRNA mimics for miR-223, miR-142-3p, miR-451 or a negative control mimic, and 24 hours later, 100 U/mL of TNF α was added to the culture medium. Cells were observed after an additional 24 hours of cell culture by microscopy (X10 magnification). Representative photomicrographs of HDMEC are shown.

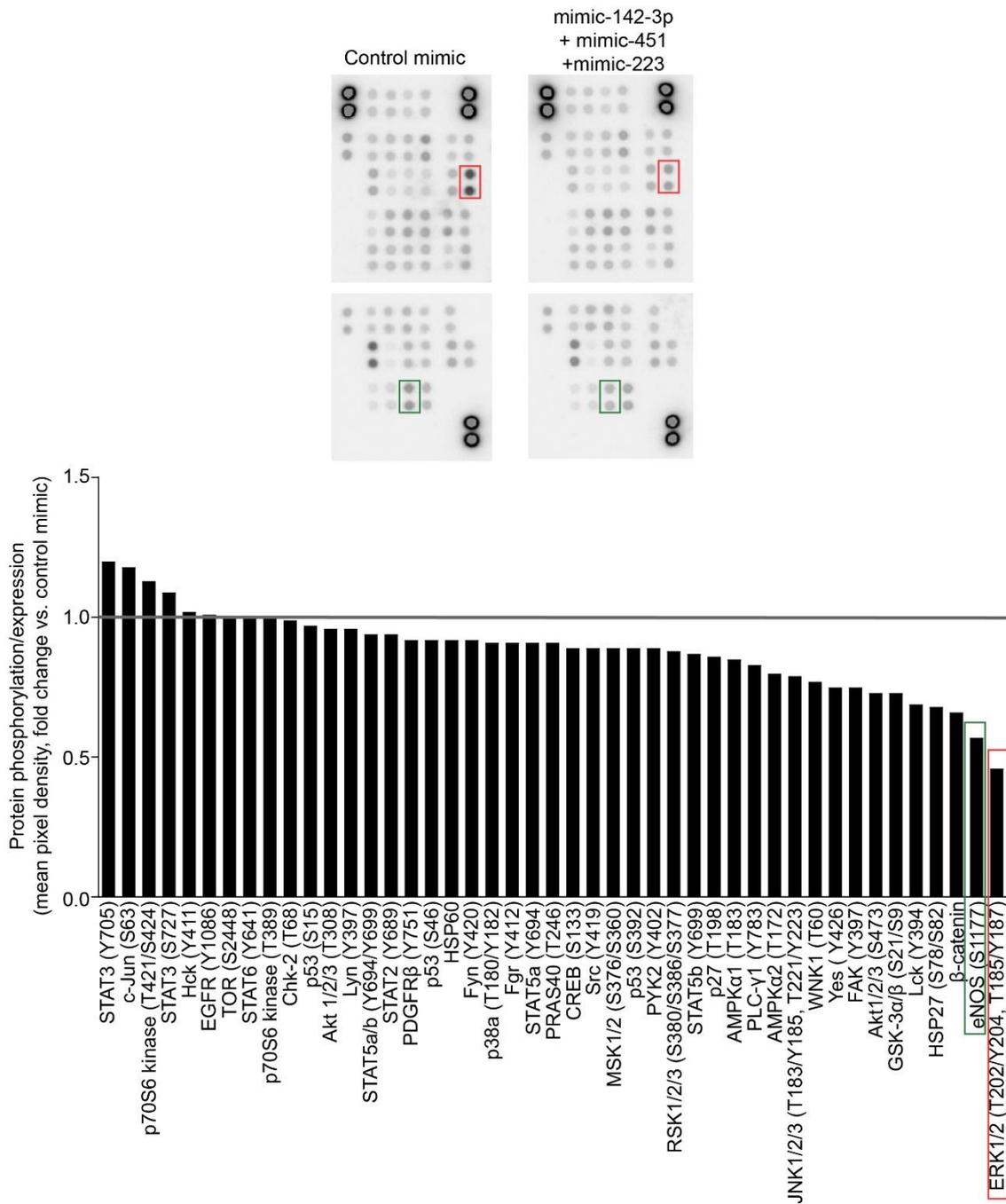


Figure S6. Overexpression of miR-223, -142-3p and -451 inhibits several signaling pathways in HDMEC

HDMEC were transfected with a pool of miRNA mimics for miR-223, miR-142-3p, miR-451 (10 nM each) or a negative control mimic (30 nM), and 48 hours later, a phosphokinase protein array was performed on cell lysates to analyze the relative expression of 46 individual kinases or some of their target proteins. Results obtained are shown on the photomicrograph. The bar graph illustrates the fold change in pixel density for each protein of the array in miR-223, -142-3p and -451 overexpressing cells vs. control cells. The downregulation of ERK1/2 and eNOS-mediated signals is highlighted in red and green boxes respectively.

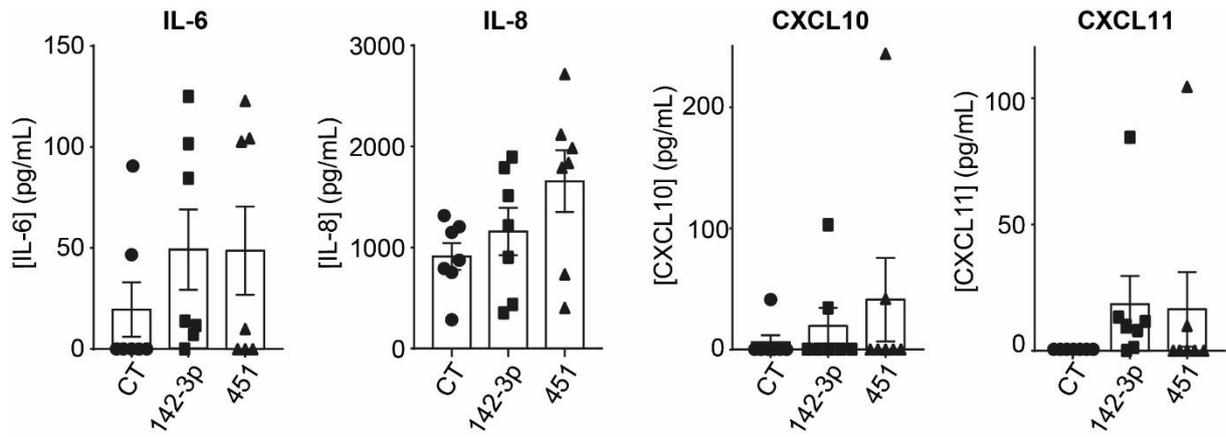


Figure S7. miR-142-3p and miR-451 induce the secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines by microvascular endothelial cells.

HDMEC were transfected with 10 nM of mimics of miR-142-3p and miR-451 or a negative control mimic (CT). The secretion of IL-6, IL-8, CXCL10 and CXCL11 in the culture medium was analyzed by ELISA 48 hours after transfection. Scatter plots show the fold changes in mRNA expression (with mean \pm SEM) from 7 independent experiments.

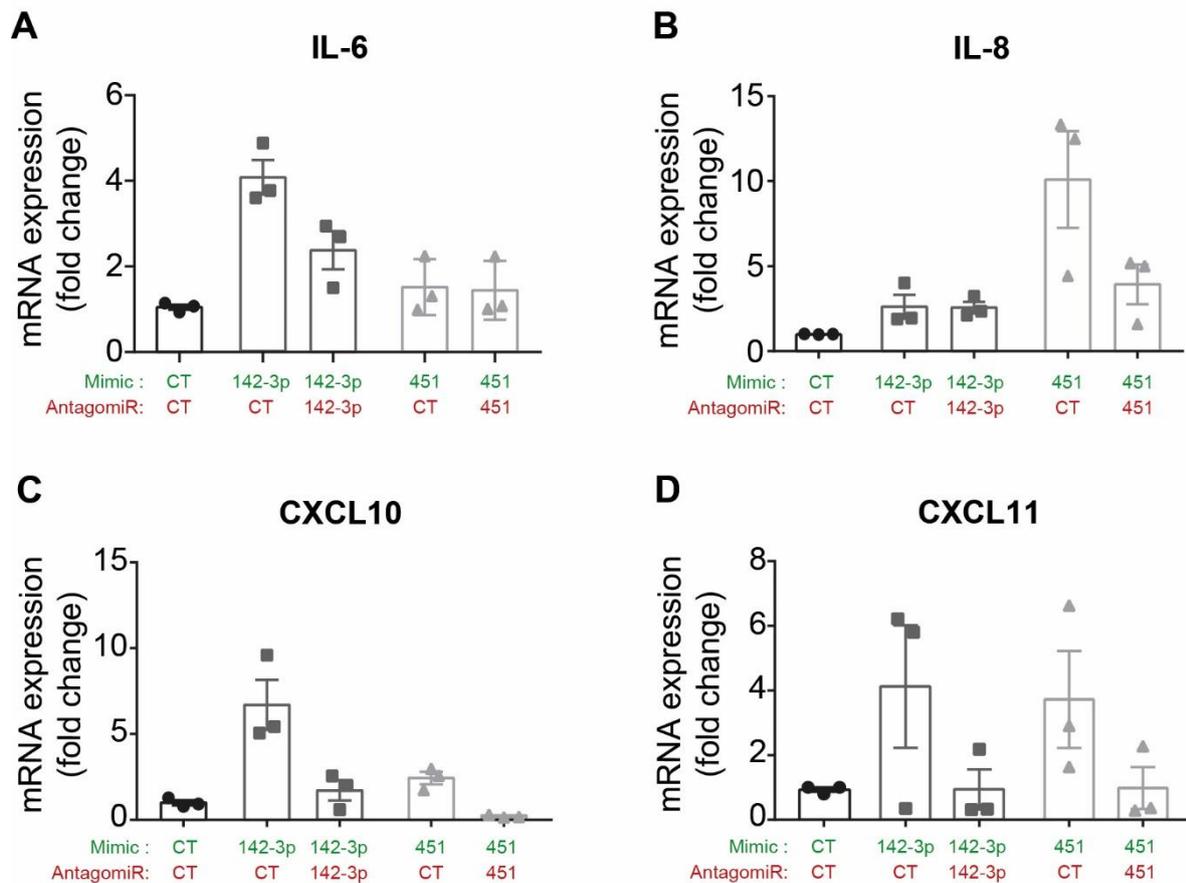


Figure S8. Antagomir-142-3p and -451 efficiently block the induction of proinflammatory chemokines and cytokines upon miR-142-39 and -451 overexpression in HDMEC.

HDMEC were co-transfected with 10 nM of mimics of miR-142-3p, miR-451 or a negative control mimic, and with 20 nM of inhibitors (“Antagomirs”) of miR-142-3p, miR-451 or a negative control antagomir. The mRNA expression of IL-6 (A), IL-8 (B), CXCL10 (C) and CXCL11 (D) was analyzed by qPCR forty-eight hours after transfection. Scatter plots show the fold change in mRNA expression (with mean \pm SEM) from 3 independent experiments.

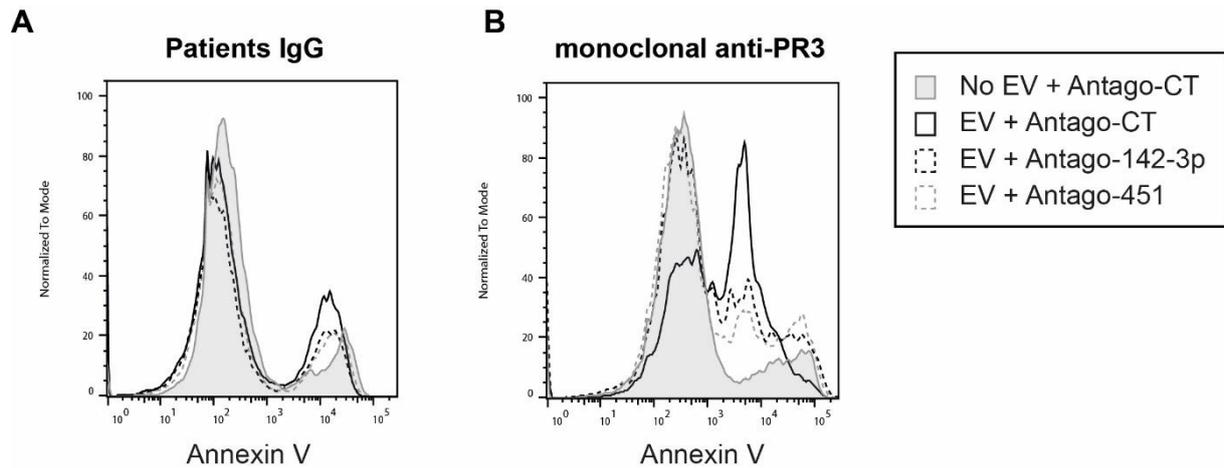


Figure S9. Extracellular vesicles released by ANCA-activated neutrophils induce microvascular EC apoptosis in the presence of TNF α through miR-142-3p-dependent mechanisms.

HDMEC were transfected with 20 nM of specific miR-142-3p and miR-451 inhibitors (antago-142-3p and antago-451) or a negative control antagomir (antago-CT) and 24 hours later, EVs released by neutrophils activated with IgG purified from PR3-AAV patients (A) or with murine monoclonal anti-PR3 IgG1 (clone PR3-G2) (B) were added to the culture medium. HDMEC apoptosis was evaluated after additional 48 hrs of culture. Representative histograms of flow cytometry analyzes from respectively n=8 and n=5 independent experiments are shown.

miRNA	Experiment #1	Experiment #2	Experiment #3	Mean
miR-223	50.42	62.49	80.13	64.35
miR-142-3p	Newly expressed	5.34	3.28	4.31
miR-451	13.84	Newly expressed	15.62	14.73
miR-589	3.32	3.98	2.51	3.27
miR-432#	2.47	4.57	2.62	3.22
miR-378	2.35	2.00	1.43	1.93
miR-638	2.29	2.38	1.36	2.01
miR-335#	1.36	15.29	2.72	6.46
miR-542-5p	2.39	1.47	1.54	1.80
miR-645	1.47	3.97	1.36	2.27
miR-639	1.66	2.51	2.38	2.18
miR-9	1.26	1.50	3.58	2.11

Table S1. miRNAs identified as increased in HDMEC after co-incubation with neutrophil-derived EVs.

Neutrophils from healthy volunteers were primed for 15 min with 2 ng/mL of TNF α , and subsequently activated with 5 μ g/mL of mouse monoclonal anti-PR3 IgG1 (clone CLB12.8) for 4 hours. EVs released in the culture medium were isolated using the Exoquick™ Reagent, and co-incubated for 24 hours with HDMEC. miRNA profiles were analyzed in HDMEC before and after co-incubation by TaqMan Low Density Arrays, in three independent experiments. The table shows the miRNAs that were found consistently upregulated in all three experiments. The fold changes in miRNA expression after co-incubation vs. before co-incubation are shown.

Abreviation	Full Name	miR-223	miR-142-3p	miR-451
ADAM17	ADAM metallopeptidase domain 17	0.66	0.90	1.17
ANGPT1	angiopoietin 1	undetected	undetected	undetected
ANXA5	annexin A5	0.80	0.91	1.07
APOE	apolipoprotein E	3.41	1.16	1.04
BAX	BCL2-associated X protein	0.91	0.89	1.19
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	0.77	0.53	0.59
BCL2L2	BCL2-like 2,BCL2L2-PABPN1 readthrough	1.12	0.89	3.02
CASP1	caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase	0.64	1.59	0.64
CASP3	caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase	1.11	1.40	1.16
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	0.52	0.59	1.09
CCL20	chemokine (C-C motif) ligand 20	0.43	0.27	0.88
CCL5	chemokine (C-C motif) ligand 5	0.56	0.97	0.92
CCNT2	cyclin T2	1.04	0.68	0.75
CDH5	cadherin 5, type 2 (vascular endothelium)	0.71	0.75	1.26
CDK2	cyclin-dependent kinase 2	0.69	1.04	0.92
CDKN2D	cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19, inhibits CDK4)	0.63	1.53	0.40
CHUK	conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	0.84	0.62	0.97
CTNNB1	catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa	0.68	0.60	0.42
CX3CL1	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	0.67	0.60	0.73
CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	0.27	2.50	3.11
CXCL11	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	0.48	3.51	1.80
E2F1	E2F transcription factor 1	0.20	1.42	0.66
EDF1	endothelial differentiation-related factor 1	1.09	0.81	1.13
EDN1	endothelin 1	0.87	0.63	0.51
EDN2	endothelin 2	undetected	undetected	undetected
EDNRA	endothelin receptor type A	undetected	undetected	undetected
EDNRB	endothelin receptor type B	1.25	1.99	1.35
ENG	endoglin	0.79	0.97	0.87
EP300	E1A binding protein p300	0.92	1.00	1.00
F2R	coagulation factor II (thrombin) receptor	0.99	0.74	1.01
F3	coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)	0.47	0.82	2.26
FAS	Fas cell surface death receptor	0.76	1.02	0.89
FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	undetected	undetected	undetected
FGF1	fibroblast growth factor 1 (acidic)	undetected	undetected	undetected
FGF2	fibroblast growth factor 2 (basic)	1.02	0.78	0.45
FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1	0.90	0.78	0.84
FGFR2	fibroblast growth factor receptor 2	undetected	undetected	undetected
FGFR3	fibroblast growth factor receptor 3	1.42	0.29	6.30
FLT1	fms-related tyrosine kinase 1	1.62	1.62	2.38
FN1	fibronectin 1	1.10	0.71	0.54
GCH1	GTP cyclohydrolase 1	0.91	1.04	1.07
HIF1A	hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	0.90	0.74	0.91

HMOX1	heme oxygenase (decycling) 1	1.16	1.08	4.67
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1	0.26	0.87	1.28
IL1A	interleukin 1, alpha	1.26	0.81	1.08
IL1B	interleukin 1, beta	1.83	0.10	0.29
IL6	interleukin 6 (interferon, beta 2)	2.23	6.56	1.42
IL6R	interleukin 6 receptor	1.23	1.94	0.26
IL7	interleukin 7	0.43	0.82	0.51
IL8	interleukin 8	1.11	0.72	5.06
ITGA5	integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)	0.93	0.76	1.66
ITGAV	integrin, alpha V	1.04	0.26	1.19
ITGB1	integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)	0.69	0.87	1.07
ITGB3	integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)	0.73	1.38	1.76
KDR	kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)	1.09	1.96	1.15
MAP3K7	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7	1.88	1.21	1.57
MAPK3	mitogen-activated protein kinase 3	1.04	0.59	1.18
MMP1	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	0.66	2.24	5.18
MMP2	matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)	0.48	1.55	0.54
MMP9	matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)	0.45	2.13	1.22
NOS3	nitric oxide synthase 3 (endothelial cell)	0.91	0.54	0.86
NRP1	neuropilin 1	1.09	2.43	1.48
NRP2	neuropilin 2	1.55	1.32	1.27
PDGFRA	platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide	1.43	4.42	3.97
PECAM1	platelet/endothelial cell adhesion molecule 1	0.79	1.06	0.96
PF4	platelet factor 4	undetected	undetected	undetected
PLAT	plasminogen activator, tissue	1.54	2.67	2.17
PLAU	plasminogen activator, urokinase	0.62	2.06	7.35
PLG	plasminogen	undetected	undetected	undetected
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	1.87	1.19	3.85
PTK2	protein tyrosine kinase 2	1.32	1.09	1.60
RAC1	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)	0.39	0.22	1.12
RHOB	ras homolog family member B	0.43	2.75	2.89
ROCK2	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 2	0.85	0.39	0.96
SELE	selectin E	0.10	1.07	1.66
SELL	selectin L	9.77	15.49	1.22
SELPLG	selectin P ligand	undetected	undetected	undetected
SERPINE1	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	1.73	0.22	2.35
SOCS5	suppressor of cytokine signaling 5	0.96	0.93	0.90

SPHK1	sphingosine kinase 1	0.92	0.57	2.19
STMN1	stathmin 1	0.32	2.56	0.90
TEK	TEK tyrosine kinase, endothelial	1.25	0.92	1.26
TFPI	tissue factor pathway inhibitor (lipoprotein-associated coagulation inhibitor)	0.99	0.70	0.75
TGFB1	transforming growth factor, beta 1	0.86	0.52	0.85
THBD	thrombomodulin	2.41	0.44	3.08
THBS1	thrombospondin 1	1.14	0.85	0.62
TNF	tumor necrosis factor	0.81	0.23	2.01
TYMP	thymidine phosphorylase	0.98	1.11	2.71
VCAM1	vascular cell adhesion molecule 1	0.10	1.12	0.55
VEGFA	vascular endothelial growth factor A	1.42	0.37	0.88
VWF	von Willebrand factor	0.58	1.02	0.41
WNK1	WNK lysine deficient protein kinase 1	0.78	0.84	0.82

Table S2. Analysis of genes regulated by miR-223, miR-142-3p and miR-451 in ECs

HDMEC were transfected with 10 nM of miRNA mimics for miR-223, miR-142-3p or miR-451, or a negative control mimic, and the expression of 92 genes related to EC biological responses were analyzed using a custom qPCR-based array in 2 independent experiments. The table shows the mean fold change in mRNA expression for each gene in mimic transfected cells vs. control cells.

DISCUSSION

DISCUSSION

I - Le transfert de miR-223, miR-142-3p et miR-451 aux CE microvasculaires

Nos travaux décrivent un mécanisme inédit d'atteinte vasculaire induit par des neutrophiles activés dans un contexte pathologique. Nous avons en effet démontré pour la première fois que les polynucléaires neutrophiles activés par des ANCA étaient capables de relarguer des vésicules extracellulaires chargées en miR-223, miR-142-3p et miR-451, pouvant être internalisées par des CE microvasculaires dermiques humaines en culture primaire (HDMEC) (**Figure 1 Article**). Il s'agit bien d'un transfert de miARN matures et non d'une uprégulation de leur transcription, puisque les niveaux de précurseurs « pri-miR » sont inchangés suite à la coincubation des VE et des CE. Nous avons mis en évidence que le transfert de ces miARNs aux HDMEC leur était globalement délétère, induisant notamment leur apoptose (**Figure 5 Article**). La stimulation avec des IgG totales issues de plasmaphèreses de patients VAA possédant des anti-PR3 détectables, ainsi que par des neutrophiles de patients anti-PR3+ en poussée / rechute induit également ce transfert. On peut noter un profil différent selon l'antigène ciblé par les ANCA, les VE induites par les anti-PR3 permettant un transfert important de miR-142-3p, tandis que les anti-MPO induisent davantage celui du miR-451. Dans tous les cas, le miARN qui est induit le plus fortement est le miR-223. Etant donné que seul le miR-142-3p induit de façon significative une apoptose des CE microvasculaires dans notre modèle, cette différence est intéressante à observer, et il serait pertinent de déterminer si la spécificité antigénique des ANCA joue sur le potentiel pro-apoptotique des VE issues des neutrophiles.

Ces travaux comportent cependant quelques limites. Les expériences de transfert de miARN ont été réalisées uniquement *in vitro*, et il serait intéressant de les vérifier dans des

tissus lésés au cours de poussées de VAA, en utilisant par exemple des techniques d'hybridation *in situ* afin de détecter ces miARNs dans les biopsies de patients. Par ailleurs, les doses de micro-ARN utilisées dans le modèle de surexpression, ainsi que la quantité de VE coïncubées avec les CE microvasculaires sont arbitraires et pourraient ne pas correspondre à celles retrouvées localement au sein des micro-capillaires lésés. Les neutrophiles utilisés provenaient pour des raisons pratiques majoritairement de volontaires sains, et pourraient être différents de ceux retrouvés chez les patients (variations des stimuli reçus, profil épigénétique distinct...). Nous avons cependant pu observer ce transfert à partir de neutrophiles de patients en rechute, isolés de la circulation et non-restimulés (**Figure 1. Article**). Ce transfert de miARN ne constitue de plus qu'un mécanisme isolé de lésion endothéliale, et les VE produites par les neutrophiles activées sont composées de nombreuses autres molécules potentiellement actives biologiquement, effectuant des actions antagonistes, synergiques ou redondantes. Il est ainsi possible que le ciblage thérapeutique de ces miARN soit *in fine* moins pertinent que celui des VE qui les contiennent. Pour répondre à cette dernière question, il serait nécessaire de caractériser davantage les VE produites suite à l'activation par les ANCA, en identifiant des marqueurs de surface, en mettant à jour leurs caractéristiques biochimiques et notamment en identifiant plus précisément leur contenu en dehors de ces trois miARNs.

Nous avons commencé à déterminer quel sous-type de VE permettait ce crosstalk. Des résultats préliminaires présentés **Figure 18** montrent que les VE de toutes tailles sont capables de transférer ces trois miARNs aux CE microvasculaires, et en particulier les plus petites fractions non enrichies en exosomes (« 100K- »), suggérant un profil de type « petites microparticules », qui coïnciderait avec l'augmentation de relargage de VE de petite taille observée au qNano suite à la stimulation des neutrophiles par les ANCA (**Figure 1 Article**).

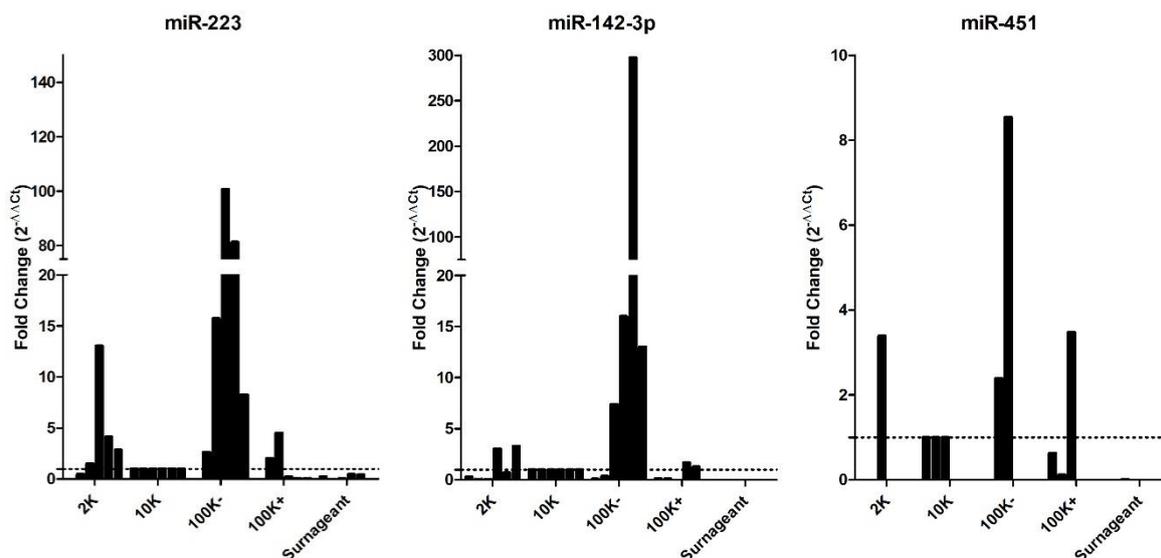


Figure 18 – Identification des sous-populations de VE impliquées dans le transfert de miARN

Les VE de neutrophiles activés par 2ng/mL de TNF α (15min) puis 200 μ g/mL d'IgG totales de patients VAA (4h) ont été isolées par ultracentrifugation différentielle en 3 fractions (2K, 10K, 100K) en suivant le protocole détaillé **Figure 9** selon Kowal et ses collègues (Kowal et al., 2016). La fraction « 100K » a ensuite été enrichie en exosomes (CD9+/CD63+/CD81+) en utilisant le protocole décrit **Figure 10** d'après les recommandations du protocole Exosome Isolation Kit Pan Human (Miltenyi Biotec). La fraction 100K+ (100K-positive) correspond à la fraction enrichie en exosomes, et triée en utilisant des billes couplées avec des anticorps anti-CD9, anti-CD63 et anti CD81. L'ensemble de ces fractions ont été mises en contact avec des CE microvasculaires dermiques pendant 24h, puis celles-ci ont été lysées et une RT-qPCR spécifique des miR-223, miR-142-3p et miR-451 a été effectuée sur ces lysats, en prenant comme gène de référence le RNU48 et comme condition de référence la fraction 10K (n=5 expériences indépendantes).

II - Impact du transfert de micro-ARNs issus de neutrophiles activés sur les réponses endothéliales

Les expériences de surexpression de ces miARNs par transfection et de coincubation de VE avec les HDMEC ont permis de mettre en évidence un impact globalement délétère des miR-142-3p et miR-451, mais n'ont pas montré d'impact majeur du miR-223.

Le résultat le plus marquant est que le miR-142-3p induit l'apoptose des CE, *a fortiori* en conditions inflammatoires (présence de TNF α). Cette mort cellulaire perturbe la réparation endothéliale, la cicatrisation et la formation de tubes endothéliaux. Les miARNs ont des sites de fixation potentiels sur des centaines de cibles, et cet impact pro-apoptotique du miR-142-

3p est probablement explicable par une somme d'interactions miRISC/ARNm cible importante. Le miR-142-3p empêche l'induction de la voie eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*) en réponse au TNF α , et cause une diminution du ratio forme active/forme inactive p-ERK1/2 (forme phosphorylée active de l'*extracellular signal-regulated kinase 1/2*), (**Figure 3 Article**), dérégulant ces voies nécessaires à la survie des CE (Bulotta et al., 2001; Mavria et al., 2006; Siragusa and Fleming, 2016). Des transferts du miR-142-3p aux CE, et leurs conséquences, ont été décrits dans d'autres situations pathologiques, et corroborent l'impact pro-apoptotique du miR-142-3p. Au cours du développement de l'athérosclérose, le transfert aux CE de ce miR-142-3p via les LDL (*low density lipoproteins*) inhibe les voies RICTOR, eNOS et Akt (Qin et al., 2018), ce qui confirme nos résultats. Dans un contexte d'hypertension, les plaquettes produisent des VE chargées en miR-142-3p, qui sont internalisées par les CE. Ce miARN y cible directement BCL2L1, un inhibiteur de l'action de caspases pro-apoptotiques aussi nommé BCL-X (Bao et al., 2017). Nous avons pu reproduire de façon préliminaire une diminution de la quantité de BCL-X (n=2) suite à la surexpression du miR-142-3p dans des HDMEC (**Figure 21**), pouvant également expliquer en partie l'apoptose observée (ces résultats doivent être confirmés par Western Blot).

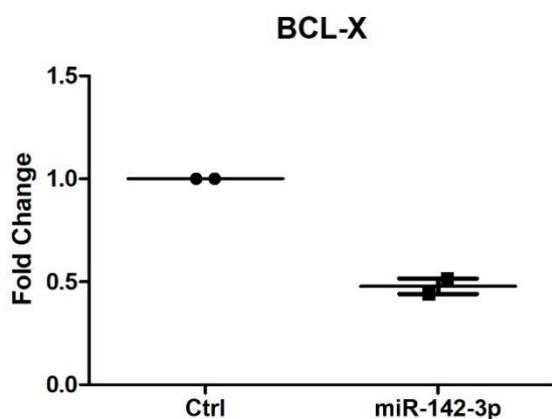


Figure 19 – Diminution de l'expression de BCL-X suite à la transfection de miR-142-3p

Quantité relative (fold change) de la protéine BCL-X 48h après surexpression du mimic analogue du miR-142-3p, en prenant comme condition de référence la transfection d'un mimic contrôle (n=2).

Référence : Proteome Profiler Human Apoptosis Array Kit (R&D systems)

Nous avons également pu mettre en évidence que les quantités relatives d'ARNm possédant des séquences cibles du miR-142-3p étaient diminuées suite à la transfection de ce miARN. En effet, nous avons observé une diminution de l'expression relative des gènes RAC1, ROCK2 et CLIC4 suite à sa surexpression, pouvant donc potentiellement résulter d'un clivage direct induit par le miR-142-3p au sein d'un complexe miRISC. Les molécules codées par ces gènes sont impliquées dans la migration des CE et l'angiogenèse (Bohman et al., 2005; Montalvo et al., 2012; Tan et al., 2008). Il est donc possible que les résultats obtenus lors de expériences de formation de tubes endothéliaux en Matrigel et de cicatrisation soient en partie explicables par l'apoptose, mais également par une diminution de l'angiogenèse réparatrice. Ce micro-ARN a donc un impact sur de nombreux aspects de la signalisation et de la biologie endothéliale, et notamment sur le maintien de l'intégrité endothéliale. Il est donc vraisemblable que le transfert du miR-142-3p au cours des VAA participe aux lésions vasculaires de façon directe, en induisant une mort cellulaire et en inhibant les réponses réparatrices de l'endothélium.

Nous avons également observé une induction de la sécrétion d'IL-6, IL-8, CXCL10 et CXCL11 observée dans notre modèle de surexpression des miR-142-3p ou miR-451. La coincubation de VE de neutrophiles activés avec les CE aboutit au même résultat, reproduisant des données obtenues par Hong et ses collègues dans notre modèle (Hong et al., 2012). En revanche, l'utilisation d'antagomiRs spécifique de ces micro-ARN ne suffit pas à abroger l'effet des VE (**Figure 4**). Cela peut être dû à la présence d'autres molécules pro-inflammatoires dans les VE au rôle redondant avec celui de ces micro-ARNs. On sait par exemple que la voie NFκB peut être induite par différents types de VE et causer l'activation des CE (Migneault et al., 2020), et il serait donc pertinent d'étudier cette voie de signalisation dans notre modèle. D'autres travaux ont pu montrer que les vésicules de neutrophiles activés étaient capables

d'induire des changements morphologiques et des dysfonctions de ces cellules suite au transfert de MPO (Pitanga et al., 2014), et d'autres facteurs protéiques, lipidiques ainsi que d'autres acides nucléiques (lncARN) pourraient être impliqués.

La surexpression du miR-451 induit une morphologie allongée des CE (**Figure S5** Article), ainsi que l'induction d'IL-8, de CXCL10 et CXCL11 (**Figure 4A** Article). Ces caractéristiques évoquant un phénotype pro-inflammatoire, activé, des CE, nous avons cherché à voir si la surexpression de ce miARN pouvait induire une modification détectable par cytométrie en flux de l'expression membranaire de marqueurs d'activation (ICAM-1, VCAM, E-Sélectine, P-Sélectine, HLA-DR, CD55, CD80, CD86) sans mettre en évidence de différence significative dans notre modèle (*données non montrées*). Enfin, d'autres mécanismes en lien avec l'inflammation peuvent également être régulés par nos miARN d'intérêt. Par exemple, on sait que durant un rejet de greffe cardiaque, les VE issues de lymphocytes T sont chargées en miR-142-3p, qui induit une down-régulation de RAB11FIP2 dans les CE, compromettant la barrière endothéliale et facilitant la transmigration de leucocytes dans le greffon (Sukma Dewi et al., 2017). Il serait donc intéressant de vérifier dans notre modèle si nous pouvons reproduire ces données.

Ces résultats suggèrent que les VE de neutrophiles activés, peut-être en partie via un transfert des miR-142-3p et miR-451, induisent la production de cytokines et de chimiokines et participent ainsi à la mise en place d'un environnement pro-inflammatoire qui permet le recrutement d'autres effecteurs sur site, et la mise en place d'une boucle favorisant l'inflammation et donc indirectement les lésions endothéliales.

Au contraire des miR-142-3p et miR-451, le miR-223 semble avoir des effets protecteurs sur les cellules endothéliales, favorisant la cicatrisation au cours de notre

expérience de wound-healing. D'autres études ont également montré un rôle anti-inflammatoire de ce miRNA, notamment dans le cas d'un transfert depuis des VE de neutrophiles vers les cellules épithéliales, via une inhibition des voies de l'inflammasome NLRP3, de l'IL-1 β et de PARP-1 (Neudecker et al., 2017b, 2017a). Cependant, si cet effet existe également dans les CE microvasculaires, il ne semble pas toujours suffisant pour contrecarrer ceux des miR-142-3p et miR-451, comme les expériences de coincubation VE/CE avec et sans antagomiR le montrent. En effet, l'inhibition du miR-142-3p suffit à réduire l'apoptose induite par les VE qui permettent pourtant le transfert de ce miR-223.

Les VE de neutrophiles activés pourraient donc participer au développement des lésions vasculaires au cours des VAA via le transfert des miR-451 et miR-142-3p. Tout d'abord, elles permettent la mise en place d'un environnement pro-inflammatoire facilitant le recrutement de leucocytes (T, monocytes, neutrophiles...) au sein des microcapillaires. Ensuite, le miR-142-3p délivré causerait la mort des CE microvasculaires via une dérégulation de la signalisation de nombreuses voies cruciales (eNOS, ERK, Akt, mTOR, BCL-X), participant à léser de façon directe l'endothélium. L'apoptose ainsi induite, et la modification des réponses endothéliales dues au ciblage de molécules comme Rac1, Rock2 ou Clic4 inhiberaient en outre les mécanismes de réparation endothéliales, aggravant davantage ces lésions.

III – Le transfert de micro-ARNs dans les VAA : un phénomène local ?

Ces phénomènes de transfert de microARN aux cellules endothéliales semblent particulièrement pertinents à étudier dans le cadre des VAA. En effet, on y décrit une très forte concentration de neutrophiles dans les micro-capillaires engorgés à la fois par les NETs et par une coagulation excessive. L'activité de la pathologie est corrélée avec une hyper-

coagulation chez ces patients (Ma et al., 2014), et les neutrophiles activés par des ANCA ont une capacité de NETose augmentée et participent directement aux lésions vasculaires observées, comme évoqué en introduction (Halbwachs and Lesavre, 2012; Kessenbrock et al., 2009). Ces deux phénomènes peuvent obstruer ces vaisseaux de très petit calibre et induire une accumulation massive de neutrophile dans les capillaires des organes touchés. Ces neutrophiles activés par des ANCA relarguent davantage de VE (Daniel et al., 2006), pouvant donc en théorie délivrer des concentrations très importantes de micro-ARNs à ces cellules, et notamment des miR-142-3p et miR-451. Par ailleurs, les NETs peuvent être endocytés par les cellules endothéliales et y induire des dommages directs (Pieterse et al., 2017; Saffarzadeh et al., 2012). La sécrétion des NETs est induite par les mêmes stimuli (ANCA, PMA, LPS...), et dans les mêmes timings que celle des VE. On peut donc formuler l'hypothèse que les VE seraient en partie capturées par les NETs, et que ces derniers participeraient, une fois internalisés par les CE, à introduire ces vésicules dans les cellules cible. L'ensemble de ces mécanismes iraient dans le sens d'une très forte concentration de neutrophiles, et donc de vésicules chargées en miARNs, dans les microcapillaires rénaux, pulmonaires, dermiques,... participant aux lésions micro-vasculaires observées au cours des VAA.

Nous avons observé ce transfert de miR-223, miR-142-3p et miR-451 dans des cellules microvasculaires pulmonaires (HPMEC) et dermiques (HDMEC), toutes deux atteintes par les lésions endothéliales observées au cours des VAA, mais également dans des cellules aortiques, non microvasculaires (**Figure S2**). Cela suggère que ces VE ne sont pas spécifiquement dirigées contre l'endothélium microvasculaire, et donc que leur impact biologique potentiel sur les micro-vaisseaux serait dû à une concentration forte davantage qu'à un adressage spécifique. Il serait pertinent de tester ce transfert dans des cellules endothéliales microvasculaires glomérulaires, également cibles des lésions vasculaires au cours des VAA, mais nous n'avons

pas à ce jour au sein du laboratoire réussi à cultiver une lignée glomérulaire gardant un phénotype stable.

Ce transfert très localisé de micro-ARN est appuyé par l'accumulation de ces séquences au sein de biopsies de patients VAA (**Figure 6. Article**). Nous avons observé une expression relative de miR-223 et de miR-142-3p significativement plus élevée entre les biopsies rénales de patients souffrant d'une glomérulonéphrite (GN) due aux VAA, versus d'autres étiologies non-inflammatoires (syndrome néphrotique idiopathique, GN extramembraneuse). Une tendance similaire (non significatives statistiquement) est observable concernant l'expression du miR-451 dans ces biopsies. Enfin, l'étude de ces biopsies met en évidence une différence, non significative statistiquement, entre les biopsies de patients VAA et d'autres types de GN prolifératives inflammatoires (lupus, néphropathie à IgA, GN membrano-proliférative) : l'expression des miR-223, miR-142-3p et miR-451 semble en moyenne supérieure au sein des biopsies VAA. Ces pathologies étant rares, nous n'avons pu obtenir qu'un faible nombre de biopsies, et nous manquons probablement de puissance statistique pour pouvoir mettre en évidence des différences significatives entre ces groupes. De plus, le phénomène de transfert de miARN de neutrophiles pourrait ne pas être exclusif aux VAA. En effet, nous avons observé que plusieurs types de stimulation des neutrophiles, non spécifique (PMA) ou induite par des éléments d'origine bactérienne (LPS, fMLP) pouvaient également induire un transfert de miR-223, miR-142-3p et de miR-451 d'intensité variable suivant le stimuli (**Figure 1 Article**). Par ailleurs, la stimulation par TNF α et fragment Fc d'IgG contrôle semble également induire ce mécanisme, mais de façon moins importante que par la stimulation TNF α + ANCA (**Figure S3 Article**). Ces stimuli inflammatoires ou infectieux induisent donc également la production de VE par les neutrophiles et le transfert de ces trois miARNs aux CE. Cela suggère que ce mécanisme de crosstalk entre neutrophile activés et CE pourrait être en cause dans d'autres

contextes pathologiques impliquant ces cellules dans des mécanismes de lésions vasculaires, comme le lupus ou le sepsis. En revanche, il semble particulièrement important dans le cadre des VAA de par la concentration très forte de neutrophiles au sein des microcapillaires discutée ci-dessus, qui pourrait induire un transfert massif de façon très localisée de ces micro-ARNs.

Enfin, les miR-223, miR-142-3p et miR-451 sont très exprimés dans de nombreux types de cellules immunitaires (Mandolesi et al., 2017; Rosenberger et al., 2012; Yuan et al., 2018) mais sont très peu transcrits de façon basale dans les CE (**Figure 1. Article**). Les plus fortes quantités de miARNs retrouvées au sein des biopsies VAA, et dans une moindre mesure dans les pathologies « contrôle » inflammatoires *versus* non-inflammatoires, peuvent donc être interprétés de deux façons non exclusives : par un infiltrat important de leucocytes sur le site biopsié, ou par un transfert plus important aux CE microvasculaires. Pour vérifier dans quel type cellulaire se trouvent ces micro-ARN et ainsi limiter le biais induit par l'infiltrat, nous pourrions par la suite réaliser des expériences d'hybridation *in situ* afin de visualiser la présence de ces miARN au sein des CE microvasculaires ou des leucocytes de la biopsie.

IV – Un transfert de micro-ARNs aux CE par les VE de monocytes ?

Comme évoqué en introduction de ce manuscrit, les monocytes expriment également la MPO et la PR3 à leur membrane (Tarzi et al., 2015) et peuvent être activés par des ANCA (Casselmann et al., 1995; Hattar et al., 2002; Ralston et al., 1997). Ils sont capables, tout comme les neutrophiles, de léser directement ou indirectement l'endothélium via différents mécanismes comme la sécrétion de MCP-1, TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, thromboxane A2, la production d'ETs (O'Sullivan et al., 2015) et de ROS (Weidner et al., 2001). Nous avons donc

cherché à savoir quels miARNs étaient spécifiquement transférés par les VE de monocytes activés par des ANCA. Des VE de monocytes non stimulés ou stimulés par TNF α et ANCA ont été coincubées avec des CE microvasculaires, et leur profil a été étudié par TLDA puis validé par qPCR spécifique, tout comme pour les neutrophiles. Des résultats préliminaires (n=3) de ces expériences montrent un transfert du miR-142-3p, mais pas des miR-223 ni miR-451 (**Figure 22**). Ces résultats, à confirmer et compléter pour identifier d'autres miARNs transférés, permettent cependant de poser l'hypothèse que les VE de monocytes activés par les ANCA pourraient également participer aux lésions endothéliales observées au cours des VAA, et feront l'objet de travaux futurs menés par l'équipe.

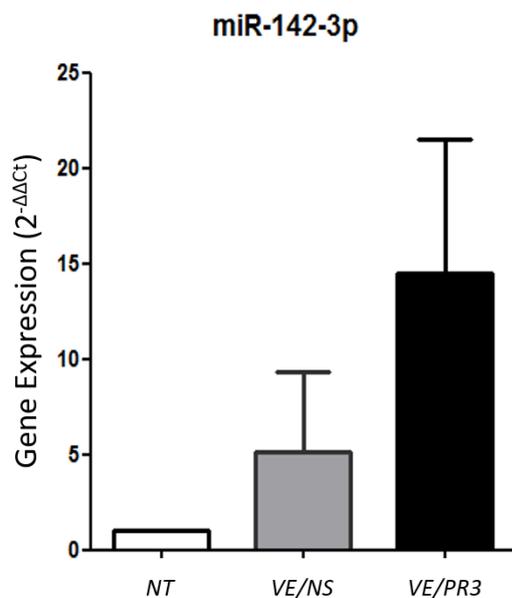


Figure 20 – Les VE de monocytes activés par des ANCA transfèrent le miR-142-3p aux CE

Des VE de monocytes non stimulés (VE/NS) ou activés par 2ng/mL de TNF α (15min) et 5 μ g/mL d'anti-PR3 (4h) (VE/PR3) ont été coincubées 24h avec des HDMEC, puis ces cellules ont été lysées et l'expression du miR-142-3p analysée par qPCR. Ces résultats ont été normalisés par rapport à la condition HDMEC non traitées (NT) et en utilisant le gène de référence RNU48 (n=3).

V – Implications pathologiques du transfert de miR-142-3p et miR-451 & perspectives thérapeutiques et diagnostiques

Comme illustré en introduction, les micro-ARNs peuvent être utilisés comme biomarqueurs ou comme cibles thérapeutiques dans de nombreux contextes pathologiques. Ainsi, ces travaux pourraient mener à des avancées dans le suivi et le traitement des VAA ou du lupus.

Concernant le versant diagnostique, nous avons cherché à identifier les miARN dérégulés dans les neutrophiles au cours des VAA, en utilisant le modèle d'activation des neutrophiles *in vitro* par des anti-PR3 monoclonaux décrit précédemment. Le profil en miARN de ces neutrophiles activés a été comparé avec des neutrophiles au repos par Taqman Low Density Array (TLDA), mettant en évidence 14 miARN potentiellement induits par les anti-PR3. Ces résultats ont été validés par des qPCR, et des résultats préliminaires nous ont permis de mettre en évidence une augmentation de la quantité de miR-449 dans les neutrophiles suite à une stimulation TNF α et anti-PR3 par rapport à des cellules au repos ou stimulées par du TNF α et une IgG contrôle. L'expression de ces miARN est en cours d'analyse dans des neutrophiles de patients prélevés au moment de la poussée initiale puis pendant la phase de rémission sous traitement, et l'analyse des neutrophiles de 10 premiers patients a permis de mettre en évidence une augmentation significative de l'expression du miR-449b lors des poussées par rapport aux rémission (**Figure 21**). Ces étapes de validation vont se poursuivre en augmentant le nombre de patients inclus, et seront complétées par des analyses du profil d'expression en miARN dans le plasma ou les urines de patients. Pour cela, nous avons mis en place une biocollection (NALVANCA) d'échantillons issus de patients VAA au cours de leur suivi, avec l'aide du service de médecine interne du CHU de Nantes (Pr Mohamed Hamidou et

Dr Antoine Néel). Elle est hébergée au sein du Centre de Ressources Biologiques (CRB) de Nantes, et inclut pour le moment 70 patients. Les patients sont prélevés au moment du diagnostic (poussée initiale), après le traitement d'induction (cyclophosphamide) et avant le traitement au Rituximab (phase de rémission à 3 mois), puis à 6, 12, 18 et 24 mois après traitement au Rituximab (traitement d'entretien), ainsi qu'à chaque nouvelle rechute éventuelle. Des échantillons de plasma, sérum, urines, PBMC, ainsi que des lysats de neutrophiles sont stockés. Cette biocollection nous permettra d'étudier les variations des profils en micro-ARNs de ces différents échantillons (neutrophiles, plasma, sérum, urine) en fonction du stade de la pathologie, et peut-être de mettre en évidence des marqueurs précoces de rémission/rechute ou de réponse aux traitements. A noter, des données préliminaires nous font penser que les miR-223, miR-142-3p et miR-451 sont présents en forte concentration dans le plasma, ce qui rendra difficile la mise en évidence d'une différence significative entre groupes de patients - si elle existe - à moins de constituer une cohorte de très grande taille. Ces collectes d'échantillons et analyses sont toujours en cours.

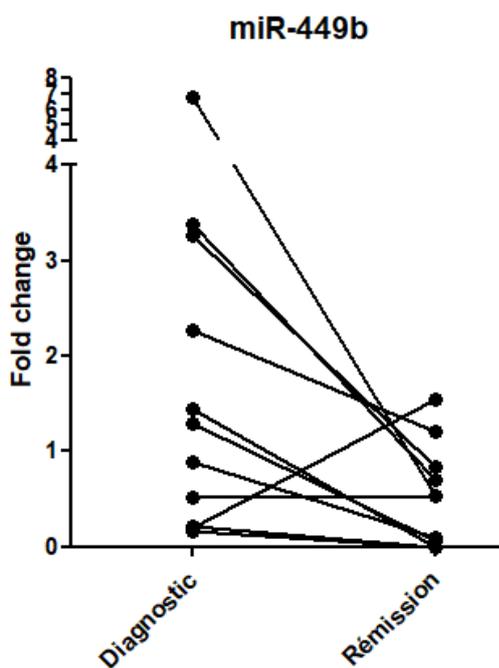


Figure 21 – Expression du miR-449b au sein de neutrophiles de patients au moment du diagnostic et de la rémission

L'expression du miR-449b a été étudiée par qPCR spécifique dans les neutrophiles de 10 patients VAA, et normalisée par rapport à l'expression du RNU48.

Enfin, une perspective à moyen terme de ces travaux serait de tester dans un modèle animal une inhibition thérapeutique des miR-142-3p et miR-451 spécifiquement dans les cellules endothéliales. Comme évoqué précédemment, ces miARN, et en particulier le miR-142-3p, régulent les fonctions des cellules immunitaires et en particulier la différenciation hématopoïétique (Lu et al., 2013). A l'inverse, les CE n'expriment pas ou peu ces micro-ARNs de façon basale, suggérant donc des méthodes d'adressage spécifiques en direction de l'endothélium. Cela permettrait d'éviter d'éventuels effets secondaires immuns d'une inhibition systémique de ces miARNs, qui ne devraient *a priori* pas survenir au sein des CE du fait de la quasi absence de ces molécules au repos.

Afin de tester *in vivo* l'inhibition de ces micro-ARNs, nous avons commencé à mettre en place un modèle murin de VAA (**Figure 23**). Le modèle classiquement utilisé consiste à injecter des ANCA anti-MPO (obtenus par l'immunisation de souris MPO^{-/-}) à des individus *wild type* (Xiao et al., 2002). La PR3 n'est pas exprimée à la membrane des neutrophiles de souris, qui ne possèdent pas la molécule NB1, qui permet sa translocation membranaire, comme évoqué en introduction (Pfister, 2004). Le seul modèle murin à ANCA anti-PR3 actuellement publié consiste à injecter des IgG purifiées à partir de plasmaphérèses de patients VAA à anti-PR3 à des souris NSG humanisées. Ces animaux développent une atteinte pulmonaire représentative des lésions humaines, mais une atteinte rénale modérée, potentiellement expliquée par les auteurs par une reconstitution myéloïde faible dans ce modèle (Little et al., 2012). Nous avons cherché à améliorer ce modèle en le reproduisant dans des souris NSG-SGM3, *knock-in* pour trois gènes humains (IL-3, GM-CSF, SCF), dont la reconstitution myéloïde est supérieure (Coughlan et al., 2016), afin d'y observer potentiellement des atteintes rénales plus marquées. Des souris NSG-SGM3 âgées de 6 semaines sont irradiées à 1.5 Gy et humanisées par injection de 50 000 cellules CD34+ humaines (Lonza) 5 heures plus tard, selon

le protocole de la plateforme Rongeurs Humanisés du Labex IGO à Nantes. Six semaines plus tard, les neutrophiles sont mobilisés dans la circulation et pré-activés par 0,25mg/kg de LPS en intrapéritonéal, puis activés par 4mg d'IgG de patients. La reconstitution en cellules humaines ainsi que le phénotype de ces cellules est étudié par cytométrie en flux une fois par semaine par prélèvement sanguin, et la fonction rénale suivie quotidiennement par des bandelettes urinaires (protéinurie, hématurie). Les souris sont sacrifiées 7 jours après injection, la reconstitution en cellules humaines et leur phénotype est analysé dans le sang et la moelle osseuse, et leurs organes (poumons, reins) sont prélevés pour analyse histologique. Ce modèle nécessite d'être perfectionné, notamment en raison de la toxicité hépatique du LPS qui cause une mortalité avant J7 post-injection. Une première série d'expérience nous a permis d'établir une dose de 0,25mg/kg de LPS comme permettant une survie de 100% des individus à J7, et une mobilisation des neutrophiles, représentant 1 à 5% des CD45 humaines dans la circulation. Nous avons pu observer une tendance à l'augmentation de la protéinurie et de l'hématurie de ces souris suite à l'injection de LPS + IgG de patients (n=4, **Figure 22**), mais ces résultats sont à confirmer en comparant avec des souris traitées par LPS + IgG de volontaires sains. D'autre part, l'étude histologique des tissus de ces souris est en cours.

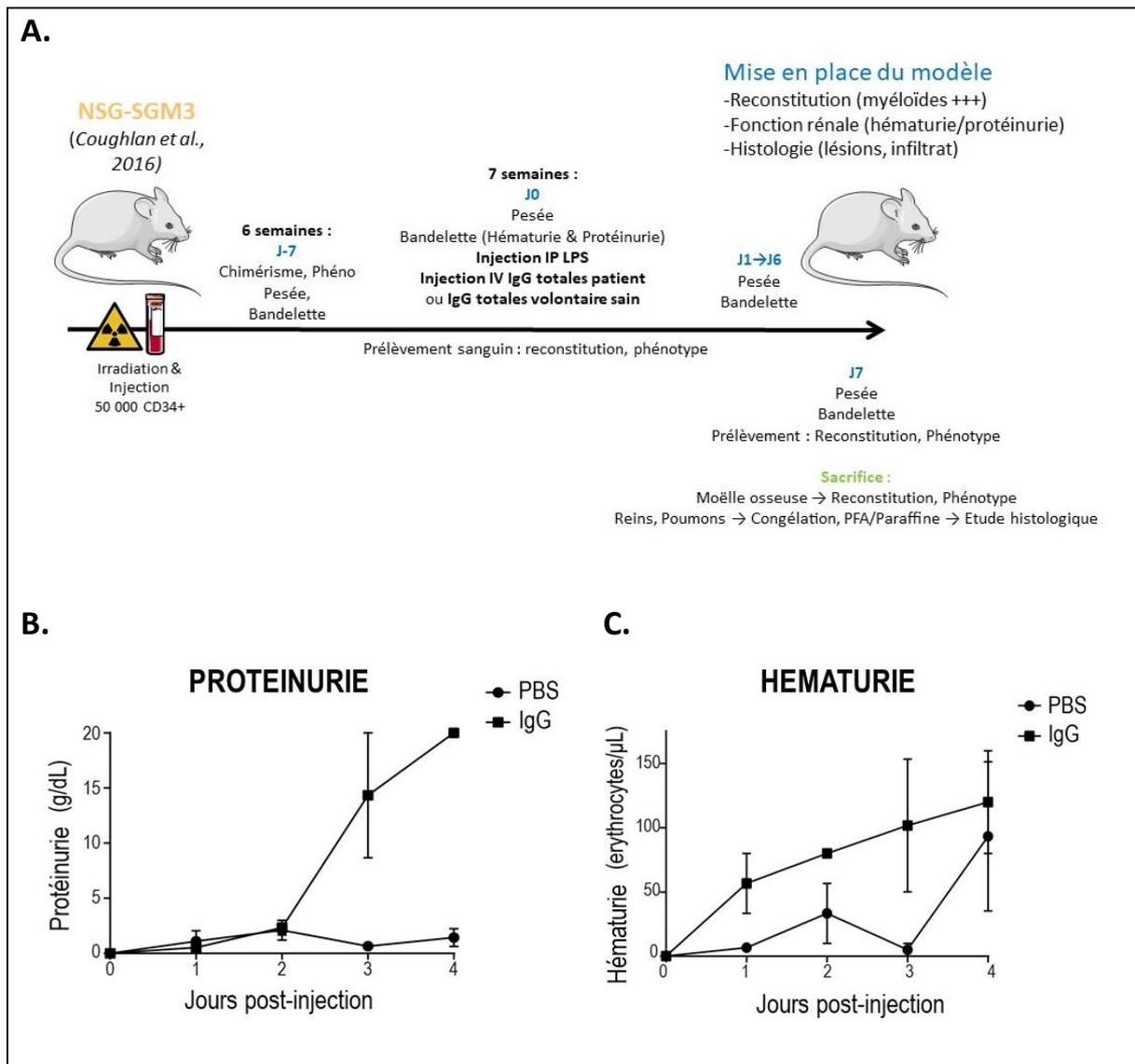


Figure 22 – Modèle de VAA à anti-PR3 chez la souris humanisées NSG-SGM3

A. Modèle murin utilisé. Les souris NSG-SGM3 sont irradiées (1,5 Gy) et reconstituées à l'aide de 50 000 cellules CD35+ humaines. Une prise de sang permet de vérifier de façon hebdomadaire cette reconstitution (chimérisme : %CD45 humaines/CD45 totales murines + humaines) ainsi que le phénotype de ces cellules (lymphocytes T, B, monocytes, neutrophiles, NK). Les neutrophiles sont primés par 0,25mg/kg de LPS en intrapéritonéal, puis activés par 4mg d'IgG de patients 6 semaines après humanisation. La fonction rénale est suivie par bandelettes urinaires (protéinurie, hématurie), et les souris sont sacrifiées à J7 afin d'analyser les lésions histologiques (reins, poumons).

B. et C. Protéinurie en g/dL (B) et Hématurie en nombre d'érythrocytes/μL (C) estimées à l'aide de bandelettes urinaires au cours du suivi de ces souris traitées par des IgG de patients (IgG) ou injectées avec un volume équivalent de PBS (n=4).

Ce modèle nous permettra tout d'abord d'analyser la présence de nos micro-ARNs d'intérêt dans les tissus lésés par hybridation *in situ* afin de valider nos résultats obtenus *in vitro*. Plus tard, ils nous permettront de tester l'efficacité d'un ciblage thérapeutique de ces micro-ARN dans les VAA en injectant des antagomiR directement dans la circulation ou au sein de nanoparticules polymériques dirigées spécifiquement contre les CE activées, qui expriment en surface des marqueurs d'activation comme CD31 ou la E-sélectine. L'efficacité de ces stratégies est étudiée dans différents contextes, et différents systèmes (liposomes, nanoparticules...) ciblant la E-sélectine en surface ont été développés (Jubeli et al., 2012), et un système équivalent pourrait être utilisé pour délivrer spécifiquement des inhibiteurs de nos miARN aux CE activées. Enfin, si ces données se révèlent prometteuses, elles pourraient dans un futur plus distant être appliquées à l'Homme.

On peut en effet imaginer à long terme prédire les rechutes des VAA de façon peu ou non invasive (prise de sang, urines) grâce au profil en miARN du plasma, des neutrophiles circulants ou des urines. Des inhibiteurs des miR-142-3p et miR-451 pourraient être injectés aux patients au sein de vésicules synthétiques dirigées spécifiquement contre les CE microvasculaires activées, en complément des traitements actuels, en vue de minimiser l'impact du transfert de ces miARN sur la mort cellulaire, la réparation endothéliale et la mise en place d'un environnement pro-inflammatoire.

CONCLUSION

Pour conclure ces travaux, nous proposons le modèle physiopathologique suivant (**Figure 23**), enrichi de notre description du transfert de micro-ARN et de son impact supposé sur la pathogénèse des VAA.

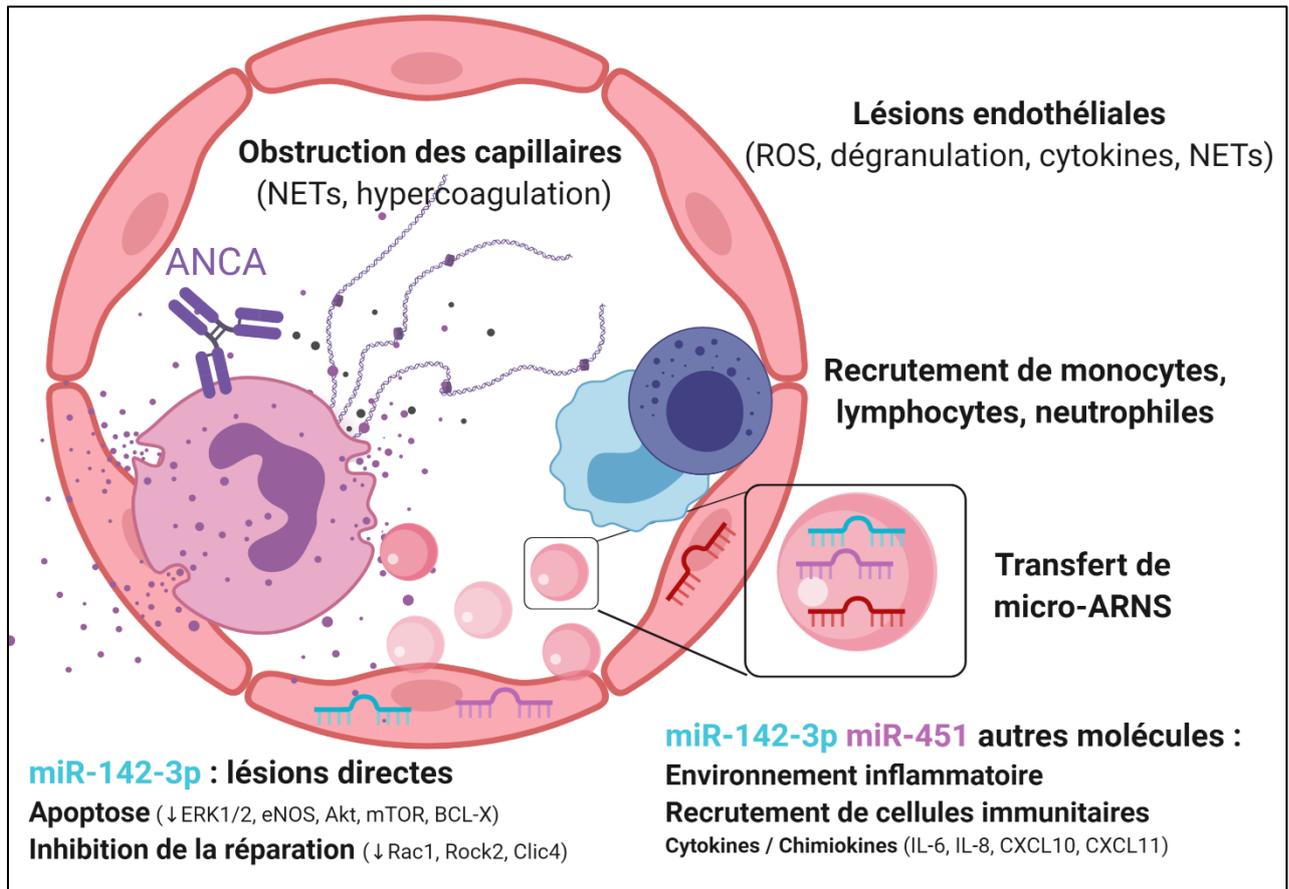


Figure 23 – Modèle physiopathologique proposé

Les neutrophiles activés par les ANCA induisent des lésions endothéliales via différents mécanismes (dégranulation, relargage de ROS, de NETs), mais également en produisant des VE capables de transférer le miR-223, le miR-451 et le miR-142-3p aux cellules endothéliales microvasculaires. Ce dernier dérégule des voies cruciales pour la survie des CE et à leurs capacités réparatrices, aggravant ces lésions. Le transfert des miR-142-3p et miR-451, ainsi que d'autres composants biologiquement actifs des VE induisent la production par les CE de cytokines et chimiokines participant à mettre en place un environnement pro-inflammatoire,

permettant le recrutement d'effecteurs et facilitant leur infiltration (lymphocytes, monocytes, autres neutrophiles recrutés et activés au sein d'une boucle pro-inflammatoire délétère...). Ces mécanismes sont dramatiquement accentués par l'accumulation massive de cellules dans des capillaires de diamètre très faible, facilités par une coagulation excessive et une production de NETs importante, qui pourrait par ailleurs faciliter l'internalisation des VE par les CE.

Ce mécanisme, décrit pour la première fois au cours de nos travaux, pourrait faire l'objet d'une intervention thérapeutique, consistant à injecter aux patients des inhibiteurs des miR-142-3p et miR-451 au sein de vésicules artificielles dirigées spécifiquement contre les CE activées. Cette stratégie, utilisée en complément des traitements actuels, pourrait contribuer à diminuer les lésions, notamment rénales et pulmonaires observées chez les patients VAA, mais également lupiques.

REFERENCES

- Aasarød, K., Iversen, B.M., Hammerstrøm, J., Bostad, L., and Jørstad, S. (2002). Clinical Outcome of Patients with Wegener's Granulomatosis Treated with Plasma Exchange. *Blood Purif.* *20*, 167–173.
- Abdulahad, W.H., van der Geld, Y.M., Stegeman, C.A., and Kallenberg, C.G.M. (2006). Persistent expansion of CD4+ effector memory T cells in Wegener's granulomatosis. *Kidney Int.* *70*, 938–947.
- Abdulahad, W.H., Stegeman, C.A., Limburg, P.C., and Kallenberg, C.G.M. (2008). Skewed distribution of Th17 lymphocytes in patients with Wegener's granulomatosis in remission. *Arthritis Rheum.* *58*, 2196–2205.
- Admyre, C., Johansson, S.M., Qazi, K.R., Filén, J.-J., Lahesmaa, R., Norman, M., Neve, E.P.A., Scheynius, A., and Gabrielsson, S. (2007). Exosomes with Immune Modulatory Features Are Present in Human Breast Milk. *J. Immunol.* *179*, 1969–1978.
- Agrawal, N., Dasaradhi, P.V.N., Mohmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R.K., and Mukherjee, S.K. (2003). RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *67*, 657–685.
- Aitoufella, H., Maury, E., Guidet, B., and Offenstadt, G. (2008). L'endothélium : un nouvel organe. *Réanimation* *17*, 126–136.
- Akers, J.C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B.S., and Chen, C.C. (2013). Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J. Neurooncol.* *113*, 1–11.
- Alarcón, C.R., Lee, H., Goodarzi, H., Halberg, N., and Tavazoie, S.F. (2015). N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. *Nature* *519*, 482–485.
- Alexy, T., Rooney, K., Weber, M., Gray, W.D., and Searles, C.D. (2014). TNF- α alters the release and transfer of microparticle-encapsulated miRNAs from endothelial cells. *Physiol. Genomics* *46*, 833–840.
- Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakhali, S., and Wood, M.J.A. (2011). Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat. Biotechnol.* *29*, 341–345.
- André, F., Chaput, N., Scharz, N.E.C., Flament, C., Aubert, N., Bernard, J., Lemonnier, F., Raposo, G., Escudier, B., Hsu, D.-H., et al. (2004). Exosomes as Potent Cell-Free Peptide-Based Vaccine. I. Dendritic Cell-Derived Exosomes Transfer Functional MHC Class I/Peptide Complexes to Dendritic Cells. *J. Immunol.* *172*, 2126–2136.
- André-Grégoire, G., and Gavard, J. (2017). Spitting out the demons: Extracellular vesicles in glioblastoma. *Cell Adhes. Migr.* *11*, 164–172.
- Aries, P.M. (2005). Lack of efficacy of rituximab in Wegener's granulomatosis with refractory granulomatous manifestations. *Ann. Rheum. Dis.* *65*, 853–858.
- Babst, M. (2011). MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between. *Curr. Opin. Cell Biol.* *23*, 452–457.

van Balkom, B.W.M., de Jong, O.G., Smits, M., Brummelman, J., den Ouden, K., de Bree, P.M., van Eijndhoven, M.A.J., Pegtel, D.M., Stoorvogel, W., Würdinger, T., et al. (2013). Endothelial cells require miR-214 to secrete exosomes that suppress senescence and induce angiogenesis in human and mouse endothelial cells. *Blood* *121*, 3997–4006.

Banizs, A.B., Huang, T., Nakamoto, R.K., Shi, W., and He, J. (2018). Endocytosis Pathways of Endothelial Cell Derived Exosomes. *Mol. Pharm.* *15*, 5585–5590.

Bansal, P.J., and Tobin, M.C. (2004). Neonatal microscopic polyangiitis secondary to transfer of maternal myeloperoxidase–antineutrophil cytoplasmic antibody resulting in neonatal pulmonary hemorrhage and renal involvement. *Ann. Allergy. Asthma. Immunol.* *93*, 398–401.

Bao, H., Yao, Q.-P., Huang, K., Chen, X.-H., Han, Y., Jiang, Z.-L., Gao, L.-Z., and Qi, Y.-X. (2017). Platelet-derived miR-142-3p induces apoptosis of endothelial cells in hypertension. *Cell. Mol. Biol.* *63*, 3.

Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs. *Cell* *116*, 281–297.

Begovich, A.B., Carlton, V.E.H., Honigberg, L.A., Schrodi, S.J., Chokkalingam, A.P., Alexander, H.C., Ardlie, K.G., Huang, Q., Smith, A.M., Spoerke, J.M., et al. (2004). A Missense Single-Nucleotide Polymorphism in a Gene Encoding a Protein Tyrosine Phosphatase (PTPN22) Is Associated with Rheumatoid Arthritis. *Am. J. Hum. Genet.* *75*, 330–337.

Bergsmedh, A., Szeles, A., Henriksson, M., Bratt, A., Folkman, M.J., Spetz, A.-L., and Holmgren, L. (2001). Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 6407–6411.

Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* *409*, 363–366.

Blanchard, N., Lankar, D., Faure, F., Regnault, A., Dumont, C., Raposo, G., and Hivroz, C. (2002). TCR Activation of Human T Cells Induces the Production of Exosomes Bearing the TCR/CD3/ζ Complex. *J. Immunol.* *168*, 3235–3241.

Bohman, S., Matsumoto, T., Suh, K., Dimberg, A., Jakobsson, L., Yuspa, S., and Claesson-Welsh, L. (2005). Proteomic Analysis of Vascular Endothelial Growth Factor-induced Endothelial Cell Differentiation Reveals a Role for Chloride Intracellular Channel 4 (CLIC4) in Tubular Morphogenesis. *J. Biol. Chem.* *280*, 42397–42404.

Boilard, E. (2018). Extracellular vesicles and their content in bioactive lipid mediators: more than a sack of microRNA. *J. Lipid Res.* *59*, 2037–2046.

Börger, V., Weiss, D.J., Anderson, J.D., Borràs, F.E., Bussolati, B., Carter, D.R.F., Dominici, M., Falcón-Pérez, J.M., Gimona, M., Hill, A.F., et al. (2020). International Society for Extracellular Vesicles and International Society for Cell and Gene Therapy statement on extracellular vesicles from mesenchymal stromal cells and other cells: considerations for potential therapeutic agents to suppress coronavirus disease-19. *Cytotherapy* *22*, 482–485.

Brachemi, S., Mambole, A., Fakhouri, F., Mouthon, L., Guillevin, L., Lesavre, P., and Halbwachs-Mecarelli, L. (2007). Increased Membrane Expression of Proteinase 3 during Neutrophil Adhesion in the Presence of Anti-Proteinase 3 Antibodies. *J. Am. Soc. Nephrol.* *18*, 2330–2339.

- Braun, J.E., Truffault, V., Boland, A., Huntzinger, E., Chang, C.-T., Haas, G., Weichenrieder, O., Coles, M., and Izaurralde, E. (2012). A direct interaction between DCP1 and XRN1 couples mRNA decapping to 5' exonucleolytic degradation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 1324–1331.
- Brennecke, J., Hipfner, D.R., Stark, A., Russell, R.B., and Cohen, S.M. (2003). bantam Encodes a Developmentally Regulated microRNA that Controls Cell Proliferation and Regulates the Proapoptotic Gene hid in *Drosophila*. *Cell* *113*, 25–36.
- Bronisz, A., Wang, Y., Nowicki, M.O., Peruzzi, P., Ansari, K., Ogawa, D., Balaj, L., De Rienzo, G., Mineo, M., Nakano, I., et al. (2014). Extracellular vesicles modulate the glioblastoma microenvironment via a tumor suppression signaling network directed by miR-1. *Cancer Res.* *74*, 738–750.
- Brooks, C.J., King, W.J., Radford, D.J., Adu, D., McGRATH, M., and Savage, C.O.S. (1996). IL-1beta production by human polymorphonuclear leucocytes stimulated by anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies: relevance to systemic vasculitis. *Clin. Exp. Immunol.* *106*, 273–279.
- Brouwer, E., Huitema, M.G., Klok, P.A., de Weerd, H., Tervaert, J.W., Weening, J.J., and Kallenberg, C.G. (1993). Antimyeloperoxidase-associated proliferative glomerulonephritis: an animal model. *J. Exp. Med.* *177*, 905–914.
- Brunini, F., Page, T.H., Gallieni, M., and Pusey, C.D. (2016). The role of monocytes in ANCA-associated vasculitides. *Autoimmun. Rev.* *15*, 1046–1053.
- Buck, A.H., Coakley, G., Simbari, F., McSorley, H.J., Quintana, J.F., Le Bihan, T., Kumar, S., Abreu-Goodger, C., Lear, M., Harcus, Y., et al. (2014). Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cells and modulate innate immunity. *Nat. Commun.* *5*, 5488.
- Bulotta, S., Barsacchi, R., Rotiroti, D., Borgese, N., and Clementi, E. (2001). Activation of the Endothelial Nitric-oxide Synthase by Tumor Necrosis Factor- α : A NOVEL FEEDBACK MECHANISM REGULATING CELL DEATH. *J. Biol. Chem.* *276*, 6529–6536.
- Cai, H., Reinisch, K., and Ferro-Novick, S. (2007). Coats, Tethers, Rabs, and SNAREs Work Together to Mediate the Intracellular Destination of a Transport Vesicle. *Dev. Cell* *12*, 671–682.
- Cantaluppi, V., Gatti, S., Medica, D., Figliolini, F., Bruno, S., Deregibus, M.C., Sordi, A., Biancone, L., Tetta, C., and Camussi, G. (2012). Microvesicles derived from endothelial progenitor cells protect the kidney from ischemia–reperfusion injury by microRNA-dependent reprogramming of resident renal cells. *Kidney Int.* *82*, 412–427.
- Carlsson, L., Nilsson, O., Larsson, A., Stridsberg, M., Sahlén, G., and Ronquist, G. (2003). Characteristics of human prostasomes isolated from three different sources: Human Prostasome Characteristics. *The Prostate* *54*, 322–330.
- Casselmann, B.L., Kilgore, K.S., Miller, B.F., and Warren, J.S. (1995). Antibodies to neutrophil cytoplasmic antigens induce monocyte chemoattractant protein-1 secretion from human monocytes. *J. Lab. Clin. Med.* *126*, 495–502.
- Cereghetti, D., and Lee, P. (2014). Tumor-Derived Exosomes Contain microRNAs with Immunological Function: Implications for a Novel Immunosuppression Mechanism. *MicroRNA* *2*, 194–204.
- Chan, J.A., Krichevsky, A.M., and Kosik, K.S. (2005). MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res.* *65*, 6029–6033.

- Charles, L.A., Caldas, M.L.R., Falk, R.J., Terrell, R.S., and Jennette, J.C. (1991). Antibodies Against Granule Proteins Activate Neutrophils In Vitro. *J. Leukoc. Biol.* *50*, 539–546.
- Chen, C.-Z. (2004). MicroRNAs Modulate Hematopoietic Lineage Differentiation. *Science* *303*, 83–86.
- Chen, L., Hou, X., Zhang, M., Zheng, Y., Zheng, X., Yang, Q., Li, J., Gu, N., Zhang, M., Sun, Y., et al. (2020). MicroRNA-223-3p modulates dendritic cell function and ameliorates experimental autoimmune myocarditis by targeting the NLRP3 inflammasome. *Mol. Immunol.* *117*, 73–83.
- Choi, H.K., Lamprecht, P., Niles, J.L., Gross, W.L., and Merkel, P.A. (2000). Subacute bacterial endocarditis with positive cytoplasmic antineutrophil cytoplasmic antibodies and anti-proteinase 3 antibodies. *Arthritis Rheum.* *43*, 226–231.
- Churg, J., and Strauss, L. (1951). Allergic granulomatosis, allergic angiitis, and periarteritis nodosa. *Am. J. Pathol.* *27*, 277–301.
- Ciavatta, D.J., Yang, J., Preston, G.A., Badhwar, A.K., Xiao, H., Hewins, P., Nester, C.M., Pendergraft, W.F., Magnuson, T.R., Jennette, J.C., et al. (2010). Epigenetic basis for aberrant upregulation of autoantigen genes in humans with ANCA vasculitis. *J. Clin. Invest.* *120*, 3209–3219.
- Cicero, A.L., Delevoye, C., Gilles-Marsens, F., Loew, D., Dingli, F., Guéré, C., André, N., Vié, K., van Niel, G., and Raposo, G. (2015). Exosomes released by keratinocytes modulate melanocyte pigmentation. *Nat. Commun.* *6*, 7506.
- Clayton, A., Harris, C.L., Court, J., Mason, M.D., and Morgan, B.P. (2003). Antigen-presenting cell exosomes are protected from complement-mediated lysis by expression of CD55 and CD59. *Eur. J. Immunol.* *33*, 522–531.
- Clayton, A., Turkes, A., Dewitt, S., Steadman, R., Mason, M.D., and Hallett, M.B. (2004). Adhesion and signaling by B cell-derived exosomes: the role of integrins. *FASEB J.* *18*, 977–979.
- Coakley, G., McCaskill, J.L., Borger, J.G., Simbari, F., Robertson, E., Millar, M., Harcus, Y., McSorley, H.J., Maizels, R.M., and Buck, A.H. (2017). Extracellular Vesicles from a Helminth Parasite Suppress Macrophage Activation and Constitute an Effective Vaccine for Protective Immunity. *Cell Rep.* *19*, 1545–1557.
- Cockwell, P., Brooks, C.J., Adu, D., and Savage, C.O.S. (1999). Interleukin-8: A pathogenetic role in antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis. *Kidney Int.* *55*, 852–863.
- Cocucci, E., and Meldolesi, J. (2015). Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends Cell Biol.* *25*, 364–372.
- Coleman, M.L., Sahai, E.A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A., and Olson, M.F. (2001). Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat. Cell Biol.* *3*, 339–345.
- Comarmond, C., Pagnoux, C., Khellaf, M., Cordier, J.-F., Hamidou, M., Viallard, J.-F., Maurier, F., Jouneau, S., Bienvenu, B., Puéchal, X., et al. (2013). Eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (Churg-Strauss): Clinical characteristics and long-term followup of the 383 patients enrolled in the French Vasculitis Study Group cohort. *Arthritis Rheum.* *65*, 270–281.

- Cook, J., Bennett, P.R., Kim, S.H., Teoh, T.G., Sykes, L., Kindinger, L.M., Garrett, A., Binkhamis, R., MacIntyre, D.A., and Terzidou, V. (2019). First Trimester Circulating MicroRNA Biomarkers Predictive of Subsequent Preterm Delivery and Cervical Shortening. *Sci. Rep.* *9*, 5861.
- Corcoran, C., Rani, S., O'Brien, K., O'Neill, A., Prencipe, M., Sheikh, R., Webb, G., McDermott, R., Watson, W., Crown, J., et al. (2012). Docetaxel-Resistance in Prostate Cancer: Evaluating Associated Phenotypic Changes and Potential for Resistance Transfer via Exosomes. *PLoS ONE* *7*, e50999.
- Cortazar, F.B., Muhsin, S.A., Pendergraft, W.F., Wallace, Z.S., Dunbar, C., Laliberte, K., and Niles, J.L. (2018). Combination Therapy With Rituximab and Cyclophosphamide for Remission Induction in ANCA Vasculitis. *Kidney Int. Rep.* *3*, 394–402.
- Costa-Silva, B., Aiello, N.M., Ocean, A.J., Singh, S., Zhang, H., Thakur, B.K., Becker, A., Hoshino, A., Mark, M.T., Molina, H., et al. (2015). Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat. Cell Biol.* *17*, 816–826.
- Coughlan, A.M., Harmon, C., Whelan, S., O'Brien, E.C., O'Reilly, V.P., Crotty, P., Kelly, P., Ryan, M., Hickey, F.B., O'Farrelly, C., et al. (2016). Myeloid Engraftment in Humanized Mice: Impact of Granulocyte-Colony Stimulating Factor Treatment and Transgenic Mouse Strain. *Stem Cells Dev.* *25*, 530–541.
- Coulomb-L'Hermine, A., Capron, F., Zou, W., Piard, F., Galateau, F., Laurent, P., Crevon, M.-C., Galanaud, P., and Emilie, D. (2001). Expression of the chemokine RANTES in pulmonary Wegener's granulomatosis. *Hum. Pathol.* *32*, 320–326.
- Csernok, E., Ernst, M., Schmitt, W., Bainton, D.F., and Gross, W.L. (1994). Activated neutrophils express proteinase 3 on their plasma membrane in vitro and in vivo. *Clin. Exp. Immunol.* *95*, 244–250.
- Csernok, E., Ai, M., Gross, W.L., Wicklein, D., Petersen, A., Lindner, B., Lamprecht, P., Holle, J.U., and Hellmich, B. (2006). Wegener autoantigen induces maturation of dendritic cells and licenses them for Th1 priming via the protease-activated receptor-2 pathway. *Blood* *107*, 4440–4448.
- Csernok, E., Moosig, F., and Gross, W.L. (2008a). Pathways to ANCA Production: From Differentiation of Dendritic Cells by Proteinase 3 to B Lymphocyte Maturation in Wegener's Granuloma. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* *34*, 300–306.
- Csernok, E., Ernst, M., Schmitt, W., Bainton, D.F., and Gross, W.L. (2008b). Activated neutrophils express proteinase 3 on their plasma membrane in vitro and in vivo. *Clin. Exp. Immunol.* *95*, 244–250.
- Cunningham, M.A., Huang, X.R., Dowling, J.P., Tipping, P.G., and Holdsworth, S.R. (1999). Prominence of cell-mediated immunity effectors in "pauci-immune" glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* *JASN* *10*, 499–506.
- Dai, G., Yao, X., Zhang, Y., Gu, J., Geng, Y., Xue, F., and Zhang, J. (2018). Colorectal cancer cell-derived exosomes containing miR-10b regulate fibroblast cells via the PI3K/Akt pathway. *Bull. Cancer (Paris)* *105*, 336–349.
- Dalli, J., Montero-Melendez, T., Norling, L.V., Yin, X., Hinds, C., Haskard, D., Mayr, M., and Perretti, M. (2013). Heterogeneity in Neutrophil Microparticles Reveals Distinct Proteome and Functional Properties. *Mol. Cell. Proteomics* *12*, 2205–2219.

- Daniel, L., Fakhouri, F., Joly, D., Mouthon, L., Nusbaum, P., Grunfeld, J.-P., Schifferli, J., Guillevin, L., Lesavre, P., and Halbwachs-Mecarelli, L. (2006). Increase of circulating neutrophil and platelet microparticles during acute vasculitis and hemodialysis. *Kidney Int.* *69*, 1416–1423.
- Dehkordi, K.A., Chaleshtori, M.H., Sharifi, M., Jalili, A., Fathi, F., Roshani, D., Nikkhoo, B., Hakhamaneshi, M.S., Sani, M.R.M., and Ganji-Arjenaki, M. (2017). Inhibition of MicroRNA miR-222 with LNA Inhibitor Can Reduce Cell Proliferation in B Chronic Lymphoblastic Leukemia. *Indian J. Hematol. Blood Transfus.* *33*, 327–332.
- Delorme-Axford, E., Donker, R.B., Mouillet, J.-F., Chu, T., Bayer, A., Ouyang, Y., Wang, T., Stolz, D.B., Sarkar, S.N., Morelli, A.E., et al. (2013). Human placental trophoblasts confer viral resistance to recipient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 12048–12053.
- Denzer, K., van Eijk, M., Kleijmeer, M.J., Jakobson, E., de Groot, C., and J. Geuze, H. (2000). Follicular Dendritic Cells Carry MHC Class II-Expressing Microvesicles at Their Surface. *J. Immunol.* *165*, 1259–1265.
- Dharap, A., Pokrzywa, C., Murali, S., Pandi, G., and Vemuganti, R. (2013). MicroRNA miR-324-3p Induces Promoter-Mediated Expression of RelA Gene. *PLoS ONE* *8*, e79467.
- Dijstelbloem, H.M., Scheepers, R.H., Oost, W.W., Stegeman, C.A., van der Pol, W.L., Sluiter, W.J., Kallenberg, C.G., van de Winkel, J.G., and Tervaert, J.W. (1999). Fcγ receptor polymorphisms in Wegener's granulomatosis: risk factors for disease relapse. *Arthritis Rheum.* *42*, 1823–1827.
- Disteldorf, E.M., Krebs, C.F., Paust, H.-J., Turner, J.-E., Nouailles, G., Tittel, A., Meyer-Schwesinger, C., Stege, G., Brix, S., Velden, J., et al. (2015). CXCL5 Drives Neutrophil Recruitment in T_H 17-Mediated GN. *J. Am. Soc. Nephrol.* *26*, 55–66.
- Dores, M.R., Chen, B., Lin, H., Soh, U.J.K., Paing, M.M., Montagne, W.A., Meerloo, T., and Trejo, J. (2012). ALIX binds a YPX3L motif of the GPCR PAR1 and mediates ubiquitin-independent ESCRT-III/MVB sorting. *J. Cell Biol.* *197*, 407–419.
- Dreux, M., Garaigorta, U., Boyd, B., Décembre, E., Chung, J., Whitten-Bauer, C., Wieland, S., and Chisari, F.V. (2012). Short-Range Exosomal Transfer of Viral RNA from Infected Cells to Plasmacytoid Dendritic Cells Triggers Innate Immunity. *Cell Host Microbe* *12*, 558–570.
- Du, C., Liu, C., Kang, J., Zhao, G., Ye, Z., Huang, S., Li, Z., Wu, Z., and Pei, G. (2009). MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. *Nat. Immunol.* *10*, 1252–1259.
- Ebert, M.S., and Sharp, P.A. (2010). MicroRNA sponges: progress and possibilities. *RNA N. Y.* *N 16*, 2043–2050.
- Eken, C., Gasser, O., Zenhausern, G., Oehri, I., Hess, C., and Schifferli, J.A. (2008). Polymorphonuclear Neutrophil-Derived Ectosomes Interfere with the Maturation of Monocyte-Derived Dendritic Cells. *J. Immunol.* *180*, 817–824.
- Elfimova, N., Schlattjan, M., Sowa, J.-P., Dienes, H.P., Canbay, A., and Odenthal, M. (2012). Circulating microRNAs: promising candidates serving as novel biomarkers of acute hepatitis. *Front. Physiol.* *3*.
- van Engeland, M., Nieland, L.J., Ramaekers, F.C., Schutte, B., and Reutelingsperger, C.P. (1998). Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* *31*, 1–9.

- Eriksson, P. (2005). Nine patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody-positive vasculitis successfully treated with rituximab. *J. Intern. Med.* 257, 540–548.
- Erwig, L.-P., and Henson, P.M. (2008). Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ.* 15, 243–250.
- Escola, J.-M., Kleijmeer, M.J., Stoorvogel, W., Griffith, J.M., Yoshie, O., and Geuze, H.J. (1998). Selective Enrichment of Tetraspan Proteins on the Internal Vesicles of Multivesicular Endosomes and on Exosomes Secreted by Human B-lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 273, 20121–20127.
- Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., and Henson, P.M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 148, 2207–2216.
- Falk, R.J., and Jennette, J.C. (1988). Anti-Neutrophil Cytoplasmic Autoantibodies with Specificity for Myeloperoxidase in Patients with Systemic Vasculitis and Idiopathic Necrotizing and Crescentic Glomerulonephritis. *N. Engl. J. Med.* 318, 1651–1657.
- Falk, R.J., Terrell, R.S., Charles, L.A., and Jennette, J.C. (1990). Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 4115–4119.
- Fang, Y., Wu, N., Gan, X., Yan, W., Morrell, J.C., and Gould, S.J. (2007). Higher-Order Oligomerization Targets Plasma Membrane Proteins and HIV Gag to Exosomes. *PLoS Biol.* 5, e158.
- Février, B., and Raposo, G. (2004). Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 415–421.
- Fevrier, B., Vilette, D., Archer, F., Loew, D., Faigle, W., Vidal, M., Laude, H., and Raposo, G. (2004). Cells release prions in association with exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 9683–9688.
- Fisher, R.D., Chung, H.-Y., Zhai, Q., Robinson, H., Sundquist, W.I., and Hill, C.P. (2007). Structural and Biochemical Studies of ALIX/AIP1 and Its Role in Retrovirus Budding. *Cell* 128, 841–852.
- Flint, S.M., and Savage, C.O.S. (2012). Anti-LAMP-2 Autoantibodies in ANCA-Associated Pauci-Immune Glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 23, 378–380.
- Forman, J.J., Legesse-Miller, A., and Coller, H.A. (2008). A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 14879–14884.
- Franssen, C.F., Huitema, M.G., Muller Kobold, A.C., Oost-Kort, W.W., Limburg, P.C., Tiebosch, A., Stegeman, C.A., Kallenberg, C.G., and Tervaert, J.W. (1999). In vitro neutrophil activation by antibodies to proteinase 3 and myeloperoxidase from patients with crescentic glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 10, 1506–1515.
- Franssen, C.F.M., Stegeman, C.A., Kallenberg, C.G.M., Gans, R.O.B., De Jong, P.E., Hoorntje, S.J., and Tervaert, J.W.C. (2000). Antiproteinase 3- and antimyeloperoxidase-associated vasculitis. *Kidney Int.* 57, 2195–2206.
- Frasca, G.M., Zoumparidis, N.G., Borgnino, L.C., Neri, L., Vangelista, A., and Bonomini, V. (1992). Plasma Exchange Treatment in Rapidly Progressive Glomerulonephritis Associated with Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibodies. *Int. J. Artif. Organs* 15, 181–184.

- Frasca, G.M., Soverini, M.L., Falaschini, A., Tampieri, E., Vangelista, A., and Stefoni, S. (2003). Plasma Exchange Treatment Improves Prognosis of Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-associated Crescentic Glomerulonephritis: A Case-Control Study in 26 Patients from a Single Center. *Ther. Apher. Dial.* *7*, 540–546.
- Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* *19*, 92–105.
- Fries, J.F., Hunder, G.G., Bloch, D.A., Michel, B.A., Arend, W.P., Calabrese, L.H., Fauci, A.S., Leavitt, R.Y., Lie, J.T., Lightfoot, R.W., et al. (2010). The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of vasculitis: Summary. *Arthritis Rheum.* *33*, 1135–1136.
- Frühbeis, C., Fröhlich, D., Kuo, W.P., and Krämer-Albers, E.-M. (2013). Extracellular vesicles as mediators of neuron-glia communication. *Front. Cell. Neurosci.* *7*.
- Fujita, Y., Araya, J., Ito, S., Kobayashi, K., Kosaka, N., Yoshioka, Y., Kadota, T., Hara, H., Kuwano, K., and Ochiya, T. (2015). Suppression of autophagy by extracellular vesicles promotes myofibroblast differentiation in COPD pathogenesis. *J. Extracell. Vesicles* *4*, 28388.
- Futter, C.E., Pearse, A., Hewlett, L.J., and Hopkins, C.R. (1996). Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes. *J. Cell Biol.* *132*, 1011–1023.
- Gayraud, M., Guillevin, L., le Toumelin, P., Cohen, P., Lhote, F., Casassus, P., Jarrousse, B., and French Vasculitis Study Group (2001). Long-term followup of polyarteritis nodosa, microscopic polyangiitis, and Churg-Strauss syndrome: analysis of four prospective trials including 278 patients. *Arthritis Rheum.* *44*, 666–675.
- Gilligan, H.M., Bredy, B., Brady, H.R., Hébert, M.-J., Slayter, H.S., Xu, Y., Rauch, J., Shia, M.A., Koh, J.S., and Levine, J.S. (1996). Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibodies Interact with Primary Granule Constituents on the Surface of Apoptotic Neutrophils in the Absence of Neutrophil Priming. *J. Exp. Med.* *184*, 2231–2242.
- Glover, A.R., Zhao, J.T., Gill, A.J., Weiss, J., Mugridge, N., Kim, E., Feeney, A.L., Ip, J.C., Reid, G., Clarke, S., et al. (2015). microRNA-7 as a tumor suppressor and novel therapeutic for adrenocortical carcinoma. *Oncotarget* *6*, 36675–36688.
- Golden, T.A., Schauer, S.E., Lang, J.D., Pien, S., Mushegian, A.R., Grossniklaus, U., Meinke, D.W., and Ray, A. (2002). *Short Integuments1/suspensor1/carpel Factory*, a Dicer Homolog, Is a Maternal Effect Gene Required for Embryo Development in Arabidopsis. *Plant Physiol.* *130*, 808–822.
- Gomez, I., Ward, B., Souilhol, C., Recarti, C., Ariaans, M., Johnston, J., Burnett, A., Mahmoud, M., Luong, L.A., West, L., et al. (2020). Neutrophil microvesicles drive atherosclerosis by delivering miR-155 to atheroprone endothelium. *Nat. Commun.* *11*, 214.
- Gómez-Puerta, J.A., Gedmintas, L., and Costenbader, K.H. (2013). The association between silica exposure and development of ANCA-associated vasculitis: Systematic review and meta-analysis. *Autoimmun. Rev.* *12*, 1129–1135.
- Grad, L.I., Pokrishevsky, E., Silverman, J.M., and Cashman, N.R. (2014). Exosome-dependent and independent mechanisms are involved in prion-like transmission of propagated Cu/Zn superoxide dismutase misfolding. *Prion* *8*, 331–335.

- Grange, C., Tapparo, M., Collino, F., Vitillo, L., Damasco, C., Deregibus, M.C., Tetta, C., Bussolati, B., and Camussi, G. (2011). Microvesicles Released from Human Renal Cancer Stem Cells Stimulate Angiogenesis and Formation of Lung Premetastatic Niche. *Cancer Res.* *71*, 5346–5356.
- Gross, J.C., Chaudhary, V., Bartscherer, K., and Boutros, M. (2012). Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat. Cell Biol.* *14*, 1036–1045.
- Gruenberg, J., and Stenmark, H. (2004). The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 317–323.
- Guillevin, L., and Pagnoux, C. (2003). Indications of Plasma Exchanges for Systemic Vasculitides. *Ther. Apher. Dial.* *7*, 155–160.
- Guillevin, L., and Pagnoux, C. (2007). Traitement des vascularites systémiques associées aux ANCA. *Presse Médicale* *36*, 922–927.
- Guillevin, L., Lhote, F., Gayraud, M., Cohen, P., Jarrousse, B., Lortholary, O., Thibault, N., and Casassus, P. (1996). Prognostic Factors in Polyarteritis Nodosa and Churg-Strauss Syndrome A Prospective Study in 342 Patients: *Medicine (Baltimore)* *75*, 17–28.
- Guillevin, L., Cevallos, R., Durand-Gasselino, B., Lhote, F., Jarrousse, B., and Callard, P. (1997). Treatment of glomerulonephritis in microscopic polyangiitis and Churg-Strauss syndrome. Indications of plasma exchanges, Meta-analysis of 2 randomized studies on 140 patients, 32 with glomerulonephritis. *Ann. Med. Interne (Paris)* *148*, 198–204.
- Guillevin, L., Cohen, P., Gayraud, M., Lhote, F., Jarrousse, B., and Casassus, P. (1999). Churg-Strauss Syndrome Clinical Study and Long-Term Follow-Up of 96 Patients: *Medicine (Baltimore)* *78*, 26–37.
- Guillevin, L., Pagnoux, C., Seror, R., Mahr, A., Mouthon, L., and Toumelin, P.L. (2011). The Five-Factor Score Revisited: Assessment of Prognoses of Systemic Necrotizing Vasculitides Based on the French Vasculitis Study Group (FVSG) Cohort. *Medicine (Baltimore)* *90*, 19–27.
- Guillevin, L., Pagnoux, C., Karras, A., Khouatra, C., Aumaître, O., Cohen, P., Maurier, F., Decaux, O., Ninet, J., Gobert, P., et al. (2014). Rituximab versus Azathioprine for Maintenance in ANCA-Associated Vasculitis. *N. Engl. J. Med.* *371*, 1771–1780.
- Guilpain, P., Espy, C., Morelle, W., Kavian, N., Pagnoux, C., Michalski, J.-C., Guillevin, L., Weill, B., and Batteux, F. (2011). Relationship between the sialylation level of anti-proteinase 3 antibodies and the activity of granulomatosis with polyangiitis (Wegener's disease). *J. Transl. Med.* *9*, P57, 1479-5876-9-S2-P57.
- Ha, M., and Kim, V.N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 509–524.
- Halbwachs, L., and Lesavre, P. (2012). Endothelium-Neutrophil Interactions in ANCA-Associated Diseases. *J. Am. Soc. Nephrol.* *23*, 1449–1461.
- Halbwachs-Mecarelli, L., Bessou, G., Lesavre, P., Lopez, S., and Witko-Sarsat, V. (1995). Bimodal distribution of proteinase 3 (PR3) surface expression reflects a constitutive heterogeneity in the polymorphonuclear neutrophil pool. *FEBS Lett.* *374*, 29–33.
- Haller, H., Eichhorn, J., Pieper, K., Göbel, U., and Luft, F.C. (1996). Circulating leukocyte integrin expression in Wegener's granulomatosis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *7*, 40–48.

- Haneklaus, M., Gerlic, M., Kurowska-Stolarska, M., Rainey, A.-A., Pich, D., McInnes, I.B., Hammerschmidt, W., O'Neill, L.A.J., and Masters, S.L. (2012). Cutting Edge: miR-223 and EBV miR-BART15 Regulate the NLRP3 Inflammasome and IL-1 β Production. *J. Immunol.* *189*, 3795–3799.
- Harding, C., Heuser, J., and Stahl, P. (1984). Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: demonstration of a pathway for receptor shedding. *Eur. J. Cell Biol.* *35*, 256–263.
- Hattar, K., Bickenbach, A., Csernok, E., Rosseau, S., Grandel, U., Seeger, W., Grimminger, F., and Sibeliuss, U. (2002). Wegener's granulomatosis: antiproteinase 3 antibodies induce monocyte cytokine and prostanoid release-role of autocrine cell activation. *J. Leukoc. Biol.* *71*, 996–1004.
- Heeringa, P., Brouwer, E., Klok, P.A., Huitema, M.G., van den Born, J., Weening, J.J., and Kallenberg, C.G. (1996). Autoantibodies to myeloperoxidase aggravate mild anti-glomerular-basement-membrane-mediated glomerular injury in the rat. *Am. J. Pathol.* *149*, 1695–1706.
- Hegmans, J.P.J.J., Bard, M.P.L., Hemmes, A., Luider, T.M., Kleijmeer, M.J., Prins, J.-B., Zitvogel, L., Burgers, S.A., Hoogsteden, H.C., and Lambrecht, B.N. (2004). Proteomic Analysis of Exosomes Secreted by Human Mesothelioma Cells. *Am. J. Pathol.* *164*, 1807–1815.
- Hergenreider, E., Heydt, S., Tréguer, K., Boettger, T., Horrevoets, A.J.G., Zeiher, A.M., Scheffer, M.P., Frangakis, A.S., Yin, X., Mayr, M., et al. (2012). Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nat. Cell Biol.* *14*, 249–256.
- Hewins, P., Morgan, M.D., Holden, N., Neil, D., Williams, J.M., Savage, C.O.S., and Harper, L. (2006). IL-18 is upregulated in the kidney and primes neutrophil responsiveness in ANCA-associated vasculitis. *Kidney Int.* *69*, 605–615.
- Hidalgo, A., Chilvers, E.R., Summers, C., and Koenderman, L. (2019). The Neutrophil Life Cycle. *Trends Immunol.* *40*, 584–597.
- Hoffman, G.S. (1992). Wegener Granulomatosis: An Analysis of 158 Patients. *Ann. Intern. Med.* *116*, 488.
- Hogan, S.L., Cooper, G.S., Savitz, D.A., Nylander-French, L.A., Parks, C.G., Chin, H., Jennette, C.E., Lionaki, S., Jennette, J.C., and Falk, R.J. (2007). Association of Silica Exposure with Anti-Neutrophil Cytoplasmic Autoantibody Small-Vessel Vasculitis: A Population-Based, Case-Control Study. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* *2*, 290–299.
- Hong, C.-W. (2018). Extracellular Vesicles of Neutrophils. *Immune Netw.* *18*, e43.
- Hong, Y., Eleftheriou, D., Hussain, A.A.K., Price-Kuehne, F.E., Savage, C.O., Jayne, D., Little, M.A., Salama, A.D., Klein, N.J., and Brogan, P.A. (2012). Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies stimulate release of neutrophil microparticles. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *23*, 49–62.
- Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T.-L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Tesic Mark, M., Molina, H., Kohsaka, S., Di Giannatale, A., Ceder, S., et al. (2015). Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* *527*, 329–335.
- Hu, N., Westra, J., Huitema, M.G., Bijl, M., Brouwer, E., Stegeman, C.A., Heeringa, P., Limburg, P.C., and Kallenberg, C.G.M. (2009). Coexpression of CD177 and membrane proteinase 3 on neutrophils in antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated systemic vasculitis: Anti-proteinase 3-mediated

- neutrophil activation is independent of the role of CD177-expressing neutrophils. *Arthritis Rheum.* *60*, 1548–1557.
- Huan, J., Hornick, N.I., Shurtleff, M.J., Skinner, A.M., Goloviznina, N.A., Roberts, C.T., and Kurre, P. (2013). RNA Trafficking by Acute Myelogenous Leukemia Exosomes. *Cancer Res.* *73*, 918–929.
- Hugel, B., Martínez, M.C., Kunzelmann, C., and Freyssinet, J.-M. (2005). Membrane Microparticles: Two Sides of the Coin. *Physiology* *20*, 22–27.
- Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat. Rev. Genet.* *12*, 99–110.
- Huugen, D., van Esch, A., Xiao, H., Peutz-Kootstra, C.-J., Buurman, W.-A., Tervaert, J.W.C., Jennette, J.-C., and Heeringa, P. (2007). Inhibition of complement factor C5 protects against anti-myeloperoxidase antibody-mediated glomerulonephritis in mice. *Kidney Int.* *71*, 646–654.
- Iero, M., Valenti, R., Huber, V., Filipazzi, P., Parmiani, G., Fais, S., and Rivoltini, L. (2008). Tumour-released exosomes and their implications in cancer immunity. *Cell Death Differ.* *15*, 80–88.
- Ipsaro, J.J., and Joshua-Tor, L. (2015). From guide to target: molecular insights into eukaryotic RNA-interference machinery. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *22*, 20–28.
- Ismail, N., Wang, Y., Dakhallah, D., Moldovan, L., Agarwal, K., Batte, K., Shah, P., Wisler, J., Eubank, T.D., Tridandapani, S., et al. (2013). Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. *Blood* *121*, 984–995.
- Izquierdo-Useros, N., Naranjo-Gómez, M., Erkizia, I., Puertas, M.C., Borràs, F.E., Blanco, J., and Martínez-Picado, J. (2010). HIV and Mature Dendritic Cells: Trojan Exosomes Riding the Trojan Horse? *PLoS Pathog.* *6*, e1000740.
- J. Simpson, R., and Mathivanan, S. (2012). Extracellular Microvesicles: The Need for Internationally Recognised Nomenclature and Stringent Purification Criteria. *J. Proteomics Bioinform.* *05*.
- Jagiello, P., Aries, P., Arning, L., Wagenleiter, S.E.N., Csernok, E., Hellmich, B., Gross, W.L., and Epplen, J.T. (2005). The PTPN22 620W allele is a risk factor for Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum.* *52*, 4039–4043.
- Janssen, H.L.A., Reesink, H.W., Lawitz, E.J., Zeuzem, S., Rodriguez-Torres, M., Patel, K., van der Meer, A.J., Patick, A.K., Chen, A., Zhou, Y., et al. (2013). Treatment of HCV Infection by Targeting MicroRNA. *N. Engl. J. Med.* *368*, 1685–1694.
- Jayne, D., Rasmussen, N., Andrassy, K., Bacon, P., Tervaert, J.W.C., Dadoniené, J., Ekstrand, A., Gaskin, G., Gregorini, G., de Groot, K., et al. (2003). A Randomized Trial of Maintenance Therapy for Vasculitis Associated with Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibodies. *N. Engl. J. Med.* *349*, 36–44.
- Jennette, J.C. (2013). Overview of the 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference nomenclature of vasculitides. *Clin. Exp. Nephrol.* *17*, 603–606.
- Jennette, J.C., and Falk, R.J. (2015). ANCA Are Also Antimonocyte Cytoplasmic Autoantibodies. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* *10*, 4–6.

- Jennette, J.C., Falk, R.J., Andrassy, K., Bacon, P.A., Churg, J., Gross, W.L., Hagen, E.C., Hoffman, G.S., Hunder, G.G., Kallenberg, C.G.M., et al. (1994). Nomenclature of Systemic Vasculitides. *Arthritis Rheum.* *37*, 187–192.
- Jennette, J.C., Falk, R.J., Bacon, P.A., Basu, N., Cid, M.C., Ferrario, F., Flores-Suarez, L.F., Gross, W.L., Guillevin, L., Hagen, E.C., et al. (2013). 2012 Revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum.* *65*, 1–11.
- Jerke, U., Rolle, S., Dittmar, G., Bayat, B., Santoso, S., Sporberr, A., Luft, F., and Kettritz, R. (2011). Complement Receptor Mac-1 Is an Adaptor for NB1 (CD177)-mediated PR3-ANCA Neutrophil Activation. *J. Biol. Chem.* *286*, 7070–7081.
- Jo, M.H., Shin, S., Jung, S.-R., Kim, E., Song, J.-J., and Hohng, S. (2015). Human Argonaute 2 Has Diverse Reaction Pathways on Target RNAs. *Mol. Cell* *59*, 117–124.
- Johansson, M.W., Patarroyo, M., Oberg, F., Siegbahn, A., and Nilsson, K. (1997). Myeloperoxidase mediates cell adhesion via the alpha M beta 2 integrin (Mac-1, CD11b/CD18). *J. Cell Sci.* *110 (Pt 9)*, 1133–1139.
- Johnstone, R.M., Mathew, A., Mason, A.B., and Teng, K. (1991). Exosome formation during maturation of mammalian and avian reticulocytes: Evidence that exosome release is a major route for externalization of obsolete membrane proteins. *J. Cell. Physiol.* *147*, 27–36.
- Jonas, S., and Izaurralde, E. (2015). Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat. Rev. Genet.* *16*, 421–433.
- Joshi, B.S., de Beer, M.A., Giepmans, B.N.G., and Zuhorn, I.S. (2020). Endocytosis of Extracellular Vesicles and Release of Their Cargo from Endosomes. *ACS Nano* *14*, 4444–4455.
- Jubeli, E., Moine, L., Vergnaud-Gauduchon, J., and Barratt, G. (2012). E-selectin as a target for drug delivery and molecular imaging. *J. Controlled Release* *158*, 194–206.
- Kamalden, T.A., Macgregor-Das, A.M., Kannan, S.M., Dunkerly-Eyring, B., Khaliddin, N., Xu, Z., Fusco, A.P., Yazib, S.A., Chow, R.C., Duh, E.J., et al. (2017). Exosomal MicroRNA-15a Transfer from the Pancreas Augments Diabetic Complications by Inducing Oxidative Stress. *Antioxid. Redox Signal.* *27*, 913–930.
- Kantari, C., Pederzoli-Ribeil, M., Amir-Moazami, O., Gausson-Dorey, V., Moura, I.C., Lecomte, M.-C., Benhamou, M., and Witko-Sarsat, V. (2007). Proteinase 3, the Wegener autoantigen, is externalized during neutrophil apoptosis: evidence for a functional association with phospholipid scramblase 1 and interference with macrophage phagocytosis. *Blood* *110*, 4086–4095.
- Karasu, E., Eisenhardt, S.U., Harant, J., and Huber-Lang, M. (2018). Extracellular Vesicles: Packages Sent With Complement. *Front. Immunol.* *9*, 721.
- Katzmann, D.J., Babst, M., and Emr, S.D. (2001). Ubiquitin-Dependent Sorting into the Multivesicular Body Pathway Requires the Function of a Conserved Endosomal Protein Sorting Complex, ESCRT-I. *Cell* *106*, 145–155.
- Katzmann, D.J., Odorizzi, G., and Emr, S.D. (2002). Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 893–905.

- Kaufman, K.M., Kelly, J.A., Herring, B.J., Adler, A.J., Glenn, S.B., Namjou, B., Frank, S.G., Dawson, S.L., Bruner, G.R., James, J.A., et al. (2006). Evaluation of the genetic association of the PTPN22 R620W polymorphism in familial and sporadic systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* *54*, 2533–2540.
- Keogh, K.A., Wylam, M.E., Stone, J.H., and Specks, U. (2005). Induction of remission by B lymphocyte depletion in eleven patients with refractory antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheum.* *52*, 262–268.
- Kessenbrock, K., Krumbholz, M., Schönemmarck, U., Back, W., Gross, W.L., Werb, Z., Gröne, H.-J., Brinkmann, V., and Jenne, D.E. (2009). Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat. Med.* *15*, 623–625.
- Kettritz, R. (2002). Phosphatidylinositol 3-Kinase Controls Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies--Induced Respiratory Burst in Human Neutrophils. *J. Am. Soc. Nephrol.* *13*, 1740–1749.
- Khan, A., Lawson, C.A., Quinn, M.A., Isdale, A.H., and Green, M.J. (2010). Successful Treatment of ANCA-Negative Wegener's Granulomatosis with Rituximab. *Int. J. Rheumatol.* *2010*, 1–2.
- Kim, Y.-K., and Kim, V.N. (2007). Processing of intronic microRNAs. *EMBO J.* *26*, 775–783.
- Kim, J.-H., Jeun, E.-J., Hong, C.-P., Kim, S.-H., Jang, M.S., Lee, E.-J., Moon, S.J., Yun, C.H., Im, S.-H., Jeong, S.-G., et al. (2016). Extracellular vesicle-derived protein from *Bifidobacterium longum* alleviates food allergy through mast cell suppression. *J. Allergy Clin. Immunol.* *137*, 507-516.e8.
- Kitching, A.R., Anders, H.-J., Basu, N., Brouwer, E., Gordon, J., Jayne, D.R., Kullman, J., Lyons, P.A., Merkel, P.A., Savage, C.O.S., et al. (2020). ANCA-associated vasculitis. *Nat. Rev. Dis. Primer* *6*, 71.
- Klemmer, P.J., Chalermkulrat, W., Reif, M.S., Hogan, S.L., Henke, D.C., and Falk, R.J. (2003). Plasmapheresis therapy for diffuse alveolar hemorrhage in patients with small-vessel vasculitis. *Am. J. Kidney Dis.* *42*, 1149–1153.
- Kloosterman, W.P., and Plasterk, R.H.A. (2006). The Diverse Functions of MicroRNAs in Animal Development and Disease. *Dev. Cell* *11*, 441–450.
- Kobold, A.C.M., Kallenberg, C.G.M., and Tervaert, J.W.C. (1999). Monocyte activation in patients with Wegener's granulomatosis. *Ann. Rheum. Dis.* *58*, 237–245.
- Kocerha, J., Kouri, N., Baker, M., Finch, N., DeJesus-Hernandez, M., Gonzalez, J., Chidamparam, K., Josephs, K.A., Boeve, B.F., Graff-Radford, N.R., et al. (2011). Altered microRNA expression in frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 pathology caused by progranulin mutations. *BMC Genomics* *12*, 527.
- Kocher, M., Edberg, J.C., Fleit, H.B., and Kimberly, R.P. (1998). Antineutrophil cytoplasmic antibodies preferentially engage Fc gammaRIIIb on human neutrophils. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *161*, 6909–6914.
- Kogure, T., Lin, W.-L., Yan, I.K., Braconi, C., and Patel, T. (2011). Intercellular nanovesicle-mediated microRNA transfer: A mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth. *Hepatology* *54*, 1237–1248.

- Kordelas, L., Rebmann, V., Ludwig, A.-K., Radtke, S., Ruesing, J., Doeppner, T.R., Epple, M., Horn, P.A., Beelen, D.W., and Giebel, B. (2014). MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease. *Leukemia* 28, 970–973.
- Kowal, J., Arras, G., Colombo, M., Jouve, M., Morath, J.P., Primdal-Bengtson, B., Dingli, F., Loew, D., Tkach, M., and Théry, C. (2016). Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, E968–E977.
- Laffont, B., Corduan, A., Plé, H., Duchez, A.-C., Cloutier, N., Boilard, E., and Provost, P. (2013). Activated platelets can deliver mRNA regulatory Ago2•microRNA complexes to endothelial cells via microparticles. *Blood* 122, 253–261.
- Lamparski, H.G., Metha-Damani, A., Yao, J.-Y., Patel, S., Hsu, D.-H., Ruegg, C., and Le Pecq, J.-B. (2002). Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells. *J. Immunol. Methods* 270, 211–226.
- Lamprecht, P., and Gross, W.L. (2007). Current knowledge on cellular interactions in the WG-granuloma. *Clin. Exp. Rheumatol.* 25, S49-51.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854.
- Lee, S.W.L., Paoletti, C., Campisi, M., Osaki, T., Adriani, G., Kamm, R.D., Mattu, C., and Chiono, V. (2019). MicroRNA delivery through nanoparticles. *J. Controlled Release* 313, 80–95.
- Lee, Y.H., Rho, Y.H., Choi, S.J., Ji, J.D., Song, G.G., Nath, S.K., and Harley, J.B. (2007). The PTPN22 C1858T functional polymorphism and autoimmune diseases--a meta-analysis. *Rheumatology* 46, 49–56.
- Leventis, P.A., and Grinstein, S. (2010). The Distribution and Function of Phosphatidylserine in Cellular Membranes. *Annu. Rev. Biophys.* 39, 407–427.
- Liao, Y., Du, X., Li, J., and Lönnerdal, B. (2017). Human milk exosomes and their microRNAs survive digestion in vitro and are taken up by human intestinal cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 61, 1700082.
- Lionaki, S., Blyth, E.R., Hogan, S.L., Hu, Y., Senior, B.A., Jennette, C.E., Nachman, P.H., Jennette, J.C., and Falk, R.J. (2012). Classification of antineutrophil cytoplasmic autoantibody vasculitides: The role of antineutrophil cytoplasmic autoantibody specificity for myeloperoxidase or proteinase 3 in disease recognition and prognosis. *Arthritis Rheum.* 64, 3452–3462.
- Little, M.A., Smyth, C.L., Yadav, R., Ambrose, L., Cook, H.T., Nourshargh, S., and Pusey, C.D. (2005). Antineutrophil cytoplasm antibodies directed against myeloperoxidase augment leukocyte-microvascular interactions in vivo. *Blood* 106, 2050–2058.
- Little, M.A., Al-Ani, B., Ren, S., Al-Nuaimi, H., Leite, M., Alpers, C.E., Savage, C.O., and Duffield, J.S. (2012). Anti-Proteinase 3 Anti-Neutrophil Cytoplasm Autoantibodies Recapitulate Systemic Vasculitis in Mice with a Humanized Immune System. *PLoS ONE* 7, e28626.
- Lo Cicero, A., Stahl, P.D., and Raposo, G. (2015). Extracellular vesicles shuffling intercellular messages: for good or for bad. *Curr. Opin. Cell Biol.* 35, 69–77.

- Lu, X., Garfield, A., Rainger, G.E., Savage, C.O.S., and Nash, G.B. (2006). Mediation of endothelial cell damage by serine proteases, but not superoxide, released from antineutrophil cytoplasmic antibody-stimulated neutrophils. *Arthritis Rheum.* *54*, 1619–1628.
- Lu, X., Li, X., He, Q., Gao, J., Gao, Y., Liu, B., and Liu, F. (2013). miR-142-3p regulates the formation and differentiation of hematopoietic stem cells in vertebrates. *Cell Res.* *23*, 1356–1368.
- Lüdemann, J., Utecht, B., and Gross, W.L. (1990). Anti-neutrophil cytoplasm antibodies in Wegener's granulomatosis recognize an elastinolytic enzyme. *J. Exp. Med.* *171*, 357–362.
- Luo, S.-S., Ishibashi, O., Ishikawa, G., Ishikawa, T., Katayama, A., Mishima, T., Takizawa, T., Shigihara, T., Goto, T., Izumi, A., et al. (2009). Human Villous Trophoblasts Express and Secrete Placenta-Specific MicroRNAs into Maternal Circulation via Exosomes1. *Biol. Reprod.* *81*, 717–729.
- Luqmani, R.A., Bacon, P.A., Moots, R.J., Janssen, B.A., Pall, A., Emery, P., Savage, C., and Adu, D. (1994). Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS) in systemic necrotizing vasculitis. *QJM Mon. J. Assoc. Physicians* *87*, 671–678.
- Lyons, P.A., Rayner, T.F., Trivedi, S., Holle, J.U., Watts, R.A., Jayne, D.R.W., Baslund, B., Brenchley, P., Bruchfeld, A., Chaudhry, A.N., et al. (2012). Genetically Distinct Subsets within ANCA-Associated Vasculitis. *N. Engl. J. Med.* *367*, 214–223.
- Ma, T.-T., Huang, Y.-M., Wang, C., Zhao, M.-H., and Chen, M. (2014). Coagulation and Fibrinolysis Index Profile in Patients with ANCA-Associated Vasculitis. *PLoS ONE* *9*, e97843.
- MacDiarmid, J.A., Mugridge, N.B., Weiss, J.C., Phillips, L., Burn, A.L., Paulin, R.P., Haasdyk, J.E., Dickson, K.-A., Brahmabhatt, V.N., Pattison, S.T., et al. (2007). Bacterially Derived 400 nm Particles for Encapsulation and Cancer Cell Targeting of Chemotherapeutics. *Cancer Cell* *11*, 431–445.
- Mahr, A., Guillevin, L., Poissonnet, M., and Aymé, S. (2004). Prevalences of polyarteritis nodosa, microscopic polyangiitis, Wegener's granulomatosis, and Churg-Strauss syndrome in a French urban multiethnic population in 2000: A capture-recapture estimate: Prevalence of Vasculitides in a Parisian Suburb. *Arthritis Care Res.* *51*, 92–99.
- Makarova, J.A., Shkurnikov, M.U., Wicklein, D., Lange, T., Samatov, T.R., Turchinovich, A.A., and Tonevitsky, A.G. (2016). Intracellular and extracellular microRNA: An update on localization and biological role. *Prog. Histochem. Cytochem.* *51*, 33–49.
- Mandolesi, G., De Vito, F., Musella, A., Gentile, A., Bullitta, S., Fresegna, D., Sepman, H., Di Sanza, C., Haji, N., Mori, F., et al. (2017). miR-142-3p Is a Key Regulator of IL-1 β -Dependent Synaptopathy in Neuroinflammation. *J. Neurosci.* *37*, 546–561.
- Marti, M., and Johnson, P.J. (2016). Emerging roles for extracellular vesicles in parasitic infections. *Curr. Opin. Microbiol.* *32*, 66–70.
- Matuszcak, C. (2014). MicroRNAs: Promising chemoresistance biomarkers in gastric cancer with diagnostic and therapeutic potential. *World J. Gastroenterol.* *20*, 13658.
- Mavria, G., Vercoulen, Y., Yeo, M., Paterson, H., Karasarides, M., Marais, R., Bird, D., and Marshall, C.J. (2006). ERK-MAPK signaling opposes Rho-kinase to promote endothelial cell survival and sprouting during angiogenesis. *Cancer Cell* *9*, 33–44.

- Mayadas, T.N., Cullere, X., and Lowell, C.A. (2014). The Multifaceted Functions of Neutrophils. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 9, 181–218.
- McCarthy, E., Mustafa, M., and Watts, M. (2017). ANCA-negative Granulomatosis with Polyangiitis: A Difficult Diagnosis. *Eur. J. Case Rep. Intern. Med.* 2, 14.
- McConnell, R.E., Higginbotham, J.N., Shifrin, D.A., Tabb, D.L., Coffey, R.J., and Tyska, M.J. (2009). The enterocyte microvillus is a vesicle-generating organelle. *J. Cell Biol.* 185, 1285–1298.
- McGough, I.J., and Vincent, J.-P. (2016). Exosomes in developmental signalling. *Development* 143, 2482–2493.
- Melnik, B.C., John, S., and Schmitz, G. (2014). Milk: an exosomal microRNA transmitter promoting thymic regulatory T cell maturation preventing the development of atopy? *J. Transl. Med.* 12, 43.
- Melo, S.A., Luecke, L.B., Kahlert, C., Fernandez, A.F., Gammon, S.T., Kaye, J., LeBleu, V.S., Mittendorf, E.A., Weitz, J., Rahbari, N., et al. (2015). Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature* 523, 177–182.
- Mesri, M., and Altieri, D.C. (1998). Endothelial cell activation by leukocyte microparticles. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 161, 4382–4387.
- Mesri, M., and Altieri, D.C. (1999). Leukocyte Microparticles Stimulate Endothelial Cell Cytokine Release and Tissue Factor Induction in a JNK1 Signaling Pathway. *J. Biol. Chem.* 274, 23111–23118.
- Mevorach, D., Mascarenhas, J.O., Gershov, D., and Elkon, K.B. (1998). Complement-dependent Clearance of Apoptotic Cells by Human Macrophages. *J. Exp. Med.* 188, 2313–2320.
- Migneault, F., Dieudé, M., Turgeon, J., Beillevaire, D., Hardy, M.-P., Brodeur, A., Thibodeau, N., Perreault, C., and Hébert, M.-J. (2020). Apoptotic exosome-like vesicles regulate endothelial gene expression, inflammatory signaling, and function through the NF- κ B signaling pathway. *Sci. Rep.* 10, 12562.
- Mittelbrunn, M., Gutiérrez-Vázquez, C., Villarroya-Beltri, C., González, S., Sánchez-Cabo, F., González, M.Á., Bernad, A., and Sánchez-Madrid, F. (2011). Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat. Commun.* 2, 282.
- Miyanishi, M., Tada, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Kitamura, T., and Nagata, S. (2007). Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature* 450, 435–439.
- Möbius, W., Ohno-Iwashita, Y., Donselaar, E.G. van, Oorschot, V.M.J., Shimada, Y., Fujimoto, T., Heijnen, H.F.G., Geuze, H.J., and Slot, J.W. (2002). Immunoelectron Microscopic Localization of Cholesterol Using Biotinylated and Non-cytolytic Perfringolysin O. *J. Histochem. Cytochem.* 50, 43–55.
- Mohammad, A.J., Jacobsson, L.T.H., Westman, K.W.A., Sturfelt, G., and Segelmark, M. (2009). Incidence and survival rates in Wegener’s granulomatosis, microscopic polyangiitis, Churg-Strauss syndrome and polyarteritis nodosa. *Rheumatology* 48, 1560–1565.
- Montalvo, J., Spencer, C., Hackathorn, A., Masterjohn, K., Perkins, A., Doty, C., Arumugam, A., P. Ongusaha, P., Lakshmanaswamy, R., K. Liao, J., et al. (2012). Rock1 & 2 Perform Overlapping and Unique Roles in Angiogenesis and Angiosarcoma Tumor Progression. *Curr. Mol. Med.* 13, 205–219.

- Montaner, S., Galiano, A., Trelis, M., Martin-Jaular, L., del Portillo, H.A., Bernal, D., and Marcilla, A. (2014). The Role of Extracellular Vesicles in Modulating the Host Immune Response during Parasitic Infections. *Front. Immunol.* 5.
- Montecalvo, A., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Beer Stolz, D., Sullivan, M.L.G., Karlsson, J.M., Batty, C.J., Gibson, G.A., Erdos, G., Wang, Z., et al. (2012). Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* 119, 756–766.
- Mouillet, J.-F., Ouyang, Y., Bayer, A., Coyne, C.B., and Sadovsky, Y. (2014). The role of trophoblastic microRNAs in placental viral infection. *Int. J. Dev. Biol.* 58, 281–289.
- Mukhtyar, C., Guillevin, L., Cid, M.C., Dasgupta, B., de Groot, K., Gross, W., Hauser, T., Hellmich, B., Jayne, D., Kallenberg, C.G.M., et al. (2009). EULAR recommendations for the management of primary small and medium vessel vasculitis. *Ann. Rheum. Dis.* 68, 310–317.
- Mulcahy, L.A., Pink, R.C., and Carter, D.R.F. (2014). Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J. Extracell. Vesicles* 3, 24641.
- Mulder, A.H.L., Stegeman, C.A., and Kallenberg, C.G.M. (1995). Activation of granulocytes by anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in Wegener's granulomatosis: a predominant role for the IgG3 subclass of ANCA. *Clin. Exp. Immunol.* 101, 227–232.
- Mulder, A.H.L., Heeringa, P., Brouwer, H., Limburg, P.C., and Kallenberg, C.G.M. (2008). Activation of granulocytes by anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): a FcγRII-dependent process. *Clin. Exp. Immunol.* 98, 270–278.
- Munoz, J.L., Bliss, S.A., Greco, S.J., Ramkissoon, S.H., Ligon, K.L., and Rameshwar, P. (2013). Delivery of Functional Anti-miR-9 by Mesenchymal Stem Cell-derived Exosomes to Glioblastoma Multiforme Cells Conferred Chemosensitivity. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* 2, e126.
- Muralidharan-Chari, V., Clancy, J., Plou, C., Romao, M., Chavrier, P., Raposo, G., and D'Souza-Schorey, C. (2009). ARF6-Regulated Shedding of Tumor Cell-Derived Plasma Membrane Microvesicles. *Curr. Biol.* 19, 1875–1885.
- Nabhan, J.F., Hu, R., Oh, R.S., Cohen, S.N., and 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.* 109, 4146–4151.
- Nakazawa, D., Tomaru, U., Suzuki, A., Masuda, S., Hasegawa, R., Kobayashi, T., Nishio, S., Kasahara, M., and Ishizu, A. (2012). Abnormal conformation and impaired degradation of propylthiouracil-induced neutrophil extracellular traps: Implications of disordered neutrophil extracellular traps in a rat model of myeloperoxidase antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheum.* 64, 3779–3787.
- Näslund, T.I., Paquin-Proulx, D., Paredes, P.T., Vallhov, H., Sandberg, J.K., and Gabrielsson, S. (2014). Exosomes from breast milk inhibit HIV-1 infection of dendritic cells and subsequent viral transfer to CD4+ T cells. *AIDS* 28, 171–180.
- Nassar, W., El-Ansary, M., Sabry, D., Mostafa, M.A., Fayad, T., Kotb, E., Temraz, M., Saad, A.-N., Essa, W., and Adel, H. (2016). Umbilical cord mesenchymal stem cells derived extracellular vesicles can safely ameliorate the progression of chronic kidney diseases. *Biomater. Res.* 20, 21.

- Néel, A., Bucchia, M., Néel, M., Tilly, G., Caristan, A., Yap, M., Rimbert, M., Bruneau, S., Cadoux, M., Agard, C., et al. (2019). Dampening of CD8+ T Cell Response by B Cell Depletion Therapy in Antineutrophil Cytoplasmic Antibody–Associated Vasculitis. *Arthritis Rheumatol.* *71*, 641–650.
- Németh, T., Sperandio, M., and Mócsai, A. (2020). Neutrophils as emerging therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* *19*, 253–275.
- Neudecker, V., Brodsky, K.S., Clambey, E.T., Schmidt, E.P., Packard, T.A., Davenport, B., Standiford, T.J., Weng, T., Fletcher, A.A., Barthel, L., et al. (2017a). Neutrophil transfer of *miR-223* to lung epithelial cells dampens acute lung injury in mice. *Sci. Transl. Med.* *9*, eaah5360.
- Neudecker, V., Haneklaus, M., Jensen, O., Khailova, L., Masterson, J.C., Tye, H., Biette, K., Jedlicka, P., Brodsky, K.S., Gerich, M.E., et al. (2017b). Myeloid-derived miR-223 regulates intestinal inflammation via repression of the NLRP3 inflammasome. *J. Exp. Med.* *214*, 1737–1752.
- Njock, M.-S., Cheng, H.S., Dang, L.T., Nazari-Jahantigh, M., Lau, A.C., Boudreau, E., Roufaiel, M., Cybulsky, M.I., Schober, A., and Fish, J.E. (2015). Endothelial cells suppress monocyte activation through secretion of extracellular vesicles containing antiinflammatory microRNAs. *Blood* *125*, 3202–3212.
- Nogueira, E., Hamour, S., Sawant, D., Henderson, S., Mansfield, N., Chavele, K.-M., Pusey, C.D., and Salama, A.D. (2010). Serum IL-17 and IL-23 levels and autoantigen-specific Th17 cells are elevated in patients with ANCA-associated vasculitis. *Nephrol. Dial. Transplant.* *25*, 2209–2217.
- Nolan, S.L., Kalia, N., Nash, G.B., Kamel, D., Heeringa, P., and Savage, C.O.S. (2008). Mechanisms of ANCA-Mediated Leukocyte-Endothelial Cell Interactions *In Vivo*. *J. Am. Soc. Nephrol.* *19*, 973–984.
- Nolte-’t Hoen, E.N.M., Buermans, H.P.J., Waasdorp, M., Stoorvogel, W., Wauben, M.H.M., and ’t Hoen, P.A.C. (2012). Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res.* *40*, 9272–9285.
- Noronha, I.L., Krüger, C., Andrassy, K., Ritz, E., and Waldherr, R. (1993). In situ production of TNF- α , IL-1 β and IL-2R in ANCA-positive glomerulonephritis. *Kidney Int.* *43*, 682–692.
- Novack, S.N., and Pearson, C.M. (1971). Cyclophosphamide Therapy in Wegener’s Granulomatosis. *N. Engl. J. Med.* *284*, 938–942.
- Nowack, R., Schwalbe, K., Flores-Suárez, L.F., Yard, B., and van der Woude, F.J. (2000). Upregulation of CD14 and CD18 on monocytes *In vitro* by antineutrophil cytoplasmic autoantibodies. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *11*, 1639–1646.
- O’Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., and Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front. Endocrinol.* *9*, 402.
- Ohashi, P.S., and Woodgett, J.R. (2005). Modulating autoimmunity: pick your PI3 kinase. *Nat. Med.* *11*, 924–925.
- Ohlsson, S.M., Ohlsson, S., Söderberg, D., Gunnarsson, L., Pettersson, Å., Segelmark, M., and Hellmark, T. (2014). Neutrophils from vasculitis patients exhibit an increased propensity for activation by anti-neutrophil cytoplasmic antibodies: ANCA stimulation of neutrophils. *Clin. Exp. Immunol.* *176*, 363–372.

- Ohno, S., Takanashi, M., Sudo, K., Ueda, S., Ishikawa, A., Matsuyama, N., Fujita, K., Mizutani, T., Ohgi, T., Ochiya, T., et al. (2013). Systemically Injected Exosomes Targeted to EGFR Deliver Antitumor MicroRNA to Breast Cancer Cells. *Mol. Ther.* *21*, 185–191.
- Okada, C., Yamashita, E., Lee, S.J., Shibata, S., Katahira, J., Nakagawa, A., Yoneda, Y., and Tsukihara, T. (2009). A High-Resolution Structure of the Pre-microRNA Nuclear Export Machinery. *Science* *326*, 1275–1279.
- Okoye, I.S., Coomes, S.M., Pelly, V.S., Czieso, S., Papayannopoulos, V., Tolmachova, T., Seabra, M.C., and Wilson, M.S. (2014). MicroRNA-containing T-regulatory-cell-derived exosomes suppress pathogenic T helper 1 cells. *Immunity* *41*, 89–103.
- Ostrowski, M., Carmo, N.B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C.F., Schauer, K., Hume, A.N., Freitas, R.P., et al. (2010). Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat. Cell Biol.* *12*, 19–30.
- O’Sullivan, K.M., Lo, C.Y., Summers, S.A., Elgass, K.D., McMillan, P.J., Longano, A., Ford, S.L., Gan, P.-Y., Kerr, P.G., Richard Kitching, A., et al. (2015). Renal participation of myeloperoxidase in antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated glomerulonephritis. *Kidney Int.* *88*, 1030–1046.
- Pagnoux, C., Hogan, S.L., Chin, H., Jennette, J.C., Falk, R.J., Guillevin, L., and Nachman, P.H. (2008). Predictors of treatment resistance and relapse in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated small-vessel vasculitis: Comparison of two independent cohorts. *Arthritis Rheum.* *58*, 2908–2918.
- Paley, M.A., Edrees, F., Kudose, S., Gaut, J.P., Ranganathan, P., and Vijayan, A. (2019). Successful use of rituximab for hydralazine-induced anti-neutrophil cytoplasmic antibodies-associated vasculitis. *Saudi J. Kidney Dis. Transplant. Off. Publ. Saudi Cent. Organ Transplant. Saudi Arab.* *30*, 226–230.
- Pan, B.T., Teng, K., Wu, C., Adam, M., and Johnstone, R.M. (1985). Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J. Cell Biol.* *101*, 942–948.
- Pasquinelli, A.E., Reinhart, B.J., Slack, F., Martindale, M.Q., Kuroda, M.I., Maller, B., Hayward, D.C., Ball, E.E., Degnan, B., Müller, P., et al. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* *408*, 86–89.
- P??che, H., Heslan, M., Usal, C., Amigorena, S., and Cuturi, M.C. (2003). Presentation of donor major histocompatibility complex antigens by bone marrow dendritic cell-derived exosomes modulates allograft rejection¹. *Transplantation* *76*, 1503–1510.
- Pendergraft, W.F., and Niles, J.L. (2014). Trojan horses: drug culprits associated with antineutrophil cytoplasmic autoantibody (ANCA) vasculitis. *Curr. Opin. Rheumatol.* *26*, 42–49.
- Pendergraft, W.F., Cortazar, F.B., Wenger, J., Murphy, A.P., Rhee, E.P., Laliberte, K.A., and Niles, J.L. (2014). Long-Term Maintenance Therapy Using Rituximab-Induced Continuous B-Cell Depletion in Patients with ANCA Vasculitis. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* *9*, 736–744.
- Peters, A.M. (1998). Just How Big is the Pulmonary Granulocyte Pool? *Clin. Sci.* *94*, 7–19.
- Pfeffer, S. (2004). Identification of Virus-Encoded MicroRNAs. *Science* *304*, 734–736.

- Pfister, H. (2004). Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies against the murine homolog of proteinase 3 (Wegener autoantigen) are pathogenic in vivo. *Blood* *104*, 1411–1418.
- Pierrot-Deseilligny Despujol, C., Pouchot, J., Pagnoux, C., Coste, J., and Guillevin, L. (2010). Predictors at diagnosis of a first Wegener's granulomatosis relapse after obtaining complete remission. *Rheumatology* *49*, 2181–2190.
- Pieterse, E., Rother, N., Garsen, M., Hofstra, J.M., Satchell, S.C., Hoffmann, M., Loeven, M.A., Knaapen, H.K., van der Heijden, O.W.H., Berden, J.H.M., et al. (2017). Neutrophil Extracellular Traps Drive Endothelial-to-Mesenchymal Transition. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *37*, 1371–1379.
- Pillay, J., den Braber, I., Vrisekoop, N., Kwast, L.M., de Boer, R.J., Borghans, J.A.M., Tesselaar, K., and Koenderman, L. (2010). In vivo labeling with ²H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* *116*, 625–627.
- Piper, R.C., and Katzmann, D.J. (2007). Biogenesis and Function of Multivesicular Bodies. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *23*, 519–547.
- Pitanga, T., de Aragão França, L., Rocha, V.C., Meirelles, T., Matos Borges, V., Gonçalves, M., Pontes-de-Carvalho, L., Noronha-Dutra, A., and dos-Santos, W.L. (2014). Neutrophil-derived microparticles induce myeloperoxidase-mediated damage of vascular endothelial cells. *BMC Cell Biol.* *15*, 21.
- Popa, E.R., Stegeman, C.A., Abdulahad, W.H., van der Meer, B., Arends, J., Manson, W.M., Bos, N.A., Kallenberg, C.G.M., and Cohen Tervaert, J.-W. (2007). Staphylococcal toxic-shock-syndrome-toxin-1 as a risk factor for disease relapse in Wegener's granulomatosis. *Rheumatology* *46*, 1029–1033.
- Porges, A.J., Redecha, P.B., Kimberly, W.T., Csernok, E., Gross, W.L., and Kimberly, R.P. (1994). Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies engage and activate human neutrophils via Fc gamma RIIa. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *153*, 1271–1280.
- Povero, D., Panera, N., Eguchi, A., Johnson, C.D., Papouchado, B.G., de Araujo Horcel, L., Pinatel, E.M., Alisi, A., Nobili, V., and Feldstein, A.E. (2015). Lipid-Induced Hepatocyte-Derived Extracellular Vesicles Regulate Hepatic Stellate Cells via MicroRNA Targeting Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ . *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* *1*, 646-663.e4.
- Qin, B., Shu, Y., Long, L., Li, H., Men, X., Feng, L., Yang, H., and Lu, Z. (2018). MicroRNA-142-3p Induces Atherosclerosis-Associated Endothelial Cell Apoptosis by Directly Targeting Rictor. *Cell. Physiol. Biochem.* *47*, 1589–1603.
- Rabesandratana, H., Toutant, J.P., Reggio, H., and Vidal, M. (1998). Decay-accelerating factor (CD55) and membrane inhibitor of reactive lysis (CD59) are released within exosomes during In vitro maturation of reticulocytes. *Blood* *91*, 2573–2580.
- Radford, D.J., Luu, N.T., Hewins, P., Nash, G.B., and Savage, C.O. (2001). Antineutrophil cytoplasmic antibodies stabilize adhesion and promote migration of flowing neutrophils on endothelial cells. *Arthritis Rheum.* *44*, 2851–2861.
- Raiborg, C., Rusten, T.E., and Stenmark, H. (2003). Protein sorting into multivesicular endosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* *15*, 446–455.
- Raitt, J.W. (1971). Wegener's Granulomatosis: Treatment with Cytotoxic Agents and Adrenocorticoids. *Ann. Intern. Med.* *74*, 344.

- Rajendran, L., Honsho, M., Zahn, T.R., Keller, P., Geiger, K.D., Verkade, P., and Simons, K. (2006). Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 11172–11177.
- Ralston, D.R., Marsh, C.B., Lowe, M.P., and Wewers, M.D. (1997). Antineutrophil cytoplasmic antibodies induce monocyte IL-8 release. Role of surface proteinase-3, alpha1-antitrypsin, and Fc gamma receptors. *J. Clin. Invest.* *100*, 1416–1424.
- Rani, L., Minz, R.W., Sharma, A., Anand, S., Gupta, D., Panda, N.K., and Sakhuja, V.K. (2015). Predominance of PR3 specific immune response and skewed TH17 vs. T-regulatory milieu in active granulomatosis with polyangiitis. *Cytokine* *71*, 261–267.
- Raposo, G., and Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* *200*, 373–383.
- Raposo, G., Nijman, H.W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C.V., Melief, C.J., and Geuze, H.J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* *183*, 1161–1172.
- Rarok, A.A. (2002). Neutrophil Membrane Expression of Proteinase 3 (PR3) Is Related to Relapse in PR3-ANCA-Associated Vasculitis. *J. Am. Soc. Nephrol.* *13*, 2232–2238.
- Reid, G., Kao, S.C., Pavlakis, N., Brahmabhatt, H., MacDiarmid, J., Clarke, S., Boyer, M., and van Zandwijk, N. (2016). Clinical development of TargomiRs, a miRNA mimic-based treatment for patients with recurrent thoracic cancer. *Epigenomics* *8*, 1079–1085.
- Reumaux, D., Vossebeld, P.J., Roos, D., and Verhoeven, A.J. (1995). Effect of tumor necrosis factor-induced integrin activation on Fc gamma receptor II-mediated signal transduction: relevance for activation of neutrophils by anti-proteinase 3 or anti-myeloperoxidase antibodies. *Blood* *86*, 3189–3195.
- Rimbert, M., Hamidou, M., Braudeau, C., Puéchal, X., Teixeira, L., Caillon, H., Néel, A., Audrain, M., Guillevin, L., and Josien, R. (2011). Decreased Numbers of Blood Dendritic Cells and Defective Function of Regulatory T Cells in Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis. *PLoS ONE* *6*, e18734.
- Riteau, B., Faure, F., Menier, C., Viel, S., Carosella, E.D., Amigorena, S., and Rouas-Freiss, N. (2003). Exosomes bearing HLA-G are released by melanoma cells. *Hum. Immunol.* *64*, 1064–1072.
- Rosenberger, C.M., Podyminogin, R.L., Navarro, G., Zhao, G.-W., Askovich, P.S., Weiss, M.J., and Aderem, A. (2012). miR-451 Regulates Dendritic Cell Cytokine Responses to Influenza Infection. *J. Immunol.* *189*, 5965–5975.
- van Rossum, A.P., Rarok, A.A., Huitema, M.G., Fassina, G., Limburg, P.C., and Kallenberg, C.G.M. (2004). Constitutive membrane expression of proteinase 3 (PR3) and neutrophil activation by anti-PR3 antibodies. *J. Leukoc. Biol.* *76*, 1162–1170.
- Roth, A.J., Ooi, J.D., Hess, J.J., van Timmeren, M.M., Berg, E.A., Poulton, C.E., McGregor, J., Burkart, M., Hogan, S.L., Hu, Y., et al. (2013). Epitope specificity determines pathogenicity and detectability in ANCA-associated vasculitis. *J. Clin. Invest.* *123*, 1773–1783.
- Ruth, A.-J., Kitching, A.R., Kwan, R.Y.Q., Odobasic, D., Ooi, J.D.K., Timoshanko, J.R., Hickey, M.J., and Holdsworth, S.R. (2006). Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies and Effector CD4⁺ Cells Play

Nonredundant Roles in Anti-Myeloperoxidase Crescentic Glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* *17*, 1940–1949.

Saffarzadeh, M., Juenemann, C., Queisser, M.A., Lochnit, G., Barreto, G., Galuska, S.P., Lohmeyer, J., and Preissner, K.T. (2012). Neutrophil Extracellular Traps Directly Induce Epithelial and Endothelial Cell Death: A Predominant Role of Histones. *PLoS ONE* *7*, e32366.

Salama, A., Fichou, N., Allard, M., Dubreil, L., De Beaurepaire, L., Viel, A., Jégou, D., Bösch, S., and Bach, J.-M. (2014). MicroRNA-29b Modulates Innate and Antigen-Specific Immune Responses in Mouse Models of Autoimmunity. *PLoS ONE* *9*, e106153.

Samos, J., Garcia-Olmo, D.C., Picazo, M.G., Rubio-Vitaller, A., and Garcia-Olmo, D. (2006). Circulating Nucleic Acids in Plasma/Serum and Tumor Progression: Are Apoptotic Bodies Involved? An Experimental Study in a Rat Cancer Model. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1075*, 165–173.

Sangaletti, S., Tripodo, C., Chiodoni, C., Guarnotta, C., Cappetti, B., Casalini, P., Piconese, S., Parenza, M., Guiducci, C., Vitali, C., et al. (2012). Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic cells toward ANCA induction and associated autoimmunity. *Blood* *120*, 3007–3018.

Savage, C.O., Pottinger, B.E., Gaskin, G., Pusey, C.D., and Pearson, J.D. (1992). Autoantibodies developing to myeloperoxidase and proteinase 3 in systemic vasculitis stimulate neutrophil cytotoxicity toward cultured endothelial cells. *Am. J. Pathol.* *141*, 335–342.

Savage, C.O., Gaskin, G., Pusey, C.D., and Pearson, J.D. (1993). Anti-neutrophil cytoplasm antibodies can recognize vascular endothelial cell-bound anti-neutrophil cytoplasm antibody-associated autoantigens. *Exp. Nephrol.* *1*, 190–195.

Savige, J.A., Gallicchio, M., Georgiou, T., and Davies, D.J. (2008). Diverse target antigens recognized by circulating antibodies in anti-neutrophil cytoplasm antibody-associated renal vasculitides. *Clin. Exp. Immunol.* *82*, 238–243.

Savill, J., Hogg, N., Ren, Y., and Haslett, C. (1992). Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J. Clin. Invest.* *90*, 1513–1522.

Savina, A., Vidal, M., and Colombo, M.I. (2002). The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11. *J. Cell Sci.* *115*, 2505–2515.

Savina, A., Fader, C.M., Damiani, M.T., and Colombo, M.I. (2005). Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. *Traffic Cph. Den.* *6*, 131–143.

Schorey, J.S., Cheng, Y., Singh, P.P., and Smith, V.L. (2015). Exosomes and other extracellular vesicles in host–pathogen interactions. *EMBO Rep.* *16*, 24–43.

Schreiber, A. (2003). Membrane Expression of Proteinase 3 Is Genetically Determined. *J. Am. Soc. Nephrol.* *14*, 68–75.

Schreiber, A., Luft, F.C., and Kettritz, R. (2004). Membrane proteinase 3 expression and ANCA-induced neutrophil activation. *Kidney Int.* *65*, 2172–2183.

- Schreiber, A., Otto, B., Ju, X., Zenke, M., Goebel, U., Luft, F.C., and Kettritz, R. (2005). Membrane Proteinase 3 Expression in Patients with Wegener's Granulomatosis and in Human Hematopoietic Stem Cell-Derived Neutrophils. *J. Am. Soc. Nephrol.* *16*, 2216–2224.
- Schreiber, A., Xiao, H., Jennette, J.C., Schneider, W., Luft, F.C., and Kettritz, R. (2009a). C5a Receptor Mediates Neutrophil Activation and ANCA-Induced Glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* *20*, 289–298.
- Schreiber, A., Xiao, H., Jennette, J.C., Schneider, W., Luft, F.C., and Kettritz, R. (2009b). C5a Receptor Mediates Neutrophil Activation and ANCA-Induced Glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* *20*, 289–298.
- Schreiber, A., Rolle, S., Peripelittchenko, L., Rademann, J., Schneider, W., Luft, F.C., and Kettritz, R. (2010). Phosphoinositol 3-kinase- γ mediates antineutrophil cytoplasmic autoantibody-induced glomerulonephritis. *Kidney Int.* *77*, 118–128.
- Sengeløv, H., Follin, P., Kjeldsen, L., Lollike, K., Dahlgren, C., and Borregaard, N. (1995). Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *154*, 4157–4165.
- Shao, H., Chung, J., Balaj, L., Charest, A., Bigner, D.D., Carter, B.S., Hochberg, F.H., Breakefield, X.O., Weissleder, R., and Lee, H. (2012). Protein typing of circulating microvesicles allows real-time monitoring of glioblastoma therapy. *Nat. Med.* *18*, 1835–1840.
- Sheldon, H., Heikamp, E., Turley, H., Dragovic, R., Thomas, P., Oon, C.E., Leek, R., Edelmann, M., Kessler, B., Sainson, R.C.A., et al. (2010). New mechanism for Notch signaling to endothelium at a distance by Delta-like 4 incorporation into exosomes. *Blood* *116*, 2385–2394.
- Shen, B., Wu, N., Yang, J.-M., and Gould, S.J. (2011). Protein Targeting to Exosomes/Microvesicles by Plasma Membrane Anchors. *J. Biol. Chem.* *286*, 14383–14395.
- Silva, F., Specks, U., Sethi, S., Irazabal, M.V., and Fervenza, F.C. (2009). Successful Pregnancy and Delivery of a Healthy Newborn Despite Transplacental Transfer of Antimyeloperoxidase Antibodies From a Mother With Microscopic Polyangiitis. *Am. J. Kidney Dis.* *54*, 542–545.
- Siragusa, M., and Fleming, I. (2016). The eNOS signalosome and its link to endothelial dysfunction. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* *468*, 1125–1137.
- Skog, J., Würdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D.H., Gainche, L., Sena-Esteves, M., Curry, W.T., Carter, B.S., Krichevsky, A.M., and Breakefield, X.O. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat. Cell Biol.* *10*, 1470–1476.
- Sotelo, J.R., and Porter, K.R. (1959). An Electron Microscope Study of the Rat Ovum. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* *5*, 327–342.
- Specks, U., Fervenza, F.C., McDonald, T.J., and Hogan, M.C. (2001). Response of Wegener's granulomatosis to anti-CD20 chimeric monoclonal antibody therapy. *Arthritis Rheum.* *44*, 2836–2840.
- Squadrito, M.L., Baer, C., Burdet, F., Maderna, C., Gilfillan, G.D., Lyle, R., Ibberson, M., and De Palma, M. (2014). Endogenous RNAs Modulate MicroRNA Sorting to Exosomes and Transfer to Acceptor Cells. *Cell Rep.* *8*, 1432–1446.

- Stegeman, C.A. (1994). Association of Chronic Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* and Higher Relapse Rates in Wegener Granulomatosis. *Ann. Intern. Med.* *120*, 12.
- Stegeman, C.A., Cohen Tervaert, J.W., de Jong, P.E., and Kallenberg, C.G.M. (1996). Trimethoprim–Sulfamethoxazole (Co-Trimoxazole) for the Prevention of Relapses of Wegener’s Granulomatosis. *N. Engl. J. Med.* *335*, 16–20.
- Stenvang, J., Petri, A., Lindow, M., Obad, S., and Kauppinen, S. (2012). Inhibition of microRNA function by anti-miR oligonucleotides. *Silence* *3*, 1.
- Subra, C., Grand, D., Laulagnier, K., Stella, A., Lambeau, G., Paillasse, M., De Medina, P., Monsarrat, B., Perret, B., Silvente-Poirot, S., et al. (2010). Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *J. Lipid Res.* *51*, 2105–2120.
- Sukma Dewi, I., Celik, S., Karlsson, A., Hollander, Z., Lam, K., McManus, J.-W., Tebbutt, S., Ng, R., Keown, P., McMaster, R., et al. (2017). Exosomal miR-142-3p is increased during cardiac allograft rejection and augments vascular permeability through down-regulation of endothelial RAB11FIP2 expression. *Cardiovasc. Res.* *cvw244*.
- Summers, S.A., Steinmetz, O.M., Gan, P.-Y., Ooi, J.D., Odobasic, D., Kitching, A.R., and Holdsworth, S.R. (2011). Toll-like receptor 2 induces Th17 myeloperoxidase autoimmunity while Toll-like receptor 9 drives Th1 autoimmunity in murine vasculitis. *Arthritis Rheum.* *63*, 1124–1135.
- Sunderkötter, C.H., Zelger, B., Chen, K.-R., Requena, L., Piette, W., Carlson, J.A., Dutz, J., Lamprecht, P., Mahr, A., Aberer, E., et al. (2018). Nomenclature of Cutaneous Vasculitis: Dermatologic Addendum to the 2012 Revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheumatol.* *70*, 171–184.
- Sznajd, J., and Mukhtyar, C. (2016). How to treat ANCA-associated vasculitis: practical messages from 2016 EULAR/ERA-EDTA recommendations. *Pol. Arch. Intern. Med.* *126*, 781–788.
- Tadokoro, H., Umezumi, T., Ohyashiki, K., Hirano, T., and Ohyashiki, J.H. (2013). Exosomes Derived from Hypoxic Leukemia Cells Enhance Tube Formation in Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* *288*, 34343–34351.
- Tan, W., Palmby, T.R., Gavard, J., Amornphimoltham, P., Zheng, Y., and Gui, J.S. (2008). An essential role for Rac1 in endothelial cell function and vascular development. *FASEB J.* *22*, 1829–1838.
- Tarzi, R.M., Liu, J., Schneiter, S., Hill, N.R., Page, T.H., Cook, H.T., Pusey, C.D., and Woollard, K.J. (2015). CD14 expression is increased on monocytes in patients with anti-neutrophil cytoplasm antibody (ANCA)-associated vasculitis and correlates with the expression of ANCA autoantigens. *Clin. Exp. Immunol.* *181*, 65–75.
- Taylor, R.C., Cullen, S.P., and Martin, S.J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 231–241.
- The FANTOM Consortium, de Rie, D., Abugessaisa, I., Alam, T., Arner, E., Arner, P., Ashoor, H., Åström, G., Babina, M., Bertin, N., et al. (2017). An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. *Nat. Biotechnol.* *35*, 872–878.
- Théry, C., Boussac, M., Véron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., and Amigorena, S. (2001). Proteomic Analysis of Dendritic Cell-Derived Exosomes: A Secreted Subcellular Compartment Distinct from Apoptotic Vesicles. *J. Immunol.* *166*, 7309–7318.

- Théry, C., Duban, L., Segura, E., Véron, P., Lantz, O., and Amigorena, S. (2002). Indirect activation of naïve CD4⁺ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat. Immunol.* *3*, 1156–1162.
- Théry, C., Ostrowski, M., and Segura, E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 581–593.
- Théry, C., Witwer, K.W., Aikawa, E., Alcaraz, M.J., Anderson, J.D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G.K., et al. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J. Extracell. Vesicles* *7*, 1535750.
- Tormo, E., Ballester, S., Adam-Artigues, A., Burgués, O., Alonso, E., Bermejo, B., Menéndez, S., Zazo, S., Madoz-Gúrpide, J., Rovira, A., et al. (2019). The miRNA-449 family mediates doxorubicin resistance in triple-negative breast cancer by regulating cell cycle factors. *Sci. Rep.* *9*, 5316.
- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brugger, B., and Simons, M. (2008). Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes. *Science* *319*, 1244–1247.
- Trang, P., Medina, P.P., Wiggins, J.F., Ruffino, L., Kelnar, K., Omotola, M., Homer, R., Brown, D., Bader, A.G., Weidhaas, J.B., et al. (2010). Regression of murine lung tumors by the let-7 microRNA. *Oncogene* *29*, 1580–1587.
- Trang, P., Wiggins, J.F., Daige, C.L., Cho, C., Omotola, M., Brown, D., Weidhaas, J.B., Bader, A.G., and Slack, F.J. (2011). Systemic Delivery of Tumor Suppressor microRNA Mimics Using a Neutral Lipid Emulsion Inhibits Lung Tumors in Mice. *Mol. Ther.* *19*, 1116–1122.
- Tung, S.L., Boardman, D.A., Sen, M., Letizia, M., Peng, Q., Cianci, N., Dioni, L., Carlin, L.M., Lechler, R., Bollati, V., et al. (2018). Regulatory T cell-derived extracellular vesicles modify dendritic cell function. *Sci. Rep.* *8*, 6065.
- Uehara, A., Sato, T., Iwashiro, A., and Yokota, S. (2009). PR3-ANCA in Wegener's granulomatosis prime human mononuclear cells for enhanced activation via TLRs and NOD1/2. *Diagn. Pathol.* *4*, 23.
- Umezu, T., Tadokoro, H., Azuma, K., Yoshizawa, S., Ohyashiki, K., and Ohyashiki, J.H. (2014). Exosomal miR-135b shed from hypoxic multiple myeloma cells enhances angiogenesis by targeting factor-inhibiting HIF-1. *Blood* *124*, 3748–3757.
- Vaglio, A., Martorana, D., Maggiore, U., Grasselli, C., Zanetti, A., Pesci, A., Garini, G., Manganelli, P., Bottero, P., Tumiati, B., et al. (2007). HLA-DRB4 as a genetic risk factor for Churg-Strauss syndrome. *Arthritis Rheum.* *56*, 3159–3166.
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J.J., and Lötvall, J.O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* *9*, 654–659.
- Van Niel, G. (2003). Intestinal epithelial exosomes carry MHC class II/peptides able to inform the immune system in mice. *Gut* *52*, 1690–1697.
- Van Rossum, A.P., van der geld, Y.M., Limburg, P.C., and Kallenberg, C.G.M. (2005). Human anti-neutrophil cytoplasm autoantibodies to proteinase 3 (PR3-ANCA) bind to neutrophils. *Kidney Int.* *68*, 537–541.

- van der Veen, B.S., Chen, M., Muller, R., van Timmeren, M.M., Petersen, A.H., Lee, P.A., Satchell, S.C., Mathieson, P.W., Saleem, M.A., Stegeman, C.A., et al. (2011). Effects of p38 mitogen-activated protein kinase inhibition on anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody pathogenicity in vitro and in vivo. *Ann. Rheum. Dis.* *70*, 356–365.
- von Vietinghoff, S., Busjahn, A., Schönemann, C., Massenkeil, G., Otto, B., Luft, F.C., and Kettritz, R. (2006). Major Histocompatibility Complex HLA Region Largely Explains the Genetic Variance Exercised on Neutrophil Membrane Proteinase 3 Expression. *J. Am. Soc. Nephrol.* *17*, 3185–3191.
- Villa-Forte, A., Clark, T.M., Gomes, M., Carey, J., Mascha, E., Karafa, M.T., Roberson, G., Langford, C.A., and Hoffman, G.S. (2007). Substitution of Methotrexate for Cyclophosphamide in Wegener Granulomatosis: A 12-Year Single-Practice Experience. *Medicine (Baltimore)* *86*, 269–277.
- Villarroya-Beltri, C., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Cabo, F., Pérez-Hernández, D., Vázquez, J., Martín-Cofreces, N., Martínez-Herrera, D.J., Pascual-Montano, A., Mittelbrunn, M., and Sánchez-Madrid, F. (2013). Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat. Commun.* *4*, 2980.
- van der Vos, K.E., Abels, E.R., Zhang, X., Lai, C., Carrizosa, E., Oakley, D., Prabhakar, S., Mardini, O., Crommentuijn, M.H.W., Skog, J., et al. (2016). Directly visualized glioblastoma-derived extracellular vesicles transfer RNA to microglia/macrophages in the brain. *Neuro-Oncol.* *18*, 58–69.
- Voswinkel, J. (2005). B lymphocyte maturation in Wegener's granulomatosis: a comparative analysis of VH genes from endonasal lesions. *Ann. Rheum. Dis.* *65*, 859–864.
- Voswinkel, J., Assmann, G., Held, G., Pitann, S., Gross, W.L., Holl-Ulrich, K., Herlyn, K., and Mueller, A. (2008). Single cell analysis of B lymphocytes from Wegener's granulomatosis: B cell receptors display affinity maturation within the granulomatous lesions. *Clin. Exp. Immunol.* *154*, 339–345.
- Wagh, V., Urhekar, A., and Modi, D. (2017). Levels of microRNA miR-16 and miR-155 are altered in serum of patients with tuberculosis and associate with responses to therapy. *Tuberculosis* *102*, 24–30.
- Wallace, Z.S., Fu, X., Harkness, T., Stone, J.H., Zhang, Y., and Choi, H. (2019). All-cause and cause-specific mortality in ANCA-associated vasculitis: overall and according to ANCA type. *Rheumatology* *kez589*.
- Walsh, M., Flossmann, O., Berden, A., Westman, K., Höglund, P., Stegeman, C., Jayne, D., and European Vasculitis Study Group (2012). Risk factors for relapse of antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheum.* *64*, 542–548.
- Walsh, M., Merkel, P.A., Peh, C.-A., Szpirt, W.M., Puéchal, X., Fujimoto, S., Hawley, C.M., Khalidi, N., Floßmann, O., Wald, R., et al. (2020). Plasma Exchange and Glucocorticoids in Severe ANCA-Associated Vasculitis. *N. Engl. J. Med.* *382*, 622–631.
- Wang, C., Gou, S., Xu, P., Zhao, M., and Chen, M. (2013). Epitope analysis of anti-myeloperoxidase antibodies in propylthiouracil-induced antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Res. Ther.* *15*, R196.
- Wang, H., Tan, G., Dong, L., Cheng, L., Li, K., Wang, Z., and Luo, H. (2012). Circulating MiR-125b as a Marker Predicting Chemoresistance in Breast Cancer. *PLoS ONE* *7*, e34210.

- Wang, J., Tan, L., Tan, L., Tian, Y., Ma, J., Tan, C.-C., Wang, H.-F., Liu, Y., Tan, M.-S., Jiang, T., et al. (2015). Circulating microRNAs are promising novel biomarkers for drug-resistant epilepsy. *Sci. Rep.* *5*, 10201.
- Wang, S., Dong, X., Gao, J., and Wang, Z. (2018). Targeting Inflammatory Vasculature by Extracellular Vesicles. *AAPS J.* *20*, 37.
- Wang, X., Huang, W., Liu, G., Cai, W., Millard, R.W., Wang, Y., Chang, J., Peng, T., and Fan, G.-C. (2014). Cardiomyocytes mediate anti-angiogenesis in type 2 diabetic rats through the exosomal transfer of miR-320 into endothelial cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *74*, 139–150.
- Watanabe-Kusunoki, K., Abe, N., Nakazawa, D., Karino, K., Hattanda, F., Fujieda, Y., Nishio, S., Yasuda, S., Ishizu, A., and Atsumi, T. (2019). A case report dysregulated neutrophil extracellular traps in a patient with propylthiouracil-induced anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis: *Medicine (Baltimore)* *98*, e15328.
- Watts, R.A., Mahr, A., Mohammad, A.J., Gatenby, P., Basu, N., and Flores-Suárez, L.F. (2015). Classification, epidemiology and clinical subgrouping of antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis. *Nephrol. Dial. Transplant.* *30*, i14–i22.
- Weidner, S., Neupert, W., Goppelt-Struebe, M., and Rupperecht, H.D. (2001). Antineutrophil cytoplasmic antibodies induce human monocytes to produce oxygen radicals in vitro. *Arthritis Rheum.* *44*, 1698–1706.
- Weidner, S., Carl, M., Riess, R., and Rupperecht, H.D. (2004). Histologic analysis of renal leukocyte infiltration in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis: Importance of monocyte and neutrophil infiltration in tissue damage. *Arthritis Rheum.* *50*, 3651–3657.
- Wieczorek, S., Hellmich, B., Arning, L., Moosig, F., Lamprecht, P., Gross, W.L., and Eppelen, J.T. (2008). Functionally relevant variations of the interleukin-10 gene associated with antineutrophil cytoplasmic antibody-negative Churg-Strauss syndrome, but not with Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum.* *58*, 1839–1848.
- Wiggins, J.F., Ruffino, L., Kelnar, K., Omotola, M., Patrawala, L., Brown, D., and Bader, A.G. (2010). Development of a Lung Cancer Therapeutic Based on the Tumor Suppressor MicroRNA-34. *Cancer Res.* *70*, 5923–5930.
- Wikman, A., Lundahl, J., and Jacobson, S.H. (2008). Sustained Monocyte Activation in Clinical Remission of Systemic Vasculitis. *Inflammation* *31*, 384–390.
- Wilde, B., Thewissen, M., Damoiseaux, J., Hilhorst, M., van Paassen, P., Witzke, O., and Cohen Tervaert, J. (2012). Th17 expansion in granulomatosis with polyangiitis (Wegener's): the role of disease activity, immune regulation and therapy. *Arthritis Res. Ther.* *14*, R227.
- Williams, J.M., Pettitt, T.R., Powell, W., Grove, J., Savage, C.O.S., and Wakelam, M.J.O. (2007). Antineutrophil Cytoplasm Antibody–Stimulated Neutrophil Adhesion Depends on Diacylglycerol Kinase–Catalyzed Phosphatidic Acid Formation. *J. Am. Soc. Nephrol.* *18*, 1112–1120.
- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I., and Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat. Cell Biol.* *11*, 228–234.
- Witko-Sarsat, V., Lesavre, P., Lopez, S., Bessou, G., Hieblot, C., Prum, B., Noël, L.H., Guillevin, L., Ravaud, P., Sermet-Gaudelus, I., et al. (1999a). A large subset of neutrophils expressing membrane

- proteinase 3 is a risk factor for vasculitis and rheumatoid arthritis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *10*, 1224–1233.
- Witko-Sarsat, V., Cramer, E.M., Hieblot, C., Guichard, J., Nusbaum, P., Lopez, S., Lesavre, P., and Halbwachs-Mecarelli, L. (1999b). Presence of Proteinase 3 in Secretory Vesicles: Evidence of a Novel, Highly Mobilizable Intracellular Pool Distinct From Azurophil Granules. *Blood* *94*, 2487–2496.
- Wollert, T., and Hurley, J.H. (2010). Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* *464*, 864–869.
- Worthington, E.N., and Hagood, J.S. (2020). Therapeutic Use of Extracellular Vesicles for Acute and Chronic Lung Disease. *Int. J. Mol. Sci.* *21*, 2318.
- van der Woude, F.J., Rasmussen, N., Lobatto, S., Wiik, A., Permin, H., van Es, L.A., van der Giessen, M., van der Hem, G.K., and The, T.H. (1985). Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet Lond. Engl.* *1*, 425–429.
- Wubbolts, R., Leckie, R.S., Veenhuizen, P.T.M., Schwarzmann, G., Möbius, W., Hoernschemeyer, J., Slot, J.-W., Geuze, H.J., and Stoorvogel, W. (2003). Proteomic and Biochemical Analyses of Human B Cell-derived Exosomes: POTENTIAL IMPLICATIONS FOR THEIR FUNCTION AND MULTIVESICULAR BODY FORMATION. *J. Biol. Chem.* *278*, 10963–10972.
- Xiao, H., Heeringa, P., Hu, P., Liu, Z., Zhao, M., Aratani, Y., Maeda, N., Falk, R.J., and Jennette, J.C. (2002). Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice. *J. Clin. Invest.* *110*, 955–963.
- Xiao, H., Schreiber, A., Heeringa, P., Falk, R.J., and Jennette, J.C. (2007). Alternative complement pathway in the pathogenesis of disease mediated by anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies. *Am. J. Pathol.* *170*, 52–64.
- Xie, Y., Chen, Y., Zhang, L., Ge, W., and Tang, P. (2017). The roles of bone-derived exosomes and exosomal microRNAs in regulating bone remodelling. *J. Cell. Mol. Med.* *21*, 1033–1041.
- Xu, B., Zhang, Y., Du, X.-F., Li, J., Zi, H.-X., Bu, J.-W., Yan, Y., Han, H., and Du, J.-L. (2017). Neurons secrete miR-132-containing exosomes to regulate brain vascular integrity. *Cell Res.* *27*, 882–897.
- Yan, L., Hu, F., Yan, X., Wei, Y., Ma, W., Wang, Y., Lu, S., and Wang, Z. (2016). Inhibition of microRNA-155 ameliorates experimental autoimmune myocarditis by modulating Th17/Treg immune response. *J. Mol. Med.* *94*, 1063–1079.
- Yang, J.-M., and Gould, S.J. (2013). The cis-acting signals that target proteins to exosomes and microvesicles. *Biochem. Soc. Trans.* *41*, 277–282.
- Yang, M., Chen, J., Su, F., Yu, B., Su, F., Lin, L., Liu, Y., Huang, J.-D., and Song, E. (2011). Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells. *Mol. Cancer* *10*, 117.
- Yates, M., Watts, R.A., Bajema, I.M., Cid, M.C., Crestani, B., Hauser, T., Hellmich, B., Holle, J.U., Laudien, M., Little, M.A., et al. (2016). EULAR/ERA-EDTA recommendations for the management of ANCA-associated vasculitis. *Ann. Rheum. Dis.* *75*, 1583–1594.

- Ye, H., Gao, Y., Guo, X.-H., and Zhao, M.-H. (2005). Titre and affinity of propylthiouracil-induced anti-myeloperoxidase antibodies are closely associated with the development of clinical vasculitis. *Clin. Exp. Immunol.* *142*, 116–119.
- Yoda, M., Kawamata, T., Paroo, Z., Ye, X., Iwasaki, S., Liu, Q., and Tomari, Y. (2010). ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 17–23.
- Yuan, X., Berg, N., Lee, J.W., Le, T.-T., Neudecker, V., Jing, N., and Eltzhig, H. (2018). MicroRNA miR-223 as regulator of innate immunity. *J. Leukoc. Biol.* *104*, 515–524.
- Zhang, H., Kolb, F.A., Jaskiewicz, L., Westhof, E., and Filipowicz, W. (2004). Single Processing Center Models for Human Dicer and Bacterial RNase III. *Cell* *118*, 57–68.
- Zhang, J., Zhou, W., Liu, Y., Liu, T., Li, C., and Wang, L. (2018). Oncogenic role of microRNA-532-5p in human colorectal cancer via targeting of the 5'UTR of RUNX3. *Oncol. Lett.* *15*, 7215–7220.
- Zhang, Y., Liu, D., Chen, X., Li, J., Li, L., Bian, Z., Sun, F., Lu, J., Yin, Y., Cai, X., et al. (2010). Secreted Monocytic miR-150 Enhances Targeted Endothelial Cell Migration. *Mol. Cell* *39*, 133–144.
- Zhang, Y., Wang, Z., and Gemeinhart, R.A. (2013). Progress in microRNA delivery. *J. Controlled Release* *172*, 962–974.
- Zhao, L., David, M.Z., Hyjek, E., Chang, A., and Meehan, S.M. (2015). M2 Macrophage Infiltrates in the Early Stages of ANCA-Associated Pauci-Immune Necrotizing GN. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* *10*, 54–62.
- Zhu, L. (2014). Novel method for extracting exosomes of hepatocellular carcinoma cells. *World J. Gastroenterol.* *20*, 6651.
- Zhu, C., Ren, C., Han, J., Ding, Y., Du, J., Dai, N., Dai, J., Ma, H., Hu, Z., Shen, H., et al. (2014). A five-microRNA panel in plasma was identified as potential biomarker for early detection of gastric cancer. *Br. J. Cancer* *110*, 2291–2299.
- Zhuang, G., Wu, X., Jiang, Z., Kasman, I., Yao, J., Guan, Y., Oeh, J., Modrusan, Z., Bais, C., Sampath, D., et al. (2012). Tumour-secreted miR-9 promotes endothelial cell migration and angiogenesis by activating the JAK-STAT pathway. *EMBO J.* *31*, 3513–3523.
- Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., and Amigorena, S. (1998). Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell derived exosomes. *Nat. Med.* *4*, 594–600.
- Zou, X., Gu, D., Zhang, G., Zhong, L., Cheng, Z., Liu, G., and Zhu, Y. (2016). NK Cell Regulatory Property is Involved in the Protective Role of MSC-Derived Extracellular Vesicles in Renal Ischemic Reperfusion Injury. *Hum. Gene Ther.* *27*, 926–935.

Titre : Micro-ARNs de neutrophiles dans les vascularites associées aux ANCA

Mots clés : Vascularites associées aux ANCA, neutrophiles, cellules endothéliales, vésicules extracellulaires, micro-ARNs

Résumé :

L'activation des polynucléaires neutrophiles par les ANCA (anticorps anti-cytoplasme de neutrophiles) est un élément clé de la pathogenèse des lésions endothéliales observées au cours des vascularites associées aux ANCA (VAA).

Nous avons démontré que ces cellules pouvaient relarguer des vésicules extracellulaires (VE) capables de transférer à des cellules microvasculaires les miR-223, miR-142-3p et miR-451 suite à l'activation par des ANCA.

Nous avons montré un impact délétère du transfert des miR-142-3p et miR-451 à travers des modèles *in vitro* de surexpression de ces micro-ARNs et de coincubation de VE et de cellules microvasculaires

transfectées avec des inhibiteurs de ces micro-ARN. Cet impact se traduit par une induction de l'apoptose, de la sécrétion de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires, et par des modifications de la signalisation intracellulaires, et notamment l'inhibition de gènes pro-angiogéniques.

Ces résultats ont été appuyés par une étude du profil d'expression de ces micro-ARN dans des biopsies de patients.

Title : Neutrophil-derived micro-RNAs in ANCA-associated vasculitis

Keywords : ANCA-associated vasculitis, neutrophils, endothelial cells, extracellular vesicles, micro-RNAs

Abstract :

Activation of neutrophils by ANCA (Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies) is a key feature of microvascular endothelial cell (EC) damage in ANCA-associated vasculitis (AAV).

Here, we demonstrate that upon ANCA activation, neutrophils release extracellular vesicles (EVs) that are able to transfer of miR-223, miR-142-3p and miR-451 to microvascular EC.

We have shown a deleterious impact of miR-142-3p and miR-451 *in vitro*, both in models of overexpression of these microRNAs and coincubation of EVs with EC transfected with specific inhibitors of these miRNA. This impact is characterized by increase of apoptosis, secretion

of proinflammatory chemokines and cytokines, and inhibition of pro-angiogenic genes expression.

These results were backed up by a study of the expression profile of these micro-RNAs in patients biopsies.