

**Identification des sous-populations des vésicules extracellulaires qui
contiennent le miR-451 et modification de leur distribution dans les organes**

Adnie Etienne

Une thèse soutenue en conformité partielle avec les exigences de
Maîtrise en médecine cellulaire et moléculaire

Département de Médecine Cellulaire et Moléculaire
Faculté de Médecine
Université d'Ottawa

Résumé

Contexte : Les vésicules extracellulaires (VE), très étudiées ces dernières années, possèdent des potentialités très prometteuses pour la médecine de nos jours, dans le diagnostic et le traitement des maladies. Cependant, leur diversité, en termes de contenu et d'origine cellulaire, influence leur comportement et leur cible. Par conséquent, il est important d'étudier des différentes façons que les VE peuvent agir face à des modifications en vue d'être plus spécifique dans les choix de VE pour une cible déterminée.

Méthode : Des modifications géniques et biochimiques, basées respectivement sur la méthode CRISPR (TSG101 Knock out), l'inhibition enzymatique (nSMase 2) et la méthode de Gibson (IGF1R5-H2), ont été apportées sur des cellules HEK293T. Les VE de ces cellules modifiées ont été ensuite étudiées en termes de nombre, de taille et de contenu en certains marqueurs protéiques et micro-ARN d'une part, et injectées aux souris, d'autre part, afin d'observer leur préférence de distribution.

Résultats : Ici nous rapportons que les cellules avec TSG101 Knock out et inhibition de la nSMase 2 ont une production moindre de VE d'environ 50%. Ces VE sont de plus grande taille avec une diminution de certains marqueurs protéiques et un enrichissement en miR-451 diminué. Les VE des cellules H2 ont une plus grande absorption au cerveau comparativement aux VE des cellules U118 et HEK293T.

Conclusion : Notre étude a démontré que des sous-populations de VE peuvent être différenciées à partir de la déplétion de gène ou l'inhibition d'enzyme pour la non-expression de protéines réputées d'être importantes pour leur production. Par ailleurs, des modifications cellulaires pour l'expression de certains anticorps produisent des VE avec une affinité particulière.

Contributions

Cette thèse a été écrite par moi, Adnie Etienne, et éditée par mon superviseur, le Dr Derrick Gibbings avant la soumission. Dr Derrick Gibbings a conceptualisé le projet initial et m'a orienté dans les procédures tout au long de l'exécution du projet.

Toutes les procédures expérimentales ont été effectuées par moi-même, à l'exception de celles énumérées ci-dessous :

Dr Alexandre Savard a effectué les injections aux souris, m'a accompagné dans l'extraction des organes et l'acquisition des images et les données de fluorescence à partir de IVIS.

Dr Kallol Dutta a procédé au FFT et à l'acquisition des images de microscopie validant l'expression de Flag et du CD31 dans le tissu cérébral des souris à l'aide du Zeiss AxioImager M2.

Dr James Taylor a confectionné les cellules HEK293T-IGFR.

Dédicaces

Je dédie cette thèse :

A mon cher époux, Widner ARISTE, qui m'a toujours encouragé dans la poursuite de mes rêves et qui m'a été d'un soutien inestimable tout au long de ce parcours.

A mon adorable petit garçon, Wedner ARISTE, qui m'a apporté tant de joie et de détermination dans la poursuite de mes objectifs.

A ma tendre mère, Louise Maude VICTOR, femme courageuse qui a été toujours là pour moi et qui m'a soutenue de manière inconditionnelle. Sans elle je ne serai pas ce que je suis aujourd'hui.

A ma chère petite sœur, Maudnie ETIENNE, qui m'a toujours encouragée.

A ma belle-famille, Mirlande GUILLAUME, Wilson ARISTE, Dario et Jenner ARISTE pour leurs prières et leurs mots d'encouragements.

Reconnaissance

Je ne saurais commencer cette partie témoignant de ma reconnaissance sans d'abord remercier Dieu. Il est ma source et je ne puis tout que par lui qui me fortifie.

Je remercie mon superviseur Dr Derrick Gibbings, qui m'a d'abord accepté dans son laboratoire quoique toutes les difficultés liées à la pandémie. Il a, tout au long de ce parcours, été très patient avec moi comme noviste dans le domaine de la recherche scientifique. J'ai apprécié vos conseils et votre accompagnement tout au long de ce trajet.

Je suis également reconnaissant à mes membres du TAC, Dre Marceline Côté et Dr Yannick Benoît, d'avoir toujours été compréhensifs et d'avoir fourni commentaires clés lors de nos réunions annuelles.

Je remercie chaque membre, passés et actuels, du laboratoire (Olanta Negeri, Ryan Reshke, Daniela Sosa-Miranda, Yunping Xue, James Taylor, Kallol Dutta, Charlotte Manser, Huishan Guo, Alexandre Savard, Kaela O'Connor, Angelica Tristani, Nicholas Valentino, Thomas Barry) qui ne se sont jamais lassés de m'orienter et de m'apporter leur aide. Je ne saurais faire ce parcours sans vos supports.

Un grand merci à mon mari qui a toujours cru en moi, même quand je suis découragée et que je perds confiance en moi-même. Il m'a toujours soutenue, conseillée et encouragée.

Merci également à chaque membre de ma famille, particulièrement ma mère, et ma belle-famille pour vos prières, vos mots d'encouragements et la fierté que vous me manifestez.

Merci à mes amis,es du cycle secondaire, des écoles des sciences infirmières et de Médecine, ainsi que mes anciens et anciennes collègues de travail. Même quand on est loin, vos coups de fils d'encouragements me vont droit au cœur. J'évite de citer des noms pour ne pas faire des jaloux.

Table des matières

Résumé.....	II
Dédicaces.....	IV
Reconnaissance.....	V
Table des matières.....	VI
Liste des abréviations	IX
Chapitre 1 : INTRODUCTION	1
1.1Vésicules extracellulaires et biogenèse	3
1.1.1Exosomes.....	4
1.1.2 Microvésicules	7
1.1.3Corps apoptotiques	8
1.2Exosomes et Composition	8
1.2.1Contenu en protéine.....	9
1.2.2Contenu en lipide	10
1.2.3Contenu en acides nucléiques.....	10
1.3Rôles/importance des exosomes	11
1.3.1Exosomes et conditions physiologiques	11
1.3.2Exosomes et Maladies	12
1.3.3 Exosomes et Diagnostic.....	15
1.3.3Exosomes et Traitement	16
1.4 Hétérogénéité et sous-type d'exosomes	18
1.4.1 Différence de taille	19
1.4.2 Différence de contenu	19
1.4.3 Différence d'impact fonctionnel	20
1.4.4 Différence d'origine cellulaire.....	20
1.5.1 Micro-ARN 451 (miR-451).....	22
1.5.2 Micro-ARN-16 (miR-16) et U6.....	23
1.6 VE, distribution in vivo	24
1.6.1 VE et BHE	24
1.7 Résumé	26
1.8 Hypothèses	27
Chapitre 2 : MÉTHODE	28
2.1 Lignées cellulaires	28
2.2 Culture cellulaire	29

2.3 Production de cellules TSG101 KO	29
2.3.1 Méthode CRISPR-Cas9	29
2.4 Production de cellules N-SMase 2 (-).....	31
2.5 Production des cellules H2, H3 et F5.....	32
2.6 Western blot	33
2.7 Purification de VE (ultracentrifugation et FFT).....	37
2.8 L`analyse de suivi des nanoparticules (NTA)	40
2.9 RT- qPCR pour VE (Mitscript)	41
2.10 Injections de VE aux souris.....	45
2.11 Test statistiques	47
Chapitre 3 : RÉSULTATS	49
3.1 Modifications géniques et enzymatiques des cellules et répercussions sur les VE	49
3.1.1 Des marqueurs de VE ont été identifiés et différenciés de ceux des cellules.....	50
3.1.2 Production et validation des cellules TSG101 Knock Out	52
3.1.3 Le KO du TSG101 diminue la production de VE et modifie leur taille.....	53
3.1.4 Le KO du TSG101 diminue l`abondance d`autres marqueurs protéiques.....	55
3.1.5 L`absence du gène TSG101 dans les cellules modifie l`enrichissement du micro-ARN 451 dans les VE.....	56
3.1.6 Production et validation de cellules avec inhibition de la sphingomyélinase 2 neutre (nSMase2) par l`utilisation du siARN SMPD3	59
3.1.7 L`inhibition de la nSMase2 par le siARN SMPD3 dans les cellules affecte négativement la production des VE.....	60
3.1.8 L`inhibition de la nSMase2 diminue l`expression de certains marqueurs.....	62
3.1.9 L`inhibition de la nSMase2 par le siARN SMPD3 diminue l`abondance du miR-451 dans les VE.....	64
3.2 Ingénierie de la distribution des VE du sang vers le cerveau	76
3.2.1 Injection de VE aux souris	76
Discussion 2	81
Chapitre 4 : DISCUSSION	85
4.1 Limitations et directions futures.....	92
Chapitre 5 : CONCLUSION	94
REFERENCES	96

Liste des figures

Tableau 1 : Liste des anticorps

Tableau 2 : Séquences de micro-ARN

Figure 1 : Caractéristiques des vésicules extracellulaires

Figure 2 : Identification de certains marqueurs de VE

Figure 3 : Production et validation de cellules TSG101 KO

Figure 4 : Le KO du TSG101 diminue la production de VE et modifie leur taille

Figure 5 : Le KO du TSG101 diminue l'abondance d'autres marqueurs protéiques

Figure 6 : L'absence du gène TSG101 dans les cellules modifie l'enrichissement du miR-451 dans les VE

Figure 7 : Les niveaux des micro-ARN 16 et U6 sont légèrement modifiés dans les VE TSG101 KO

Figure 8 : Production et validation de cellules avec inhibition de la SMase 2

Figure 9 : L'inhibition de la SMase 2 dans les cellules affecte négativement la production de VE

Figure 10 : L'inhibition de la SMase 2 diminue l'expression de certains marqueurs

Figure 11 : L'inhibition de la SMase 2 diminue l'abondance du miR-451 dans les VE

Figure 12 : Les niveaux des micro-ARN 16 et U6 sont légèrement modifiés dans les VE avec SMase 2 inhibé

Figure 13 : Injection de VE aux souris

Figure 14 : Injection de VE de cellules U118, une absorption diminuée dans le cerveau

Figure 15 : Vérification de la présence de la protéine Flag dans les cellules et les VE H2

Figure 16 : Injection de VE de cellules H2, une meilleure absorption dans le cerveau

Figure 17 : Microscopie, les VE H2 sont identifiées dans le tissu cérébral

Liste des abréviations

ADN:	Acide Désoxyribonucléique
ADNdb:	ADN double brin
ADNmt:	ADN mitochondrial
ADNss:	AND simple brin
AGO2:	Protéine argonaute 2
ALIX :	Protéine d'interaction de mort cellulaire programmée 6
ARF6:	<i>ADP-ribosylation factor 6</i>
ARN:	Acide ribonucleique
ARNm:	ARN messenger
BSA:	Bovine Serum Albumin
CRISPR:	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
DAPI:	diamidino-2-phenylindole
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ESCRT :	Système de Tri Endosomique Requis pour le Transport
ETP :	Endosomes de Tri Précoce
ETT :	Endosomes de Tri tardif
FBS :	Fœtal Bovine Serum
FFT :	Filtration par Flux Tangentiel
GFP:	Green Fluorescent Protein
HEK :	Cellules rénales embryoniques humaines
HnRNP:	Heterogenous nuclear Ribonucleoproteins
HRP:	Horse Radish Peroxidase
HSP:	Protéines de choc thermique
IGFR:	Insulin-like growth factor receptor
KDa:	Kilo Dalton
KO:	Knock Out
LC3:	Microtubule associated protein 1A/1B-light chain 3

Mfge8:	Milk fat globule-EGF factor 8 protein
miR:	micro-ARN
MV:	Microvésicules
MVB:	corps multi-vésiculaires
N-SMase:	Sphingomyelinase neutre
NTA:	Nanoparticles Tracking
OCT:	Optimal Cutting Temperature
OPTIMEM:	Reduced Serum Medium
PBS:	Phosphate Buffered Saline
PFA :	Paraformaldéhyde
PS :	Pénicilline-Streptomycine
pVE :	petites Vésicules Extracellulaires
RMT :	Transcytose médiée par les récepteurs
RT-qPCR :	Reverse Transcriptase-quantitative Polymerase Chain Reaction
SEM:	Standard Error Mesure
sgRNA:	ARN guide unique
siARN:	ARN court interférent
SMPD3:	Sphingomyelin Phosphodiesterase 3
SNC:	Systeme Nerveux Central
SOD1:	Superoxyde Dismutase 1
TBS:	Tris Buffered Salin
TBST:	Tris Buffered Salin + Twenn 20
TDP-43:	TAR DNA-binding Protein 43
TSG101 :	Gene de susceptibilité aux tumeurs 101
U118 :	Humain Brain Glioma cells
VE :	Vésicules Extracellulaires
VIL :	Vésicules Intraluminales
VPS4B :	Vacuolar Protein Sorting 4B
WT :	Type sauvage

Chapitre 1 : INTRODUCTION

La cellule est une unité complexe, constituée d'organites et de molécules de nature chimique et biologique qui interagissent, se libèrent et s'absorbent pour le bon fonctionnement de cette dernière. Ces divers organites et molécules peuvent s'organiser en différents appareils ou systèmes, soit pour la nutrition, la respiration, la communication ou l'élimination de déchets dans le but de maintenir l'homéostasie cellulaire. Ces systèmes peuvent se comporter différemment, dépendamment de la situation physiologique ou pathologique dans laquelle se trouve la cellule, et la libération de molécules dans le milieu extracellulaire peut être témoin de l'état de la cellule.¹

Durant ces deux dernières décennies, les diverses études portées sur la structure et le fonctionnement de la cellule ont permis de faire la découverte de la présence de petites vésicules relarguées par les cellules. Ces vésicules dites extracellulaire (VE) jouent un rôle très important en débarrassant la cellule de ses déchets et en maintenant l'homéostasie cellulaire. Elles assurent également la communication intercellulaire - caractéristique essentielle de tout organisme multicellulaire - tout en modifiant le comportement biologique d'une cellule à une autre. Cette communication assurée par les VE est effectuée non seulement entre les cellules qui sont rapprochées ou faisant partie d'un même tissu (signalisation juxtacrine), mais également entre les cellules éloignées ou faisant partie de tissus ou d'organes différents (signalisation paracrine et endocrine). Cette potentialité des VE, prometteuse pour l'évolution de la médecine, leur a valu leur utilisation dans différentes méthodes de diagnostic et sont très convoitées comme étant des potentiels outils de traitement de maladies.^{11,15}

Les VE sont libérées par tous les types de cellules (eucaryotes et procaryotes), que celles-ci soient dans des conditions de physiologie normale ou d'anomalies. Leur production est

influencée par des facteurs de croissance de la cellule et est adaptée en fonction des besoins de celle-ci. Elles sont échangées entre les cellules et sont divisées en 3 sous- principaux types qui sont les microvésicules (MV), les corps apoptotiques et les exosomes.⁴

Les exosomes ou petites vésicules extracellulaires (pVE) font partie des véhicules électriques de la cellule, avec une taille moyenne de 100nm (40 à 160 nm), et sont formés à partir de l'invagination de la membrane endosomale des corps multivésiculaires (MVB). En se croisant avec d'autres vésicules et organites dans la cellule, les MVB vont se charger de différentes biomolécules fonctionnelles, d'où la diversité des composants des exosomes. Ces MVB vont se fusionner avec la membrane plasmique pour procéder au relargage de leurs vésicules intraluminales (VIL) - futurs exosomes - dans le milieu extracellulaire. Ce phénomène conduit à leur absorption par d'autres cellules et ils parviennent à influencer divers aspects biologiques de ces cellules receveuses.²

Par ailleurs, des études ont pu prouver que les exosomes peuvent se comporter différemment en ce qui a trait à leur voie de biogenèse, leur composition moléculaire, leur taille, leur tropisme régulé par l'expression de leurs marqueurs et leurs récepteurs de surface. Ces caractéristiques non unanimes ont amené à définir différentes sous-populations de VE, avec des contenus, des rôles et des potentialités distincts.^{2,4,5}

Notre étude a pour but de déterminer, d'une part, certains comportements des exosomes en termes de contenu, de taille et de nombre en procédant par certaines modifications de la cellule. D'un autre côté, l'affinité des exosomes pour les organes n'est pas uniforme, leur bio distribution dépend de leur composition moléculaire, de leurs protéines membranaires et du type de cellule d'où ils proviennent.²⁰ Par conséquent, nous voulons déterminer la distribution préférentielle

d'exosomes purifiés à partir de différentes catégories de cellules. Ce qui nous permettra d'élucider quels types d'exosomes sont plus à même de s'accumuler dans un organe, tandis qu'ils seraient moindres ou négligeables dans un autre.

Un défi majeur dans les études sur les VE consiste en l'incapacité à séparer les exosomes des microvésicules. Cela est dû au manque de méthodes d'isolation spécifiques des VE,¹⁶ d'où notre utilisation des 2 termes, exosomes et VE, tout au long du texte.

1.1 Vésicules extracellulaires et biogénèse

Les mécanismes cellulaires impliqués dans la formation des VE diffèrent entre les exosomes, les MV et les corps apoptotiques, cependant, certains de ces mécanismes peuvent être partagés.¹⁵ Elles présentent, toutefois, des caractéristiques communes telles que leur libération dans le milieu extracellulaire, ainsi que leurs contenus en lipides, protéines et acides nucléiques spécifiques qu'elles sont susceptibles de partager avec les autres cellules. Ce qui justifie leur utilité dans le bio-marquage des processus pathologiques et dans la vésiculothérapie.¹⁹

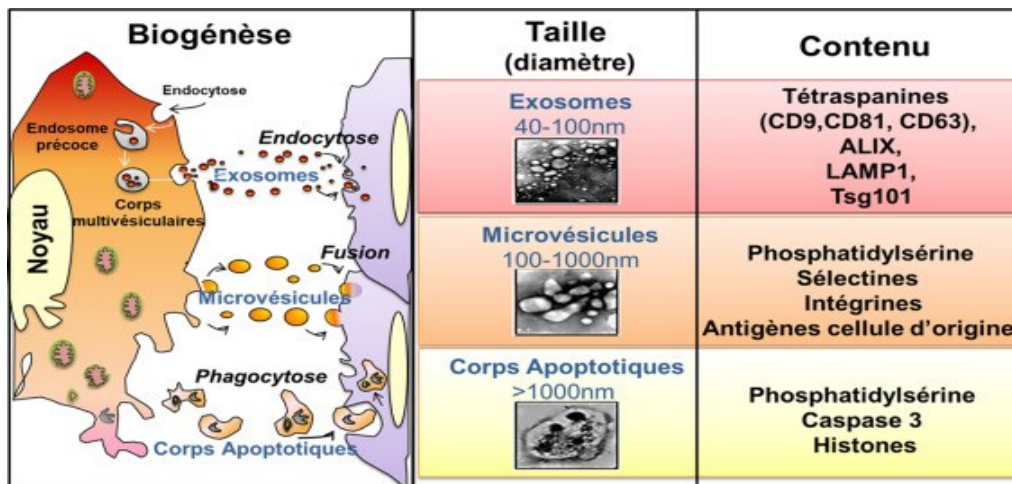


Figure 1. Caractéristiques des vésicules extracellulaires. Représentation schématisée des différents types de vésicules extracellulaires de la formation des vésicules extracellulaires et classification en fonction de leur biogénèse, leur taille et leur contenu. ALIX : Protéine d'interaction de mort cellulaire programmée 6 ; LAMP1 : Protéine membranaire associée aux lysosomes 1 ; Tsg101 : Gène de sensibilité aux tumeurs 101.⁹⁸

1.1.1 Exosomes

La formation des exosomes provient d'une double invagination de la membrane endosomale des corps multivésiculaires et sont libérés par exocytose dans le milieu extracellulaire après fusion avec la membrane cytoplasmique. En effet, le processus commence par une première invagination de la membrane plasmique qui va former une structure en forme de coupe. Cette structure, constituée de protéines de surface et de protéines extracellulaires, va se transformer en endosomes de tri précoce (ETP). A ce stade, l'appareil de Golgi ainsi que le réticulum endoplasmique rentrent en jeu en contribuant à la formation et au contenu des ETP. Ces derniers peuvent par la suite fusionner avec d'autres ETP préexistants et murir en endosomes de tri tardif (ETT) pour former les corps multivésiculaires encore appelés endosomes multivésiculaires (EMV). Ce processus se fait par invagination vers l'intérieur de la membrane limitante endosomale d'où la double invagination. Ces EMV sont constitués de plusieurs petites vésicules intraluminales (VIL), ce sont de futures exosomes qui seront libérés dans le milieu extracellulaire lorsque les EMV se fusionnent avec la membrane plasmique. Dans le cas où ces EMV fusionnent avec les lysosomes ou les autophagosomes, ils seront complètement dégradés.¹¹ Les exosomes fraîchement relargués dans le milieu extracellulaire peuvent provenir d'une production croisée d'exosomes endogènes ou recyclés, car la cellule qui produit des exosomes en reçoit également et les deux voies peuvent être coïncidées.⁵⁷

Il y a plusieurs voies qui ont été démontrées importantes pour une production d'au moins une partie des exosomes, comme le céramide (nSMase2)³⁹, les ESCRT (Tsg101)¹⁰⁵, ARF6 (*ADP-ribosylation factor 6*)⁴¹, ou Syntenin-1.²² Cependant, la sécrétion de VE n'est pas inhibée entièrement par une déplétion des sous unités ESCRT ou des autres voies de biogenèse, bien que

des modifications morphologiques et de cargaison des VE soient observées dans ce cas, d'où, également, une hétérogénéité.³⁸

1.1.1.1 Le système de tri endosomale

Le complexe de tri endosomique requis pour le transport (ESCRT) régule la formation des MVB et joue également un rôle important dans l'emballage des biomolécules dans les VE. Cependant, les cellules dépourvues ou appauvries en complexe ESCRT sont quand même parvenues à la formation des MVB, ce qui laisse penser qu'il y a une voie de production des VE non régulée par le complexe ESCRT.² De ce fait, la curiosité de découvrir d'autres voies de formation des VE a été suscitée et on est parvenu à la découverte de voies qui sont tantôt dépendantes tantôt alternatives ou indépendantes à la voie ESCRT.⁴³

a. Voie dépendante de ESCRT

Classiquement, la machinerie ESCRT est recrutée au site de formation des exosomes. Cette machinerie est composée d'un ensemble de 30 protéines environ, s'organisant 4 complexes (0-III), y compris d'autres protéines associées. Chacun de ces complexes assure un rôle bien défini dans le processus de formation des VE. Le complexe ESCRT-0 joue le rôle de reconnaissance et de séquestration des protéines transmembranaires, les complexes ESCRT- I et II assurent la déformation de la membrane et le triage de la cargaison, tandis que le complexe ESCRT- III entraîne la scission des vésicules.^{10,18} Toutefois, cette voie quoique dépendante de ESCRT peut être initiée par les protéines tétraspaniques, notamment le CD63 qui s'accumule dans les endosomes au début de la biogenèse.¹³

b. Voie indépendante de ESCRT

L'inactivation d'un ou des 4 complexes ESCRT n'élimine pas la possibilité pour la cellule

de générer des VE, car d'autres molécules comme des lipides, des tétraspanines ou des protéines de choc thermique ont la propriété d'induire la sécrétion d'exosomes.^{21,38,40} En effet, dans certains types de cellule, le tétraspanine CD63 - qui est très enrichi dans le milieu intracellulaire et localisé majoritairement dans les endosomes et les lysosomes tardifs - assure le tri pour la formation des MVB et s'accumule dans les VIL.^{13,37,38} Aussi, les enzymes sphingomyélinase neutre (nSMase) et phospholipase D2 pour l'hydrolyse, respectivement, de la sphingomyéline en céramide et la phosphatidylcholine en acide phosphatidique, assurent-elles le bourgeonnement vers l'intérieur et la formation des VIL en générant des lipides au niveau de la membrane limitante des MVB.^{11,12}

Par ailleurs, la composition et la proportion de la céramide par rapport aux autres lipides membranaires comme le cholestérol, sont essentiels à la formation et à l'excrétion des VE par une voie indépendante de l'ESCRT. Par conséquent, la suppression ou la modification de la céramide dans la cellule, par l'utilisation d'un anticorps ou d'un siARN anti-céramide nuit au bourgeonnement intraluminal des VE.^{11,19} De même qu'une déplétion du TSG101 réduit l'excrétion d'exosomes dans diverses cellules.⁴

On a également la voie synténine-syndécan-Alix, au cours de laquelle le bourgeonnement de la membrane endosomale dépend de l'interaction de la synténine avec Alix ainsi que de la présence du sulfate d'héparane.^{12,22} En effet, ce trio endosomal est impliqué dans la production d'une classe d'exosomes avec un contenu spécifique et son appauvrissement altère la production d'exosomes. Cette voie a, cependant, un lien interdépendant avec la protéine CD63 qui en dépend pour son accumulation dans les VIL. Le TSG101, protéine du complexe ESCRT I dont l'inactivation réduit la production de synténine et de syndécan, influence aussi cette voie, d'où son rôle clé dans la biogenèse d'exosomes synténin-syndécan.²²

Ces observations laissent prétendre qu'il y aurait de temps à autre des réactions croisées entre les différentes voies de biogenèse des exosomes et justifient le fait que l'absence totale de l'une d'entre elles ne compromet pas la production d'exosomes.

1.1.2 Microvésicules

La biogenèse des MV n'est pas assez définie. Elles diffèrent des exosomes principalement par leur mode de formation et leur taille. Cependant, pour une grande majorité, leurs tailles se chevauchent, ce qui rend difficile leur différenciation lors des centrifugations différentielles (entre 10 000 x g et 20 000 x g pour les MV, et jusqu'à 100 000 x g pour les exosomes).¹⁹ De ce fait, la technique de référence utilisée pour les identifier et les différencier est la microscopie.⁴⁰ Par ailleurs, l'immuno capture est un outil important permettant de les distinguer du fait que les MV et les exosomes possèdent des signatures protéiques différentes dues à leurs origines intracellulaires différentes.¹⁵⁰

Ces petites vésicules, d'une taille allant de 100 à 1000nm, font partie des ectosomes, à côté des microparticules et des vésicules de grande taille. Leur biogenèse consiste en un pincement de la surface de la membrane plasmique, suivi de fission et bourgeonnement vers l'extérieur. Ces fragments de membrane, une fois dans le milieu extracellulaire avec leur cargaison en protéines et en lipides spécifiques représentant leur cellule d'origine, procèdent également à la livraison de leur contenu aux cellules réceptrices. Elles sont, par conséquent, des vecteurs d'informations biologiques participant dans l'échange intercellulaire. Elles sont libérées par tous les types de cellules et peuvent servir de biomarqueurs avec une pertinence clinique pour les maladies cardiovasculaires notamment.⁹⁸

1.1.3 Corps apoptotiques

D'autres fragments subcellulaires sont générés au cours du processus d'apoptose cellulaire et sont appelés corps apoptotiques. Ces derniers ont un diamètre allant de 50 à 5000nm et contiennent également des acides ribonucléiques, des fragments de noyaux, des protéines histones et certains organites intacts. Leur rôle consiste à présenter ce cargo de molécules immunogènes aux macrophages pour déclencher la mort cellulaire programmée des cellules défectueuses, d'où leur importance dans la régulation de la fonction immunitaire.^{99,100,161}

1.2 Exosomes et Composition

Les exosomes sont constitués de diverses biomolécules fonctionnelles comme des lipides, des protéines intracellulaires et de surface cellulaire, des métabolites et des acides nucléiques. Ces constituants sont de même nature que ceux de la cellule mère d'où proviennent les exosomes et sont donc différents, d'un type d'exosomes à d'autres, selon la nature de la cellule d'origine.¹¹⁵

Quoique provenant de diverses cellules, les exosomes ont en communs certaines caractéristiques comme la présence de tétraspanines (CD9, CD63, CD81), de différentes catégories de protéines comme celles de liaisons et de transport membranaire (Annexines, GTPase, protéines de Rab), de biogenèse (TSG101, Alix), de choc thermique (Hsp 60, Hsp 70 et Hsp 90), ainsi que des acides nucléiques (ADN, ARN) et des lipides (cholestérol, céramides).¹⁰¹

De même, d'un type de cellule peuvent provenir des exosomes avec des contenus, des expressions et des rôles différents. Cette diversité est non seulement liée à leurs caractéristiques biochimiques et physiques (Sédimentation, taille, densité), mais également à leur voie de biogenèse qui peut être dépendante (Tsg101, Alix) ou indépendante (céramide, sphingomyélinase 2), de la machinerie ESCRT, ainsi que la présence de tétraspanines différents (CD9, CD63).¹⁰²

Par ailleurs, certaines conditions de la cellule influencent la nature du contenu des exosomes comme c'est le cas dans les situations d'hypoxie (présence de tumeur ou de lésion vasculaire), ou la composition en protéines et en ARN est modifiée dans les exosomes des cellules endothéliales, par exemple.⁹

1.2.1 Contenu en protéine

La teneur en protéine a été le premier contenu à être étudié depuis la découverte des VE. On a utilisé diverses méthodes de détection des protéines comme le Western Blot, SDS-PAGE, immunotransfert, l'immuno-EM, la digestion à la trypsine, la cartographie de masse peptidique, ainsi que l'analyse protéomique. Cette dernière permet une identification à plus grande échelle des protéines contenues dans les VE.⁵ Ces méthodes ont permis de réaliser que le protéome des VE est différent en fonction du type de VE (exosomes, corps apoptotiques, microvésicules), bien qu'il n'y ait pas un marqueur protéique spécifique pour différencier les exosomes des corps apoptotiques par exemple.⁵ Cette différence dans le contenu protéique est particulièrement liée à la diversité des voies de formations des VE, par exemple, les exosomes contiennent des protéines associées aux endosomes telles que le Rab, GTPase, SNARE, Annexines, Flotilline, Alix, TSG101 qui sont pour la plupart impliquées dans la biogenèse des MVB.¹⁵ Cependant, l'analyse protéomique des VE d'une même source de cellule peut être différente dépendamment de la méthode d'isolement utilisée. De ce fait, les caractéristiques protéiques des VE peuvent se croiser lors d'une analyse protéomique en raison du manque de méthodes d'isolement et d'analyse standardisées.²

Il existe cependant un ensemble de protéine qui semble être présentes dans toutes les VE provenant de quel que soit le type de cellule. Ce sont les protéines du complexe ESCRT (0-III) et les protéines dites accessoires : ALIX (protéine X interagissant avec le gène 2 lié à l'apoptose), TSG101 (gène de susceptibilité aux tumeurs 101), HSP70 (Protéine de choc thermique 70). Cet

ensemble de protéines constitue également des marqueurs spécifiques des VE, tandis que d'autres protéines constituent un sous-ensemble spécifique de certaines VE provenant d'un type de cellule bien déterminé.¹⁰³

1.2.2 Contenu en lipide

Le peu d'études réalisées sur la composition lipidique des VE ont permis de mettre en évidence un enrichissement en cholestérol, en céramide et en sphingomyéline. En effet, le cholestérol, joue un rôle crucial dans le devenir des corps multivésiculaires à l'origine des VE. La teneur en cholestérol de deux MVB de mêmes dimensions détermine si le MVB va se fusionner avec la membrane plasmique et libérer les VE (teneur élevée en cholestérol) ou s'il va se fusionner avec les lysosomes pour sa dégradation (en cas de teneur faible en cholestérol).^{6,7,8}

1.2.3 Contenu en acides nucléiques

Les exosomes contiennent également plusieurs types d'ADN. On a pu détecter des ADN mitochondriaux (ADNmt), des ADN simple brin (ADNss) et double brin (ADNdb). Ils sont transférables entre les cellules et influencent la fonctionnalité biologique de la cellule receveuse.^{75,151.152}

Les ARN sont très abondants dans les VE et ils sont aussi diversifiés que ceux retrouvés dans le milieu intracellulaire. On y trouve les ARN messagers (ARNm), les ARN ribosomiaux, les ARN transferts et notamment les microARN.³ Les ARNm contenus et délivrés par les VE ont la propriété d'être traduits en protéines dans les cellules cibles¹⁷

Par ailleurs, l'enrichissement en microARN (miARN) dans les VE est diversifié, mais ne se fait pas de façon aléatoire. Cette hétérogénéité ne reflète pas forcément la cellule d'origine mais est contrôlée par différentes molécules telles que les protéines de la famille hnRNP⁴⁹, la protéine

ELAV humaine HuR⁵⁰, le LC3⁵¹, le céramide³⁹ qui y jouent un rôle de sélection.

1.3 Rôles/importance des exosomes

Le rôle spécifique et le but de la biogenèse des VE ne sont pas totalement élucidés. Cependant, plusieurs études ont pu prouver qu'ils interviennent efficacement dans la communication intercellulaire et aide également la cellule à se débarrasser de ses constituants excédentaires, ce qui contribue à maintenir l'homéostasie cellulaire. Par ailleurs, l'échange de contenu qui peut se faire entre les cellules via les VE favorise une modification efficace de la cellule receveuse en termes de réponse biologique. Ce phénomène intervient dans les processus physiologiques de la cellule et peut accélérer ou freiner un processus pathologique.^{1,3}

1.3.1 Exosomes et conditions physiologiques

Les exosomes sont impliquées dans la protection des cellules contre le stress et aident à maintenir l'homéostasie cellulaire. Ils ont la propriété de médier l'élimination des protéines, des lipides et des acides nucléiques endommagés via le système d'autophagie et maintiennent ainsi le contrôle de la qualité des cellules.²⁵ De même, les exosomes déficients sont phagocytés par les lysosomes et cette déficience est caractérisé par leur composition.²⁴ Ils participent également dans la cicatrisation et la réparation des tissus.²⁶

Les exosomes jouent également un rôle majeur dans la reproduction humaine. En effet, le développement embryonnaire nécessite une communication intercellulaire hautement raffinée, ce que les exosomes assurent efficacement. Ils interviennent dans la maturation des spermatozoïdes,⁶⁰ dans la protection immunitaire des organes génitaux⁶¹ ainsi que dans le développement embryonnaire et dans la protection du placenta contre des infections grâce à la présence de petits

ARN non codants.⁶² Ils sont aussi impliqués dans la croissance et la tolérance immunitaire post natales à partir des microARN se trouvant dans les exosomes du lait maternel.⁶⁴

Aussi, les Exosomes neuronaux, à partir de leur miARN-132 assurent-ils le rôle de maintien de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique.²⁷

1.3.2 Exosomes et Maladies

Les exosomes interfèrent principalement dans les réponses immunitaires, dans les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, dans la pathogénicité virale ainsi que dans la progression d'autres maladies, notamment le cancer.¹¹ Ici nous verrons comment les exosomes interagissent dans les maladies neurodégénératives et le cancer.

1.3.2.1 Exosomes et maladies neurodégénératives

Les exosomes sont impliquées dans la pathogenèse de certaines maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer. En effet, les exosomes du système nerveux central peuvent contenir des protéines pathogènes qui favorisent la propagation de la maladie d'Alzheimer telles que les protéines Tau phosphorylées qui sont trouvées dans ces exosomes, ainsi que les protéines B amyloïdes qui sont caractéristiques des plaques neuronales dans la maladie d'Alzheimer. Dans ce contexte, les exosomes neuronaux se chargeant de protéines Tau mutées assurent l'accélération de la phosphorylation pathologique de ces protéines ainsi que leur dissémination.^{66,67}

Ces mêmes observations ont été faite dans les cas de la maladie de Parkinson et la sclérose latérale amyotrophique (SLA). En effet, la présence de la protéine alpha synucléine dans les exosomes est témoin de la maladie de Parkinson. L'accumulation de cette protéine pathologique dans les cellules neuronales régule de façon négative le complexe ESCRT et limite ainsi sa

dégradation intracellulaire.⁷⁰ Dans la SLA, la SOD1 (Superoxyde dismutase 1) et la TDP-43 (Transactive response DNA binding protein 43 KDa) qui sont deux protéines mal repliées associées à cette protéinopathie ont été identifiées dans les exosomes.^{71,72} En culture, la protéine SOD1 contenue dans les exosomes des astrocytes entraîne la mort des neurones moteurs issus de la moelle épinière^{71,153} et la TDP-43 a été identifiée dans le surnageant de cellules neuroblastiques en culture.^{72,154} Ce qui éclaire sur le rôle des exosomes dans la physiopathologie de cette protéinopathie.

Cependant, les exosomes du système nerveux central peuvent jouer un rôle également neuroprotecteur. En effet, les exosomes neuronaux ont la propriété d'altérer ou de transporter hors des cellules les oligomères se révélant être toxiques pour les neurones, comme le peptide β amyloïde.^{68,69}

1.3.2.2 Exosomes et cancer

La progression du cancer nécessite une communication intercellulaire à courte et longue distance. De ce fait, les exosomes, comme entités assurant efficacement des échanges intercellulaires, jouent un rôle majeur dans la prolifération des cellules cancéreuses. Ils sont impliqués, non seulement dans la dissémination du matériel génétique ayant subi des mutations aux cellules saines, mais également dans la modification du milieu micro-environnant de la tumeur maligne par le remodelage de la matrice angiogénique. Ils facilitent ainsi la croissance tumorale et la dissémination des cellules cancéreuses. Aussi, dans les maladies cancéreuses, les exosomes assurent-ils un rôle prépondérant dans la néoplasie, la croissance de la tumeur, le processus paranéoplasique, les métastases, la plasticité et la résistance aux traitements (radiothérapie, agents chimio-thérapeutiques et anticorps).⁷³

La diversité des molécules empaquetées dans les exosomes leur confère une affinité pour les cellules d'autres organes.¹¹⁵ Ceci définit la préférence qu'ont certains cancers à être disséminés dans des organes de prédilection, donnant même lieu de prédire le ou les cibles métastatiques de certains cancers en analysant leurs exosomes circulants. Ce qui amène à croire que les exosomes, dépendamment de leurs cellules d'origine, n'ont pas tous la même affinité pour les organes et se distribuent donc différemment.²³

Les exosomes assurent non seulement l'échange de cargaison entre les cellules tumorales et stromales dans le microenvironnement de la tumeur mais également, ont la propriété de former des niches pré-métastatiques dans les organes à distance de l'organe atteint par la tumeur maligne. Ce phénomène implique la facilitation de la micro-intravasation pour la dissémination des cellules malignes via la voie sanguine. Ils prédisposent ainsi ces organes à avoir une affinité pour le développement de tumeur maligne secondaire.^{29,30,31,34}

Cependant, les exosomes provenant des tumeurs malignes peuvent aussi déclencher l'immunosurveillance en stimulant la réponse immunitaire contre le cancer via les lymphocytes T. En effet, les exosomes provenant des cellules tumorales contiennent également des antigènes tumoraux qu'ils vont présenter aux cellules dendritiques. Ces dernières vont favoriser des effets antitumoraux via les lymphocytes T CD8.¹⁴ De même qu'ils ont la propriété d'influencer négativement cette immunosurveillance en induisant l'immunosuppression et facilite ainsi la propagation de la tumeur.^{14,28} Cela a été également prouvé par une étude réalisée à partir des exosomes provenant des cellules cancéreuses pancréatiques. Ces derniers diminuent la cytotoxicité contre les cellules du cancer en limitant la lyse médiée par le système de complément et contribuent également à induire une immunosuppression dans le micro-environnement tumoral et inhibent ainsi la réponse immunitaire innée antitumorale.⁶⁵

1.3.3 Exosomes et Diagnostic

Bien que l'utilisation des exosomes en milieu clinique soit limitée en raison du manque de méthodes d'isolement spécifiques et l'incapacité à suivre les exosomes *in vivo* par imagerie à une résolution assez fiable, la disposition des VE avec leurs biomarqueurs dans le fluide extracellulaire est très prometteuse. Cette disposition offre une possibilité diagnostic à composants multiples pour le dépistage et la surveillance du cancer et d'autres maladies. De plus, les techniques utilisées à ces fins sont non invasives puisque les exosomes peuvent se trouver dans tous les liquides biologiques de l'organisme (lait maternel, urine, sang, salive, liquide amniotique, larmes, lymphes, liquide cérébro-spinal, liquide synovial, pour ne citer que ceux-là).³³ De ce fait, la biopsie liquide mettant en évidence les exosomes permet de faire le diagnostic, de suivre l'évolution de la maladie et de déterminer le pronostic et la réponse au traitement, en procédant par un échantillonnage longitudinal permettant une analyse à plusieurs composants des exosomes.¹¹

La cargaison d'ADN que peuvent contenir les exosomes sériques, bien qu'en petites quantités, permet de détecter les mutations s'associant au cancer.^{74,75} En outre, les micro-ARN, plus abondants et spécifiques, offrent des potentiels diagnostiques précoces et pronostiques dans le suivi du cancer à cause de leur expression différentielle entre les cellules cancéreuses et les cellules saines.⁷⁶ A titre d'exemple, le niveau élevé du micro-ARN exosomal miR-21 (un ARN oncogènes parmi tant d'autres) est témoin de la présence de glioblastomes, de certains cancers de l'appareil digestif tels que l'œsophage, le foie, le pancréas, le colon, le rectum ainsi que des cancers de la vessie, de l'ovaire et de la prostate.^{76,77} Aussi, des miARN exosomaux sériques spécifiques permettent-ils de faire le diagnostic et de suivre l'évolution de la sclérose en plaque.³² Par ailleurs, d'autres micro-ARN dits suppresseurs de tumeurs comme le miR-146a, miR-34a peuvent révéler aussi la présence de certains cancers hématologiques, du tube digestif et du sein.⁷⁶

D'autres molécules de la cargaison exosomale possèdent également un potentiel diagnostique, c'est le cas de la phosphoprotéine utilisée dans le diagnostic du cancer du sein,⁷⁸ y compris le profilage d'autres protéines de surface des exosomes pour le diagnostic de patients atteints de cancer.⁷⁹ D'où une possibilité d'utiliser les diverses catégories de molécules (lipidiques, protéiques, acides nucléiques) de la cargaison exosomale dans la détection et le suivi des pathologies.

Dans le cadre du suivi de l'évolution de la maladie et la réponse au traitement, la biopsie liquide pour l'analyse des exosomes périphériques permet d'asseoir le pronostic. En effet, une diminution du nombre d'exosomes traduits une diminution de la charge tumorale, par conséquent l'efficacité du traitement.⁸⁰

1.3.3 Exosomes et Traitement

La cargaison que contiennent les exosomes n'est pas identique à tous les exosomes. Ainsi ils sont à même d'être utilisés à des fins thérapeutiques, puisque dépendamment de leur contenu, ils vont se lier à des cellules cibles.¹¹ Leur potentialité d'intégrer et de libérer leurs molécules à des cellules ciblées constitue un atout essentiel dans la mise en place de contrôle thérapeutique pour de nombreuses maladies comme les maladies neurodégénératives et le cancer. Les exosomes détiennent les propriétés intrinsèques nécessaires pour le chargement et la livraison efficace de diverses charges utiles thérapeutiques à des cellules cibles, telles que les ARN courts interférents (siARN), des oligonucléotides antisens, des agents chimio thérapeutiques, ainsi que des modulateurs immunitaires.⁵² En outre, de par leur composition lipidique et protéique, ils ont de meilleures propriétés pharmacocinétiques et améliorent la biodisponibilité tout en minimisant les effets indésirables. De ce fait, l'utilisation des exosomes comme véhicules de médicaments aide à

pallier la toxicité, la multirésistance et l'échec thérapeutique qu'induit l'utilisation des polymères comme nano-transporteurs, ainsi que des réactions immunologiques graves rencontrées dans l'utilisation des virus (adénovirus) comme vecteur.³⁵ D'autant plus que la potentialité des exosomes à traverser la barrière hémato encéphalique (réseau vasculaire fonctionnant comme un filtre sélectif pour empêcher les médicaments ou les toxines d'atteindre le cerveau) fait d'eux les transporteurs de choix pour la livraison de molécules au niveau du cerveau.⁹¹

Il a été révélé que les exosomes purifiés à partir des cellules souches mésenchymateuses sont par eux-mêmes thérapeutiques, bien tolérés et sans effets secondaires importants.^{81,82} Leur administration par voie intranasale dans le trouble du spectre autistique apporte une nette amélioration chez les souris atteintes.⁸⁶ Administrés par voie intraveineuse, ils confèrent une neuroprotection dans le cas de traumatisme crânien dans les modèles porcins.⁸⁷ Ils sont également utilisés pour la livraison de micro-ARN et de siARN dans la prise en charge d'autres pathologies.⁸⁵

De par leur potentialité à présenter des antigènes aux cellules par la liaison ligand-récepteur, les exosomes peuvent être modifiés thérapeutiquement pour inhiber ou induire la signalisation à partir des récepteurs ou des exosomes de cellules spécifiques.¹¹ Les exosomes possèdent de même la potentialité de moduler des réactions corrélées aux systèmes immunitaires adaptatifs et innés permettant à l'organisme de faire face aux agressions microbiennes et au cancer, ce qui donne lieu à leur utilisation dans les thérapies ciblées.¹¹

Par ailleurs, connaissant les voies de biogenèse et de mobilité des exosomes, une étude a montré qu'on peut agir sur ces facteurs-là pour diminuer la propagation de certaines maladies et améliorer le pronostic en bloquant la synthèse des exosomes par les cellules affectées. Par exemple, sachant que le céramide dont la synthèse est assurée par la sphingomyélinase 2 est essentiel pour la production d'exosomes, on a pu inhiber cette voie de synthèse en bloquant le gène de la

sphingomyélinase 2.^{36,37} De cette même manière, l'utilisation du GW4869 pour induire une inhibition de la sécrétion d'exosomes in vivo (souris transgéniques TDP-43) limite la dissémination du TDP-43 pathologique dans les neurones, dans la sclérose latérale amyotrophique.⁷²

Les micro-ARN exosomaux jouent un rôle clé dans l'utilisation des exosomes dans la thérapie. Du fait de leur potentialité à circuler librement dans le sang et d'être protégés de la dégradation par les ribonucléases, ainsi que de leur efficacité à engager l'ARN messager et à supprimer l'expression génique des cellules cibles réceptrices, ils attribuent aux exosomes le potentiel thérapeutique pour l'acheminement de charges utiles spécifiques sous forme de micro-ARN ou de siARN (petit ARN interférant).⁸³ Cette potentialité a été testée et révélée efficace dans le traitement de plusieurs types différents de cancers.^{84,85}

1.4 Hétérogénéité et sous-type d'exosomes

L'hétérogénéité des exosomes est très complexe. Beaucoup d'études se sont accentuées sur la biogenèse des exosomes, et ont amené à découvrir qu'il y a beaucoup de diversités dans la formation de ces nano vésicules. Par ailleurs, les voies de formation et d'excrétion qui contrôlent la production de chaque sous-type d'exosomes ne sont pas totalement connues, de plus, il ne se révèle pas être assez évident de séparer les sous-populations d'exosomes. Ceci est surtout dû au manque d'outils d'isolement et d'analyse spécifiques, bien que certaines méthodes comme la vitesse de sédimentation, la vitesse de flottaison, la densité, l'immuno-affinité, l'analyse protéomique permettent de comparer des sous populations isolées.¹⁶

Ainsi, l'hétérogénéité des exosomes est liée à leur taille, leur contenu, leur impact fonctionnel sur les cellules réceptrices ainsi que leur origine cellulaire.³

1.4.1 Différence de taille

La différence de taille peut être due à une invagination inégale de la membrane endosomale des MVB. Ceci dépend de la cellule et de sa condition physiologique ou pathologique.¹¹ Cette différence de taille peut être aussi liée aux méthodes d'isolement qui n'arrivent pas encore à décanter finement les exosomes des autres véhicules électriques. Toutefois, les exosomes se présentent sous une gamme de taille différente. Ceci influence leur contenu en molécules biologiques fonctionnelles et en fluides, ainsi que leur profil protéomique et leurs propriétés biophysique, d'où une bio distribution sélective au niveau des organes.⁵³

1.4.2 Différence de contenu

Mise à part la différence de taille, le microenvironnement de la cellule ainsi que son fonctionnement biologique peuvent avoir un impact sur la cargaison des exosomes. De plus, les exosomes ne possèdent pas tous les mêmes types et quantité de molécules fonctionnelles, bien que certaines molécules soient identiques à tous les exosomes. Se basant sur l'analyse protéomique des exosomes, on a pu déceler une hétérogénéité de leurs marqueurs. La technique d'immuno-isolement révèle une autre façon d'avoir des sous-populations d'exosomes par catégories de tétraspanines (CD9, CD63, CD81).⁵⁵

Dans une étude récente, on a constaté que l'inhibition de la protéine Rab27a conduit à la modification de formation des exosomes en diminuant la sécrétion de certains marqueurs (CD63, Tsg101, Alix, HSP70), et ainsi diminue la sécrétion d'exosomes d'environ 70%. Ce qui est cependant, sans effet sur d'autres marqueurs de petites vésicules extracellulaires (pVE) tels que CD9, Mfge8.³⁹ De même, on a pu déceler des différences de tailles de VE associées avec des tétraspanines spécifiques (CD9, CD63, CD81/82).⁴⁴

1.4.3 Différence d'impact fonctionnel

L'impact de la réponse biologique des exosomes sur les cellules réceptrices est différent en fonction de la cellule d'origine, ce qui sous-entend également une cargaison non similaire. Les récepteurs de surface des exosomes jouent un rôle prépondérant dans la sélection des cellules cibles. Cette hétérogénéité fonctionnelle fait que les exosomes aient des impacts différents sur les cellules réceptrices. Par exemple, les exosomes provenant des cellules dendritiques exerceront forcément une influence sur la réponse immunitaire des cellules qui les reçoivent, soit pour la survie cellulaire, l'apoptose ou l'immunomodulation.⁵⁴

Certains facteurs externes influencent l'absorption et l'impact biologique des exosomes sur les cellules réceptrices. Ces facteurs peuvent être d'ordre immunitaires dans les cas d'inflammation,⁵⁸ thérapeutiques comme la chimiothérapie, ou physico-chimique comme une inhibition de la pompe à proton ou un changement de pH cellulaire.⁵⁹

1.4.4 Différence d'origine cellulaire

L'analyse d'exosomes dans les liquides biologiques circulants peuvent révéler leur origine cellulaire. Une récente étude a pu démontrer que le protéome d'exosomes provenant des cellules cancéreuses du sein indique leur origine épithélial ou mésenchymateux. Ce qui signifie que l'analyse protéomique d'exosomes circulants permet de révéler le diagnostic précis d'un sous-type de cancer du sein. Ainsi, l'enrichissement de la cargaison protéique et nucléique des exosomes circulants dicte leurs origines cellulaires. De même, selon la cellule d'origine, les exosomes vont avoir des propriétés d'influence et de tropisme bien spécifiques.⁵⁶

1.5 Exosomes et micro-ARN

La découverte de micro-ARN (miARN) dans les exosomes a révolutionné l'étude de ces

nanoparticules et a permis de certifier le rôle des VE dans la transmission d'informations génétiques d'une cellule à d'autres. En effet, le rôle de médiation intercellulaire détenu par les exosomes leur est dû par le biais des microARN, bien qu'après les techniques de purification d'exosomes, la quantification de microARN se révèle infirme.⁴⁵

Les miARN sont de petits ARN non codants de 20 à 22 nucléotides jouant un rôle dans la régulation de l'expression des gènes en régulant négativement la traduction de l'ARN messager (ARNm) cible, d'où leurs fonctions cellulaires. Ils se lient de manière incomplète à l'extrémité 3' des ARNm cibles favorisant ainsi leur dégradation d'où l'inhibition de la traduction. Ils sont enveloppés d'une double couche de lipides dans les exosomes et sont ainsi protégés de la dégradation.⁴⁶

La présence de miARN, au même titre que l'ARN cellulaire, dans les exosomes leur confère la potentialité de modifier le comportement de la cellule receveuse en la transférant le matériel génétique de la cellule d'origine. Ils régulent ainsi l'expression génique, les voies de signalisation des cellules réceptrices et par conséquent, leurs réponses biologiques.⁶³ Il a été révélé que les miARN répriment l'activité d'un pourcentage considérable (plus de 60%) d'ARNm spécifiques.⁸⁸

Prélevés à partir d'exosomes circulants dans les liquides biologiques, les miARN servent de biomarqueurs pour de nombreuses maladies, notamment les cancers. Ils sont identiques à ceux trouvés dans la cellule d'origine, bien qu'en proportion moins élevée dans les exosomes que dans celle-ci.⁴⁷ Les miARN peuvent, de façon stable, circuler dans les liquides biologiques (sang, urine, salive, lait maternel) tout comme ils peuvent être emballés dans les exosomes, dans les lipoprotéines de haute densité ou liés à la protéine AGO2 (*protéine argonaute 2*). Ces dernières

qui, grâce à l'appariement de leurs bases, sont guidées par les miARN vers leurs cibles spécifiques, pour aboutir au clivage de l'ARNm ou à l'inhibition de la traduction.^{48,89,90}

Les miARN font partie de la cargaison des exosomes de façon hautement sélective, selon le choix spécifique de la cellule mère, guidé par certaines molécules. Ce choix est souvent lié aux conditions physiologique et pathologique de la cellule, cependant, tous les types de miARN de la cellule ne font pas partie des exosomes.⁴⁷ Cet empaquetage non aléatoire est réglé par certaines molécules.^{49,50,51}

Les micro-ARN sont d'un nombre considérable et ont des caractéristiques spécifiques reliées aux diagnostics et aux traitements de maladies, cependant dans notre étude nous n'en avons utilisé que trois dont le miR-451 comme cible, et miR-16 et U6 comme références.

1.5.1 Micro-ARN 451 (miR-451)

Ce micro-ARN, très abondant dans les exosomes, est situé sur le chromosome 17q11.2 et a été découvert pour la première fois dans l'hypophyse l'humain, lors d'une étude menée par Altuvia et al. en 2005.¹¹² Il assure un rôle vital dans l'érythropoïèse et est aussi particulièrement avantageux pour l'organisme surtout dans le cas de certains cancers. En effet, la surexpression du miR-451 assure la régression de la prolifération, de la migration et de la chimiorésistance des cellules tumorales. Ce micro-ARN agit donc comme un suppresseur tumoral et son taux se trouve régulé à la baisse dans des cas de cancers invasifs comme le carcinome hépatocellulaire, et un dosage faible du miR-451 dans le cas de ce cancer donne lieu à un pronostic sombre pour les patients.^{108,109,110} En revanche, son dosage élevé peut être un indice d'inhibition de la croissance tumorale¹¹³ et il contribue également à protéger les neurones de l'apoptose et du stress oxydatif.¹¹⁴ Ce micro-ARN intervient dans la régulation de nombreux processus physiologiques et

pathologiques de l'organisme humain. Il peut agir, dans certains cas comme suppresseur de tumeur et peut être oncogènes dans d'autres. Il pourrait donc servir de nouvelle cible pour des diagnostic et des thérapies.¹²¹

Dans ce même ordre d'idée ayant rapport à l'utilisation du miR-451 comme outil de thérapie biologique, une récente étude réalisée par Reshke et al. a prouvé que l'intégration de siARN (ARN interférant court) dans des exosomes en mimant le squelette du pré-miR-451 peut favoriser la réduction de la dose thérapeutique des siARN. Ces derniers qui, par leur nécessité d'une dose considérable pour obtenir des résultats thérapeutiques, deviennent toxiques. Tandis qu'en petite dose, ils n'atteignent le cytoplasme des cellules cibles qu'à un faible pourcentage même quand ils sont délivrés par des nanovésicules.¹¹¹

1.5.2 Micro-ARN-16 (miR-16) et U6

Ces deux micro-ARN sont les contrôles endogènes les plus couramment utilisés pour la détection et la quantification de profil d'expression de micro-ARN que ce soit dans les cellules ou dans les tissus.¹²⁰ Comme les autres micro-ARN, ils peuvent fonctionner comme étant des gènes suppresseurs de tumeurs et oncogènes, toutefois, ils constituent également des outils émergents pour le diagnostic et le pronostic des maladies.^{117,119}

MiR-16 a des effets antiprolifératifs et se révèle être régulé à la baisse au cours de la senescence des cellules endothéliales humaines. Il a, comme le miR-451, un rôle de suppression de tumeur car son gène inactive la prolifération de cellules tumorales. Il pourrait aussi être impliqué dans les mécanismes de régulation du métabolisme cellulaire du glucose.¹¹⁹

U6 est exprimé de façon stable dans différents types de tissus et cellules, d'où son utilisation dans le profilage et la normalisation de l'expression de micro-ARN par la technique RT-

qPCR.¹¹⁵Cependant, d'autres études ont pu prouver que le U6 tissulaires présente des variances entre des individus atteints d'un même type de cancer par exemple, ou en bonne santé.^{116,117,118}

1.6 VE, distribution in vivo

Les exosomes en tant qu'entités subcellulaires, ont la propriété d'être utilisés dans de nombreuses pratiques cliniques telles que, leur utilisation comme véhicules de molécules thérapeutiques, comme marqueurs diagnostiques et plus récemment dans la médecine régénérative.¹²⁴ Ils peuvent être administrés, sans risque, à des doses répétées, du fait de leur très faible immunogénicité, leur compatibilité biologique, leur clairance rapide, ainsi que leur bio distribution large et effet durable.²⁰ Leur affinité pour les cellules est très sélective et peut être influencer par de nombreux facteurs tels que leurs marqueurs phénotypique (le rapport récepteur-ligand entre les VE et les cellules), leurs contenus en protéines, en lipides et en acides nucléiques, leurs fonctionnalités biologiques ainsi que l'état physiologique et pathologique de l'organisme.¹²³

1.6.1 VE et BHE

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est l'une des barrières les plus complexes de l'organisme humain, avec une potentialité hautement sélective. Les éléments anatomo-physiologiques constituant cette barrière et qui lui confèrent cette affinité sélective sont les cellules endothéliales formant une monocouche de cellules à jonction serrées, recouvrant les capillaires cérébraux. Elle protège ainsi le cerveau contre le passage de toxines et d'agents pathogènes circulant dans le sang et maintient l'homéostasie du SNC. Par conséquent, les grosses molécules, les produits biologiques et les médicaments synthétiques ne parviennent pas à passer du sang au cerveau à cause des jonctions serrées des cellules endothéliales formant la BHE, ce qui constitue un obstacle majeur dans le traitement des maladies neurologiques.¹²²

En effet, plus de 98% des micromolécules neurothérapeutiques ne parviennent pas au SNC si elles ne répondent pas à certains critères pharmacologiques tels qu'un poids moléculaire inférieur à 500 Dalton et une solubilité élevée dans les lipides. Les petites molécules avec une charge pharmacologique significative comportant ces caractéristiques ne ciblent qu'une infirme partie des affections cérébrales dont la migraine, l'épilepsie, la douleur chronique et les troubles affectifs. De ce fait, la potentialité à traverser la BHE et le pouvoir théranostique des exosomes dans la thérapie génique justifient leur utilisation pour la livraison de cibles thérapeutiques au niveau du cerveau.⁹⁷

Cependant, tous les types d'exosomes ne traversent pas la BHE à un même pourcentage. De ce fait, plusieurs études ont été accentuées sur certaines modifications de la structure ou le contenu des exosomes chargés de molécules thérapeutiques et ont pu démontrer que cela augmente leur capacité à se lier à des récepteurs de la BHE, la traversent plus efficacement et diminuent également l'immunogénicité.^{92,93,94} Ces modifications comprennent, entre autres, l'utilisation d'un peptide court provenant de la glycoprotéine du virus de la rage. Constitué de 29 acides aminés, ce peptide facilite la livraison Trans-vasculaire de siARN au cerveau en se liant au récepteur de l'acétylcholine des cellules neuronales.⁹⁴ Ce même peptide, fusionné avec des exosomes purifiés de cellules dendritiques modifiées, puis chargés de siARN exogènes par électroporation a pu entraîner l'inactivation de l'ARNm cible.⁹² D'un autre côté, la mise en place de variants de virus adénoassocié permettent la pénétration efficace de la BHE et augmentent la traduction clinique des thérapies géniques qui ciblent le système nerveux central (SNC).⁹³

Par ailleurs, certaines cellules, du fait de leurs compositions, secrètent des exosomes qui sont capables, sans être modifiés, de traverser la BHE de manière significative. Il s'agit des macrophages, et les exosomes qui en sont dérivés sont dits exosomes de macrophages naïfs. Aussi,

y-a-t-il les VE dérivées des cellules mésenchymateuses et des cellules dendritiques qui possèdent ces mêmes potentialités. Ces VE ont la propriété de se lier aux cellules endothéliales des microvaisseaux qui composent la BHE pour délivrer leur cargo protéique grâce à leur intégrine, la molécule adhésion intercellulaire et les récepteurs de lectine de type C qui vont se lier aux glucides.⁹⁵

1.6.1.1 Anticorps H2 et BHE

Le transfert paracellulaire des anticorps vers le cerveau est également entravé par la BHE. De façon naturelle, le transport de macromolécules comme les nutriments essentiels et des ligands protéiques à travers la BHE se fait essentiellement par RMT (Transcytose Médiée par les Récepteurs).⁹⁶ Cette voie très intéressante a été convoitée pour le transfert d'anticorps thérapeutiques, notamment les voies initiant les récepteurs RMT liés à la transferrine¹⁵⁶ et à l'insuline.⁹⁶ Ainsi, l'IGF5R1, anticorps à domaine unique, parvient à se lier aux récepteurs de facteur de croissance analogue à l'insuline et active la RMT pour le transfert de molécules à travers la BHE.^{96,157}

Les données scientifiques actuelles affirment que l'utilisation des anticorps dirigés contre la transferrine parviennent à traverser la BHE avec une pertinence pharmacologique dans des modèles murins.^{155,158} Le mécanisme élucidé est que les récepteurs de la transferrine qui se trouvent sur la surface des cellules endothéliales des capillaires de la BHE reconnaissent et se lient aux ligands de la même nature (anticorps anti-transferrine par exemple), pour ensuite les libérer au côté opposé de la cellule endothéliale correspondant donc au tissu cérébral.¹⁵⁶

1.7 Résumé

Les VE jouent un rôle crucial dans la communication intercellulaire et possèdent des pro-

priétés qui permettent de les utiliser dans de nombreux champs liés aux maladies et aux traitements. Cependant, leur complexité due à leur diversité qui a trait à leurs cellules d'origine et leurs compositions, entre autres, représente un défi à cerner pour une meilleure orientation dans leur utilisation. Beaucoup de recherches sont donc entreprises dans le but de mieux caractériser ces nano vésicules en appliquant une riche variété d'approches, de technologies et de méthodologies. Cette présente étude vise à déterminer certaines caractéristiques des VE en termes de taille, de nombre, de contenu et de bio distribution en apportant des modifications cellulaires, tout en ayant pour objectifs de:

Objectif 1 : Créer des cellules qui manquent des gènes/enzymes nécessaires pour la biogenèse de plusieurs sous types potentiels de VE

Objectif 2 : Tester l'impact de ces gènes sur la production et le contenu en pre-miR-451 des VE

Objectif 3 : Tester l'impact de certaines modifications cellulaires sur la distribution de leurs VE dans les organes

1.8 Hypothèses

- 1. L'absence du gène TSG101 et l'inhibition de l'enzyme nSMase2 créés des sous-types de VE avec des contenus différents**
- 2. L'anticorps IGF1R5-H2 favorise la traversée de la BHE par les VE**

Chapitre 2 : MÉTHODE

2.1 Lignées cellulaires

1. Les cellules HEK293T (Cellules rénales embryonnaires humaines) de type sauvage (HEK 293T WT)
2. Les cellules U-118 de la lignée du gliome malin humain (U-118 MG line)
3. Les cellules HEK293T-TSG101 "Knock Out" (KO): Plus de détails sur la procédure utilisée pour la conception de ces cellules seront donnés dans les lignes qui suivent. En résumé, nous avons utilisé la méthode CRISPR pour créer ces cellules KO. Nous avons ensuite sélectionné plusieurs colonies de cellules monoclonales et le KO a été vérifié par Western Blot.
4. Les cellules avec N-sphingomyélinase 2 non exprimée. Pour obtenir ces cellules, nous avons transfecté les cellules HEK293 WT avec le siARN de la Sphingomyéline phosphodiesterase 3 (SMPD3) qui a pour cible le gène de la N-sphingomyélinase 2 (nSMase2). L'absence du gène est ensuite vérifiée par Western Blot. Le protocole sera détaillé plus loin.
5. Les cellules avec IGF1R5, IGF1R4 et FC5 exprimées, respectivement cellules H2, H3 et F5 : ces cellules ont été obtenues en traitant les cellules HEK293 WT, avec les anticorps correspondants en utilisant la méthode de GIBSON. La description de cette expérimentation sera élaborée plus loin.

2.2 Culture cellulaire

Les cellules sont habituellement mises en culture avec le « Fœtal Bovin Serum » (FBS) à 10% (Thermo Fisher, 12483020) et « Penicillin-Streptomycin » (Pen-Strep) à 1% (Wisent Bioproducts, 450-201-EL) dans du DMEM (Wisent Bioproducts, 319-015-CL). Elles sont ensuite incubées à 37°C et 5% de CO₂ jusqu'à ce qu'elles deviennent assez confluentes pour être divisées. Elles sont d'abord rincées avec du « Phosphate Buffered Saline » à une concentration de 10% (1xPBS) (Wisent Bioproducts, 311-010 CL) avant d'être dissociées avec du Trypsine/EDTA (Wisent Bioproducts, 325-542-EL) pendant environ 2 minutes, suivi de la neutralisation avec du DMEM supplémenté (FBS 10%, Pen-Strep 1%). La concentration des cellules en suspensions est déterminée en utilisant un hémocytomètre, puis elles sont redistribuées dans de nouvelles assiettes de 10 ou de 15 cm pour une nouvelle croissance cellulaire.

2.3 Production de cellules TSG101 KO

2.3.1 Méthode CRISPR-Cas9

Ce système à répétitions palindromiques courtes et régulièrement espacées est un système qui existe normalement chez les microbes permettant à leur immunité adaptative de faire face aux agressions extérieures. Mimé chez les cellules de mammifères, il permet de modifier efficacement le génome en ciblant spécifiquement une séquence de 20 nt dans son ARN guide unique (sgARN) en se servant des ciseaux enzymatiques, Cas9.¹⁰⁴ Cette méthode se déroule en plusieurs étapes qui sont décrites comme suit :

Purification de plasmide (sgARN et Cas9)

Avec une pointe de pipette stérile de 10µL, une colonne de plasmide commandé de GEM core (Plasmide #7251 pour le TSG101 et Plasmide #52962 pour le Cas9) précédemment congelé à -80°C a été mise dans un tube de 50 ml (pour une préparation moyenne) contenant du liquide LB (Lysogeny Broth) Agar + antibiotique (Ampicilline 100mg/ml). Ce processus se déroule en présence du bec de Bunsen allumé. Ce mélange a été ensuite placé sur l'agitateur à 37°C pendant 12 à 18 heures et la croissance des cellules bactériennes après ce laps de temps a été vérifiée par la présence d'une turbidité du milieu de culture. Le protocole du fabricant contenu dans le "Plasmid Plus Midi Kt (25)" (Qiagen, 12943) a été suivi pour la purification de l'ADN du plasmide.

Transfection et sélection

Les cellules HEK 293T ont été mises en culture le jour d'avant dans des assiettes de 6 puits (1 x 10¹⁰ cellules par puit) pour une confluence de 60 à 80% 24h plus tard. Le lendemain, environ 30 minutes avant la transfection, nous avons procédé au rinçage des cellules avec du 1xPBS puis à l'ajout de 2 ml/puit de DMEM sans Pen-Strep. Entre temps, la préparation de la solution de transfection a été faite de 7.5 µl de Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher, L3000001) dans 125 µl d'OPTIMEM (Thermo Fisher, 31985-070) d'une part, et de 1 µg d'ADN plasmidique (guide unique d'ARN TSG101), de 1 µg d'ADN plasmidique Cas9 et 10 µl de réactif P3000 dans 125 µl d'OPTIMEM d'autre part. Ces volumes, valables pour un puit d'une assiette à 6 puits, ont été laissés à température ambiante durant 5 minutes, puis mélangés et incubés pendant 20 minutes, toujours à température ambiante avant d'être ajoutés goutte à goutte dans le surnageant des cellules dans chaque puit. A noter qu'un puit non transfecté a été laissé pour être utilisé comme control négatif de la procédure.

24h après, la transfection a été confirmée par la fluorescence dans le microscope ZOE, le surnageant des cellules fut remplacé par du media frais sans Pen-Strep et la sélection des cellules transfectées a été procédée en utilisant la puromycine 2mg/ml pendant 3 jours. Les cellules furent ensuite prélevées, comptées puis diluées de façon à avoir une cellule par puit dans une assiette de 96 puits. La délétion du gène TSG101 a été vérifiée par Western Blot, après que les cellules se sont multipliées et mises progressivement dans de plus grandes assiettes.

2.4 Production de cellules N-SMase 2 (-)

Les cellules HEK 293T ont été précédemment ensemencées et utilisées à une confluence de 50 à 70% dans des assiettes de 10 cm. Environ 30 minutes avant la transfection, nous avons procédé au rinçage des cellules avec du 1xPBS puis à l'ajout de 8 ml de DMEM sans Pen-Strep pour une assiette. 2 séquences de SMPD3 (du numéro AM16708), identifiées respectivement aux numéros 132606 et 132608 (silencer select siRNA de Thermo Fisher Scientific) et un siARN sans aucun cible "Universal Negative Control siRNA" (Sigma Aldrich, WDAA1076) ont été utilisés à une concentration d'utilisation de 10 μ M pour chaque séquence. Pour une assiette de 10 cm, 1287 μ l de OPTIMEM (Thermo Fisher, 31985-070) ont été mixés avec 26 μ l de lipofectamine RNA imax (Invitrogen, 56532) d'une part, et 10 μ l de siARN ont été ajoutés à 1287 μ l d'OPTIMEM d'autre part. Ces 2 solutions ont été ensuite mélangées et laissées à température ambiante pendant 20 minutes, puis mises goutte à goutte sur les cellules qui ont été ensuite placées dans l'incubateur pour 72 heures. Une assiette sans transfection a été utilisée comme contrôle positif de l'expérimentation. La vérification de l'absence de la protéine N-Sphingomyélinase 2 a été faite par Western Blot en utilisant l'anticorps anti-SMPD3.

2.5 Production des cellules H2, H3 et F5

Les cellules désignées H2, H3 ou F5 sont des cellules traitées avec des anticorps liés à différents récepteurs présents sur les cellules endothéliales de la BHE dont IGF1R5 (H2), IGF1R4 (H3) et FC5 (F5) pour une reconnaissance par les récepteurs liés respectivement, à l'insuline (H2, H3) et à la transferrine (F5). La méthode Gibson a été utilisée par le Dr James Taylor pour la confection de ces cellules.

Production de lentivirus

Des cellules HEK293T ont été suspendues dans des assiettes de 15cm (5 assiettes), pour être confluentes à 70-90% le jour de la transfection initiale. Deux heures avant la transfection, le milieu a été remplacé par 20 ml de milieu frais. Les réactifs suivants ont été mélangés et incubés pendant 5 minutes à température ambiante. Pour une assiette de 15 cm :

Produits	Quantité
PMD2.G	7,2 mg
psPAX2	10,8 mg
GiP2-X	6 µg
DMEM	1200 µl

Ensuite, 96 µl (par plaque) de PEI ont été ajoutés et incubés pendant 20 minutes à température ambiante et 1300 µL de mélange de transfection ont été ajoutés à chaque plaque.

24 heures plus tard, la première collection de virus a été prélevée et remplacée par 15 mL de milieu frais. 48 heures après la transfection, une deuxième collection a été faite et le milieu remplacé. Le milieu recueilli a été centrifugé pendant 5 minutes à 2000 rpm. Le surnageant a été

retiré et conservé à 4°C. 72 heures après la transfection, le milieu a été à nouveau collecté et centrifugé à 2000 rpm. Les deux collections de milieux ont été filtrées à travers un filtre de 0,45 µM. Puis, les collectes ont été concentrées par ultracentrifugation à 20 000 rpm pendant 2 heures à 6°C dans un rotor oscillant Beckman SW28 Ti. Après cette ultracentrifugation, le surnageant a été jeté. Le culot a été remis en suspension dans 200-400 µl de 1xPBS. Le virus a été soit utilisé immédiatement, soit congelé dans l'azote liquide et stocké à -80°C. S'il a été congelé, le virus a été décongelé sur glace avant son utilisation

Transfection

Les cellules ont été placées la veille dans une assiette de 6 puits pour avoir les cellules à environ 50 % confluentes le jour de la transfection. Le jour de la transfection, un nouveau milieu contenant 10g/mL de polybrène a été ajouté dans les puits. Une dilution en série a été réalisée avec le lentivirus pour exposer les cellules ensemencées à différentes concentrations. La réussite de la transfection des cellules a été immédiatement confirmée par la fluorescence au microscope ZOÉ.

Sélection

Après 3 jours, le milieu a été changé en milieu de sélection, avec de la puromycine à 2 mg/mL. Cette sélection a été poursuivie jusqu'à ce que toutes les cellules témoins soient mortes, soit après environ 3 jours.

Vérification

L'expression du virus transfecté dans les cellules a été confirmée par Western Blot.

2.6 Western blot

La technique Western Blot utilisée pour la confirmation de la présence ou de l'absence

d'une protéine se déroule en plusieurs étapes élaborées comme suit :

Extraction de protéines

Des cellulesensemencées dans une assiette de 10cm ont été parvenues à une confluence de 100%. Le milieu de la culture cellulaire a été retiré puis les cellules lavées deux fois avec du 1xPBS sont ensuite prélevées à l'aide de la trypsine pendant environ 2 minutes puis diluées avec du media frais (DMEM, FBS 10%, P/S 1%). Le contenu de l'assiette a ensuite été récupéré dans un tube et centrifugé à 1000xg pendant 5 minutes. Après succion du surnageant, le culot obtenu a été lavé avec du 1xPBS puis suspendu à nouveau dans 200 à 400 µl de tampon de lyse cellulaire (Tris (pH 7.4) 0.1 M, NaCl 5 M, EDTA 0.5 M, Triton-X 100 1% et une tablette d'inhibiteur de la protéase), et enfin congelé dans un tube Eppendorf à -80°C.

Cette solution de lyse cellulaire peut-être également utilisée à un volume moindre (50 à 100 µl) pour les VE après les étapes de leur purification qui sont décrites plus bas. Les échantillons VE ont été parfois directement congelés à -80 °C dans un tube Eppendorf puis décongelés pour la détermination quantitative des protéines totales.

Détermination de la concentration de protéine

Après décongélation de l'échantillon, ils ont été centrifugés à 1000xg pendant 5 minutes à 4 °C et le surnageant, à un volume de 5 µl par puit, a été mis dans une assiette de 96 puits pour la détermination quantitative des protéines en suivant le protocole du kit de dosage de protéines (Bio Rad, 5000111). La fluorescence est ensuite lue dans le spectrophotomètre (BioTek Synergy H1 microplate reader) à 750 nm. La concentration des protéines des VE est obtenue en utilisant le micro-kit de dosage de protéines (Thermo Fisher, 23235) et la lecture se fait dans le spectrophotomètre à 560 nm.

Électrophorèse

Après avoir déterminé la concentration des protéines, le volume nécessaire correspondant, en général 15 µg a été dilué, si nécessaire, et mélangé au tampon, en considérant un rapport de 1/3 du volume total. Ce tampon est composé de 4X Laemmli (BioRad, 1610747) et du 2-mercaptoethanol (Sigma Aldrich, 60-24-2) à des volumes respectifs de 900 µl et 100 µl pour 1 ml de tampon. Ce mélange a été ensuite incubé à 95 °C pendant 5 minutes pour la dénaturation des protéines avant d'être chargé dans des puits de gel polyacrylamide 10% à 150 V pendant 1 heure.

Western Blot

Le transfert des protéines du gel sur la membrane PVDF (difluore de Polyvinylidene) a été réalisé à 100 V pendant 1.5 heures. Nous avons ensuite procédé au blocage de cette membrane pendant 1 heure par l'utilisation du tampon de blocage composé de 5% de lait dans 1xTBST (10 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20). La membrane a été ensuite submergée dans l'anticorps primaire (1 :1000 dans 1xTBST) pendant toute la nuit. Le lendemain, la membrane a été lavée à trois reprises durant 5 minutes chacune avant d'être encore submergée dans l'anticorps secondaire correspondant (1 :7500 dans 1xTBST) pendant 1 heure, puis lavée encore 3 fois à 5 minutes chacune avec 1xTBST.

La visualisation des bandes a été réalisée à l'aide du substrat HRP Western Luminata Crescendo (Millipore Sigma, WBLUR0100) sur l'ImageQuant LAS 4000. L'analyse quantitative a été faite à l'aide de Fiji J Lite selon les instructions disponibles sur le site Web et l'intensité des bandes a été normalisée par rapport aux contrôles indiqués. (<https://lukemiller.org/index.php/2010/11/analyzing-gels-and-western-blots-with-image-j/>)

Tableau 1 : Les anticorps

Anticorps	Fabriquant	Application
TOMM 20	Invitrogen Polyclonal Rabbit PA5-39247	Western Blot
Syntenin-1	ABCAM Monoclonal Rabbit ab133267	Western Blot
Flotillin-2	Cell Signaling Technology Monoclonal Rabbit c42A3	Western Blot
CD9	Sigma Aldrich Monoclonal Mousse MM2-57	Western Blot
CD63	Santa Cruz Biotechnology Monoclonal Mousse sc275	Western Blot
CD81	R&D System Monoclonal Mousse MAB4615	Western Blot
CD31	ABCAM Monoclonal Rabbit ab222783	Immunofluorescence/ Western Blot
Alix	Cell Signaling Monoclonal Rabbit 3A9	Western Blot
TSG101	Geno Tex Monoclonal Mousse GTX70255	Immunofluorescence/ Western Blot
Flag	Sigma Aldrich Monoclonal Mousse SLBW5142	Western Blot
SMPD3	R&D system Monoclonal Mousse MAB7184	Western Blot
B Actin	Sigma Aldrich Monoclonal Mousse A2228	Western Blot

2.7 Purification de VE (ultracentrifugation et FFT)

La purification de VE commence par la préparation du DMEM sans exosomes afin de recueillir une collection pure constituée que des VE des cellules en culture, suivi de l'ultracentrifugation ou de la Filtration par Flux Tangentiel (FFT) pour l'isolement d'exosomes.

Préparation d'un milieu exempt d'exosomes

Le DMEM est supplémenté avec tous les nutriments en double (2xDMEM), donc 20 % FBS et 2% Pen-Strep dans 500 ml de DMEM. 250 ml de ce milieu ont été prélevés et répartis dans des tubes de 50 ml pour être Centrifugés à 5000 x g pendant 30 minutes. Le surnageant a été ensuite transféré dans des tubes d'ultracentrifugation (Beckman #355631) et centrifugé pendant 2 heures à $100\,000 \times g$ à 4°C (6 tubes pleins dans le rotor SW 32 contiennent ~180mL). Le contenu de chaque tube a été enfin stérilisé par filtration en utilisant un filtre de 0,22 μm relié à la tubulure de succion et placé au-dessus d'une bouteille stérile. Ce milieu est alors prêt à être mis sur les cellules après dilution à 50% de DMEM non supplémenté de FBS et de Pen-Srep.

Préparation des cellules

Les cellules ont été placées dans des assiettes de 15 cm 24 heures avant, avec du media régulier (DMEM + FBS 10% + PS 1%) pour avoir une confluence d'environ 50%. Le lendemain, elles ont été rincées 2 fois avec du 1xPBS, le milieu fut ensuite remplacé par du media sans exosomes (comme décrit plus haut), à raison de 15 ml dans chaque plaque puis mises dans l'incubateur pour 24 heures. Le lendemain, une première collection de surnageant des cellules a été faite et remplacée par du media exempt d'exosomes frais. Le surlendemain et le jour d'après, cette même procédure a été répétée pour un total de 3 collections de surnageant de cellules.

Ultracentrifugation

Nous nous sommes basés sur le protocole de purification de VE par centrifugation différentielle décrit dans Théry et al., 2013³⁹ afin d'obtenir notre culot de VE. Les différentes étapes de cette procédure sont résumées dans les lignes suivantes :

Le surnageant des cellules placées dans des assiettes de 15 cm a été prélevé 24h après et mis dans des tubes de 50 ml pour une première centrifugation à 300 x g à 4°C pendant 10 minutes. Ce surnageant est ensuite placé dans un nouveau tube de 50 ml pour être centrifugé à 2000 x g à 4°C pendant encore 10 min puis transféré dans un nouveau tube de 50 ml et centrifugé à 10 000 x g à 4°C pendant 30 min. Ces étapes ont été suivies de l'ultracentrifugation à 28 500 x g à 4°C pendant 2 heures en utilisant des tubes de Beckman et le rotor SW32. Le culot qui en résulte a été resuspendu dans 1ml 1xPBS, puis Centrifugé dans des micro-tubes de Beckman (Thermo Fisher Scientific, 3434PK) à 49 000 rpm à 4°C pendant 30 min en utilisant le rotor TLA 100. Après Succion de ce surnageant et re suspension du culot dans environ 100 µl de 1xPBS, la solution de VE a été conservé à 4°C jusqu'à son utilisation.

Filtration par flux tangentiel (FFT)

La purification d'exosomes par FFT nécessite également la préparation du milieu exempt d'exosomes et celle des cellules comme décrit plus haut ainsi que les étapes 1 à 4 de l'ultracentrifugation.

Les différentes étapes du FFT se déroule, grossièrement, ensuite comme suit : Une boucle est assemblée, en maintenant des conditions aseptiques, en utilisant le module de filtration à fibres creuses qui est équipé de 3 capteurs de pression et de tubulures. Les deux colonnes couramment utilisées sont D02-E500-10-N/S et C02-E500-05-N/S, (disponibles auprès de

Repligen) avec une pression de fonctionnement maximale pour cette colonne est de 30 psig. Outre ces deux colonnes Repligen, nous avons également utilisé un cerceau de filtration à fibres creuses (UFP-750-E-H42LA, également appelé MidGee Hoop, Cytiva, qui sont compatibles avec les colonnes Repligen. Ce cerceau MidGee a une surface de 73 cm², une valeur nominale de 750 kDas et une pression de fonctionnement recommandée de 5 psig. Dans le système, la première étape consiste à s'assurer que la pompe péristaltique est connectée à la Surface de la tablette en vérifiant le câble USB. La pompe est mise en marche en premier, suivie de la tablette. Les paramètres correspondants sont ensuite automatiquement réglés, comme le contrôle des pompes, le débit, la direction, le mode de pompage, les pompes auxiliaires pour la dia filtration, la contre-pression, etc. Nous effectuons généralement 10x la concentration et 5x la dia filtration, la soupape de contre-pression est réglée à 2,5 psi et une alarme de niveau bas peut être réglée pour que le système s'arrête automatiquement si ce poids est atteint. La colonne est connectée à trois capteurs de pression (alimentation = ce qui entre dans la colonne, perméat = déchets qui sortent, rétentat = produit concentré qui retourne dans l'échantillon). Les paramètres de fonctionnement seront encore contrôlés automatiquement par le logiciel tels que les informations fournies par les trois capteurs de pression, le poids de l'alimentation et du perméat. Une fois que les commandes de la pompe sont réglées et que les tuyaux sont connectés, la colonne est lavée avec de l'eau stérile exempte d'endotoxines puis avec de l'isopropanol à 70 %, à nouveau avec de l'eau stérile et enfin avec du 1xPBS stérile (tous les volumes étant compris entre 300 et 400 ml). L'eau stérile, le PBS et l'isopropanol à 70 % se trouvent tous dans des sacs séparés qui ont été remplis de manière aseptique avant l'analyse. Après le lavage, le sac d'échantillon est suspendu à la balance d'alimentation et les tubes sont connectés. Le tube de rétentat est déconnecté du sac de déchets et reconnecté au sac

d'échantillon en prenant soin de maintenir des conditions aseptiques. La concentration et la diafiltration sont lancées, le mode M est choisi et la limite inférieure de l'alimentation est fixée à 10x moins de volume ou 10x concentré. Une fois que l'analyse est lancée à partir du module de contrôle de la pompe, la collection est commencée. La collection terminée, l'orifice de rétention du sac d'échantillons est ensuite fermé et déconnecté de la tubulure, la colonne est nettoyée en la lavant avec de l'eau stérile - 70 % d'isopropanol - de l'eau stérile - du PBS stérile et le sac d'échantillon est conservé à 4°C.

Les exosomes purifiés par ultracentrifugation ont été utilisés pour les techniques de western blot et de RT-qPCR tandis que ceux purifiés à partir du FFT ont été servis à être injectés aux souris. La concentration de particules a été déterminée par l'utilisation du traçage de nanoparticules.

2.8 L'analyse de suivi des nanoparticules (NTA)

La machine ZetaView (NTA instrument Particle Metrix PMX-110) a été utilisée pour compter le nombre de nanoparticules dans les échantillons (particules/ml). Cela a été utile pour déterminer le nombre et la taille relatifs des particules ainsi qu'à déterminer le volume de l'échantillon de VE qui doit être injecté aux souris. Un résumé des étapes est élaboré de la façon suivante :

L'ordinateur relié à la machine doit être lancé avant celle-ci, suivi de l'ouverture du fichier "zetaview" sur le bureau. Après l'initialisation, environ 10 ml d'eau stérile (milli-Q water purification system) sont injectés dans la machine à l'aide d'une seringue de 10 ml. Le nombre de particules détecté doit être inférieur à 10. La qualité de la cellule a ensuite été vérifiée en cliquant sur "cell quality check" le résultat doit revenir "very good". La calibration de la machine s'est effectuée en ajoutant environ 0.7 ml de perles en suspension (100nm polystyrène beads

(Polysciences cat no. 00876-15)) à l'aide d'une seringue à insuline, puis on optimise le focus. Le résultat doit revenir "successful", le nombre de particules détectées doit être autour de 100 et la barre de détection doit apparaître verte. L'onglet "measurement" a été lancé, puis 800 µl de l'échantillon d'exosomes précédemment dilués en séries (1 :100, 1 :1000, 1 : 10 000) avec du 1xPBS ont été injectés dans la machine. Les résultats apparaissent sous forme de fichiers pdf, text et video.

2.9 RT- qPCR pour VE (Mispript)

La transcription inverse de la réaction en chaîne de la polymérase quantitative (RT-qPCR) a pour but de déterminer l'enrichissement en micro-ARN dans les VE par rapport à leurs cellules d'origine, ou pour déterminer le niveau relatif de micro-ARN dans les VE par rapport à une préparation standard connue de VE. Plusieurs étapes précèdent l'analyse RT-qPCR et elles sont décrites comme suit :

Purification d'ARN

L'ARN est isolé des VE à l'aide du réactif TRIzol (Thermo Fisher cat no. 15596-018). Il est à noter que des gants sont portés pendant toutes les étapes du protocole afin d'éviter toute contamination potentielle par l'ARNase. Toutes les étapes impliquant le réactif TRIzol sont effectuées sous ventilation dans une hotte.

Après concentration de l'échantillon d'exosomes dans le TLA 100.3, 500 µl de réactif TRIzol LS (Thermo Fisher cat no. 10296028) ont été ajoutés dans les tubes et pipeter de haut en bas pour homogénéiser. Les échantillons de TRIzol ont été soit laissés à température ambiante pendant 5 minutes, soit conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation pour les prochaines étapes. Si congelés, ces échantillons contenant du TRIzol sont décongelés à température ambiante pendant 5 minutes, puis

100 µl de chloroforme ont été ajoutés suivi de l'agitation vigoureuse du tube pendant 15 secondes. Incubés pendant 3 minutes à température ambiante puis centrifugés pendant 15 minutes à 12 000 × g à 4°C, la phase aqueuse supérieure a été transférée dans un nouveau tube de 1,5 ml sans perturber la couche interphase blanche. 1 µL de Co précipitant GlycoBlue 15mg/ml (Thermo Fisher cat no. AM9516) et 250 µl d'isopropanol 100% ont été ajoutés aux échantillons avant d'être incubés à température ambiante pendant 10 minutes, puis centrifugés pendant 10 minutes à 12 000 x g à 4°C. Le surnageant a été jeté, 500 µl d'éthanol à 75 %, préparé avec de l'eau sans ARN (Wisent cat no. 809-115-CL) ont été ajoutés suivi de la centrifugation pendant 10 minutes à 12 000 x g à 4°C. Le culot a été remis en suspension dans 20 µl d'eau sans ARNse et l'ARN conservé à -80°C jusqu'à utilisation.

ADNc (ADN complémentaire)

La transcription inverse du miRNA est réalisée à l'aide du kit "miScript II RT kit (50)" de (Qiagen, 218161), et les étapes suivantes ont été suivies :

L'échantillon d'ARN a été quantifié à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop, puis dilué avant d'être utilisé dans la réaction RT (Reverse Transcriptase). L'idéal est d'utiliser 500 ng d'ARN dans une réaction RT du kit miScript. Pour un échantillon, on a :

- a. 5X miScript Hiflex Buffer: 2 µl
- b. 10X miScript Nucleics mix: 1 µl
- c. miScript RT enzyme: 0.5 µl
- d. Échantillon d'ARN : volume variable
- e. Eau sans ARNase : volume variable.

Pour un total de 10 µl.

L'échantillon est ensuite incubé à 37°C pendant 1 heure, puis à 85°C pendant 5 minutes dans un thermocycleur. A noter que ce dernier a été réglé pour qu'il reste à 4°C jusqu'à ce que les échantillons soient prélevés. 90 µL d'eau sans ARNase sont enfin ajoutés dans le tube avant de procéder à la qPCR.

RT-qPCR

L'analyse qPCR des miARN est réalisée à l'aide du kit Mir-X TB Green qRT-PCR (Takara Bio cat no. 638816). L'amorce 3' pour toutes les réactions est l'amorce 3' universelle mRQ fournie dans le kit. L'amorce 5' utilisée est conçue par le laboratoire Gibbings pour la cible spécifique et commandée à IDT (Integrated DNA Technology). Les stocks d'amorces sont dilués à 100µM et stockés à -20°C. La séquence de l'amorce 5' est typiquement la séquence complète du micro-ARN mature amplifié. Lors des expériences d'empaquetage des VE, les amorces 5' suivantes ont été utilisés : miR-451 endogène avec miR-16 et U6 comme gènes de référence.

Tableau 2 : Les séquences des amorces pour RT-qPCR

Micro-ARN	Séquences
miR-451	5'- AAACCGTTACCATTACTGAGTT - 3'
miR-16	5'- TAGCAGCACGTAAATATTGGCG- 3'
U6	5'- TTCGTGAAGCGTTCATATTTT- 3'

Chaque réaction qPCR a été obtenue en commençant par la préparation des mélanges maîtres pour chaque gène en combinant :

- a. "Master mix": 6.25 μ l
- b. Amorces 3' "MiScript Universal Reverse primer" : 1.25 μ l
- c. Amorces 5' "Forward spécifique primer" : 1.25 μ l
- d. Eau "RNase free water": 1.25 μ l

Et tout en prévoyant un volume suffisant dans chaque mélange pour tous les échantillons, (y compris les contrôles sans RT et sans ADNc), le tout réalisé en double et en préparant ~10% de mélange maître supplémentaire pour pallier aux pertes lors du pipetage. 10 μ L du mélange maître et 2 μ L de l'ADNc dilué sont ajoutés dans les puits d'une plaque qPCR de 384 puits (ThermoFisher cat no. AB-2384), pour un total de 9 puits pour chaque échantillon: 3 puits pour chaque amorce, pour un total de 3 amorces. La plaque a été ensuite insérée dans la centrifugeuse pendant 1 minute à 100 x g afin que tout soit bien au fond du tube, puis dans la machine BioRad CFX 384 en suivant les conditions de cycle suivantes :

- a. 95°C pendant 5 minutes
- b. 95°C pendant 15s
- c. 55°C pendant 30 secondes
- d. 72°C pendant 30 secondes
- e. Détection et cycle b-c x40

- f. Détection de la courbe de fusion de 60 à 95 °C avec une vitesse de rampe de 0,5 degré/seconde.

A la fin du cycle, qui dure environ 2 heures, les données sont envoyées par courrier électronique à l'utilisateur et peuvent être ouvertes à l'aide du logiciel Bio-Rad CFX Maestro. Dans le logiciel, sous l'onglet "Melt Curve", on vérifie que chaque échantillon contient un seul pic. Si plusieurs pics sont visibles, les paramètres du cycle qPCR peuvent être ajustés selon les recommandations du fabricant. Sous l'onglet "Quantification", les données sont exportées vers Excel pour leur analyse.

2.10 Injections de VE aux souris

L'expérimentation qui concerne l'injection de VE aux souris a été faite en utilisant les souris de type sauvage âgées de 4 à 6 semaines, sans particularité de sexe, disponibles à l'animalerie de l'université. 4 souris ont été utilisées pour chaque condition, avec comme contrôle des souris injectées avec des exosomes purifiés de cellules Hek293T Wild Type.

Injection

L'injection a été faite avec les exosomes des cellules U118, H2, H3, F5 et HEK293T purifiés par FFT et marqués au DiR (Biotium Sciences, 60017) pour le traçage des exosomes par la fluorescence. Après avoir déterminé le nombre de nanoparticules à l'aide du "zetaview" comme décrit plus haut, $10E+13$ Particules/ml ont été injectés par souris en empruntant la voie intraveineuse au niveau de la queue. Elles ont été ensuite replacées dans leur cage jusqu'à l'euthanasie.

Euthanasie et prélèvement d'organes

7 heures après l'injection, les souris ont été euthanasiées par l'injection par voie intra-péritonéale de barbiturique 10mg/kg (pentobarbital sodique) suivi de la dislocation cervicale pour s'assurer qu'elles ne ressentent aucune douleur lors de la dissection.

La dissection a été procédée d'abord par l'ouverture médiane thoraco-abdominale suivie de la section de l'oreillette droite et l'injection de 1xPBS dans le ventricule gauche en vue d'une exsanguination. Ensuite, les différents organes (cerveau, moelle épinière, cœur, poumons, foie, reins, rate et petit intestin) ont été prélevés et mis dans des tube de 50ml contenant du Paraformaldéhyde (PFA).

Analyse des données

La lecture de la fluoresce des organes a été réalisée dans la machine IVIS (In Vivo Imaging Instrument). Les données transférées sur un fichier Excel, ont été analysées. Les graphes et les analyses statistiques ont ensuite été obtenues sur Graph Pad Prism9.

Préparation des tissus cérébraux pour microscopie

a. Microtomie

Mis dans du PFA pendant environ 24 à 48h, les tissus ont été ensuite placés dans des tubes de 50 ml avec du sucrose préparé à 30% jusqu'à ce que les tissus arrêtent de flotter et tombent au fond du tube. Ils sont ensuite congelés, puis montés sur OCT (Optimal Cutting Température) (Fisher Healthcare, 4585) avant d'être coupés dans le microtome à 2 μ m d'épaisseur, mis sur des lames chargées et conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation.

b. Immunofluorescence

Les coupes de tissus fixées sur les lames ont été préparées pour la microscopie en passant par ces différentes étapes :

Lavage avec du tampon "Tris-buffered Saline" 1xTBS (NaCl, Tris 1M pH :8, eau milliQ) à 2 reprises pour une durée de 5 minutes chacune, puis ajout du citrate préchauffé sur les lames pendant 20 minutes. Ajout de la solution de perméabilisation et de blocage : 10% BSA (Bovine Serum Albumin) et 0.1% TritonX 100 dans du 1xTBS pendant 1 heure. Ajout des anticorps primaires sur les lames : CD31 et Flag à une concentration de 1 :100 dans de la solution de perméabilisation pendant toute la nuit. Ajout des anticorps secondaires sur les lames : Alexa fluor 488 Mousse et 546 Rabbit à une concentration de 1 :200 dans de la solution de perméabilisation pendant 1 heure. Ajout d'une goutte de DAPI "mounting medium" (Invitrogen, D1306) sur chaque coupe de tissus, puis recouvertes avec du "coverslip" 1.5 et scellées avec "nail polish." Chacune de ces étapes a été suivie par du lavage avec du tampon 1xTBT à 2 reprises pour une durée de 5 minutes chacune avant de passer à celle suivante.

c. Microscopie

La visualisation des coupes de tissus du cerveau a été performée par Dr Kallol Dutta, sur le microscope Zeiss Axiolmager M2, en utilisant l'objectif 1.4 (63X).

2.11 Test statistiques

Les analyses statistiques de la quantification du western blot, du nombre et de la taille des exosomes, des concentrations relatives de micro-ARN ainsi que des intensités de la fluorescence des exosomes marqués et injectés aux souris ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 9. La distribution normale a été supposée pour tous les tests. Des tests ANOVA unidirectionnelle

ont été effectués, suivis d'un test de comparaisons multiples (Šídák ou Tukey). Le test de comparaison multiple de Tukey a été utilisé dans les situations où chaque moyenne était comparée à toutes les autres moyennes et le test de comparaison multiple de Šídák a été utilisé lorsqu'une moyenne a été comparé aux autres. Le "Standard Error of Means" (SEM) a été aussi appliqué. La signification statistique est représentée comme suit : * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

Chapitre 3 : RÉSULTATS

Ce chapitre à travers lequel les résultats de nos expériences vont être décrits sera divisé en 2 sous-chapitres, dont le premier traitera des résultats obtenus à partir des expérimentations réalisées sur les cellules (modifications par la méthode CRISPR et transfection de siARN). Tandis que dans le second sous-chapitre seront élaborées les données résultant des expériences d'injection de VE aux souris. Chacun de ces sous-chapitre sera suivi d'une discussion y relatif (discussion 1 et discussion 2).

3.1 Modifications géniques et enzymatiques des cellules et répercussions sur les VE

Les cellules secrètent des exosomes de nature différente en fonction, non seulement de sa situation physiologique ou pathologique, mais également en tenant compte des impacts que des manipulations au niveau de leurs gènes ou de leurs enzymes peuvent avoir sur le fonctionnement de leurs molécules ou de leurs organites. Diverses sous-populations d'exosomes ont ainsi pu être identifiées et peuvent être utile pour servir, ultérieurement, de base pour la purification d'une sous-population d'exosomes désignée à une fin bien spécifique.

Par ailleurs, il est important de noter que bien que des méthodes de purification d'exosomes est en constante évolution, certains défis existent encore, de manière critique, en ce qui a trait à l'analyse des exosomes. Par conséquent, les résultats discutés lors des études sur les exosomes reflètent ceux des exosomes mélangés avec d'autres véhicules électriques. Aussi, les marqueurs biologiques actuellement disponibles ne peuvent-ils reconnaître qu'une sous-population d'exosomes avec un contenu spécifique.^{102,179}

3.1.1 Des marqueurs de VE ont été identifiés et différenciés de ceux des cellules

Les VE sont constituées de protéines, de lipides et d'acides nucléiques. Certaines de leurs protéines sont insérées à la surface de leurs membranes et la plupart servent de marqueurs spécifiques permettant de les caractériser et de les isoler par immuno-affinité, comme les tétraspanines (CD9, CD63, CD81). Ces protéines transmembranaires ou ancrées à la membrane des exosomes servent de témoin pour la présence d'une bicouche lipidique - une des caractéristiques des exosomes - des vésicules du culot biologique. D'autres protéines de transport et de fusion membranaires (Annexines, GTPases, Flotilline), ainsi que celles de biogenèse des MVB (Alix, TSG101) et cytosoliques (Syntenine, Alix) ont été identifiées et acceptées comme étant des marqueurs protéiques spécifiques des VE. Ces marqueurs protéiques, notamment les tétraspanines (CD63) et le syntenine-1 interviennent dans la production d'exosomes pour une voie indépendante du complexe ESCRT. Le TSG101 intervient spécifiquement dans un processus de biogenèse dépendante de ESCRT, tandis qu'Alix, faisant partie des protéines du complexe III, joue un rôle dans la biogenèse des exosomes pour les voies à la fois dépendante et alternative de cette machinerie de transport.¹⁰⁶

Cette spécificité qu'expriment ces marqueurs peut également être caractéristique d'un type de cellules en particulier. Cela justifie leur utilisation pour spécifier la provenance des VE, comme c'est le cas de bon nombre de cancers qui ont été identifiés, différenciés et leurs sites métastatiques prédits en fonction des marqueurs analysés à partir de la cargaison protéique des VE.¹⁰⁷

Ici, nous avons identifié certains des marqueurs spécifiques de VE tels que CD9, CD63, Flotilline-2, Syntenine-1 et Alix. Le TOMM20 nous a servi de contrôle négatif qui, normalement, est absent dans les VE et présent dans les cellules. Les tétraspanines identifiées, CD9 et CD63, (Figure 2) sont des protéines de surface membranaires des VE et le CD63 joue également un rôle

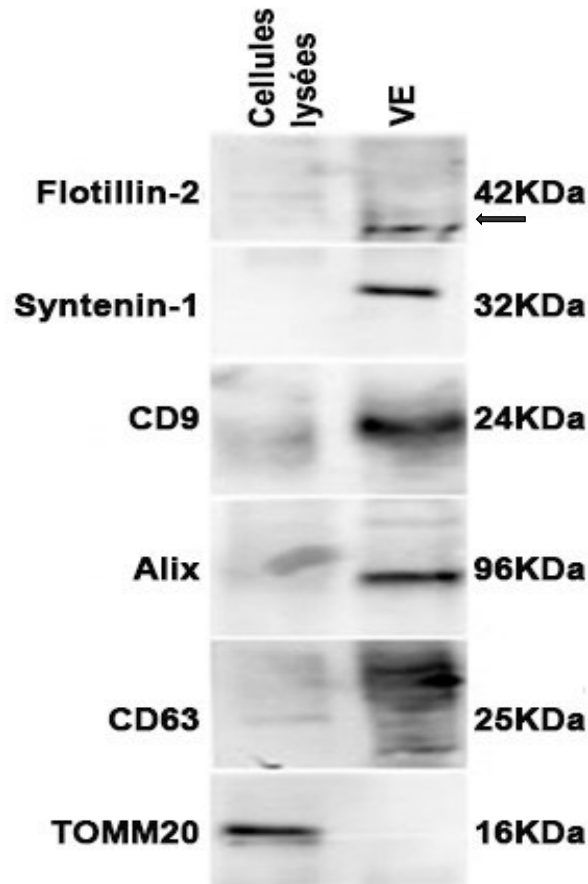


Figure 2 : Identification de certains marqueurs de VE Ce Western Blot a été réalisé avec 15 µg de protéines de cellules HEK293T lysées et des exosomes dérivés de ces cellules. La purification d'exosomes a été faite par ultracentrifugation (comme décrit plus haut). L'identification de ces différents marqueurs de VE a été obtenue en utilisant les anticorps correspondants.

dans la biogenèse pour la voie indépendante de ESCRT. Le Flotillin-2 est une protéine de fusion membranaire. La protéine Synenine-1 est dite d'échafaudage, elle joue un rôle dans la biogenèse en se liant à Alix pour diriger les protéines syndécanes vers les membranes endosomales. C'est également l'une des voies indépendantes de la machinerie ESCRT. Alix est une protéine impliquée dans la biogenèse des MVB et le TOMM20 est plutôt une protéine mitochondriale qui est présente seulement dans les cellules.

3.1.2 Production et validation des cellules TSG101 Knock Out

La méthode CRISPR-Cas9 utilisée dans de nombreuses études pour l'édition du génome et par conséquent, la modification de l'expression des gènes, nous a permis d'inhiber l'expression du gène TSG101 dans des cellules HEK293T.

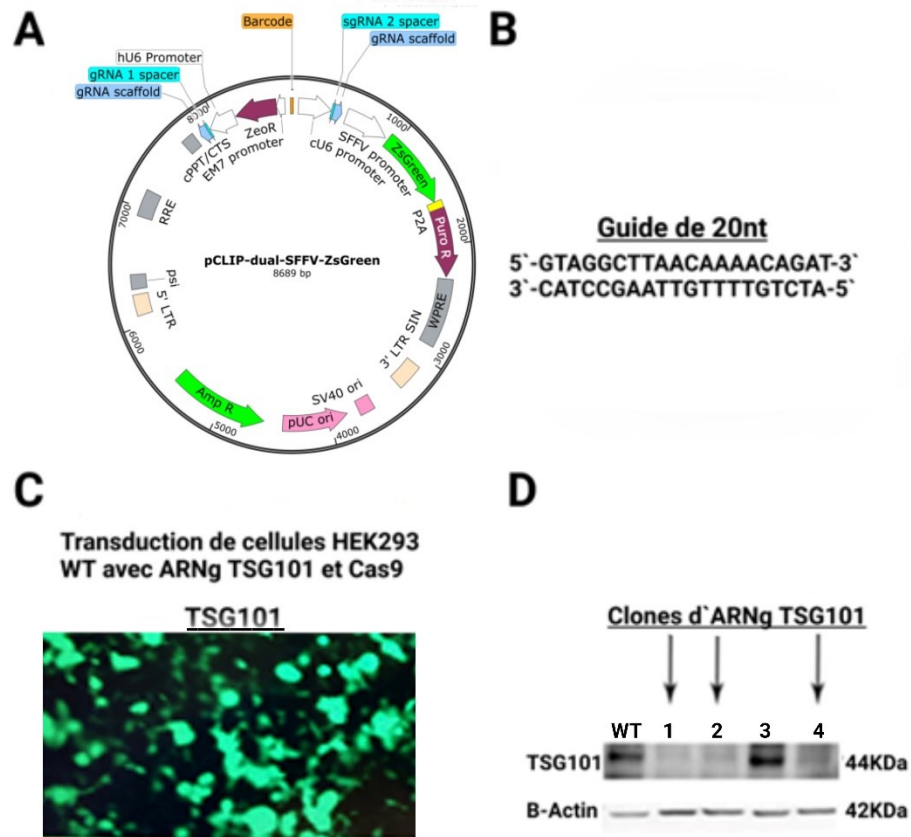


Figure 3 : Réalisation de la transfection permettant d'aboutir aux cellules TSG101 KO. A) Représentation de la cartographie visuelle du plasmide pCLIP-dual-SFFV-ZsGreen-Puromycin ciblant le gène TSG101. B) Séquence de 20 nucléotides du guide ARN TSG101. C) La réussite de la transfection a été vérifiée par l'émission de la fluorescence verte des cellules sous le microscope ZOE. Cette fluorescence verte est due au GFP (Green Fluorescent Protein) lequel a été intégré dans la confection du plasmide. D) Le Western Blot démontre le Knock Out dans les puits 1,2 et 4 en utilisant l'anticorps anti-TSG101, et l'anticorps anti-β-Actine - protéine du cytosquelette présente dans toutes les

cellules et qui n'a pas été modifiée dans notre étude – a été mis sur la même membrane permettant ainsi de certifier la présence de protéine dans les puits TSG101 KO.

Des cellules monoclonales ont été obtenues après transfection avec le plasmide #7251 (pCLIP-dual-FSSV-ZsGreen-Puromycin) et le plasmide #52962 (pLentiCas9Blast) pour le silence du gène TSG101. Cette transfection a été suivie de la sélection des cellules transfectées par l'utilisation de la puromycine qui constitue l'antibiotique à laquelle lesdites cellules sont résistantes. Ces cellules ont été ensuite prélevées, comptées et diluées à une concentration de 20 cellules par ml de media. Dans une assiette de 96 puits, une dilution subséquente a été faite dans l'objectif d'avoir une cellule par puit. Les puits à une seule cellule ont été identifiés au microscope et ont ensuite été transférés progressivement dans des assiettes à plus grands puits jusqu'à des assiettes de 10 cm. D'où des lignées monoclonales de cellules TSG101 KO.

3.1.3 Le KO du TSG101 diminue la production de VE et modifie leur taille

La modification ou l'absence de certains des marqueurs protéiques des exosomes affectent leur production que ce soit en termes de qualité ou de quantité.¹⁰⁵ Certaines études ont pu prouver que le "Knock Down" (KD) du complexe III de la machinerie ESCRT dont Alix et les protéines associées aurait pour effet d'augmenter la production d'exosomes. La protéine Alix pourrait également modifier la cargaison protéique des exosomes et l'inactivation de la protéine VPS4B augmenterait aussi leur production. Cependant, la déplétion du gène TSG101 pour la traduction de protéine du même type diminuerait le nombre d'exosomes à être secrété par les cellules.¹⁰⁵

Nos données obtenues par le *Nanoparticle tracking analysis* indiquent une diminution considérable dans la production des exosomes par les cellules TSG101 KO, tandis qu'une légère augmentation de taille est notée, comparativement à l'analyse des exosomes produits par les

cellules HEK WT. De façon plus précise, on note une production relative autour de 10 millions de VE pour les exosomes WT avec une taille majoritaire entre de 75 et 90 nm, tandis que les exosomes

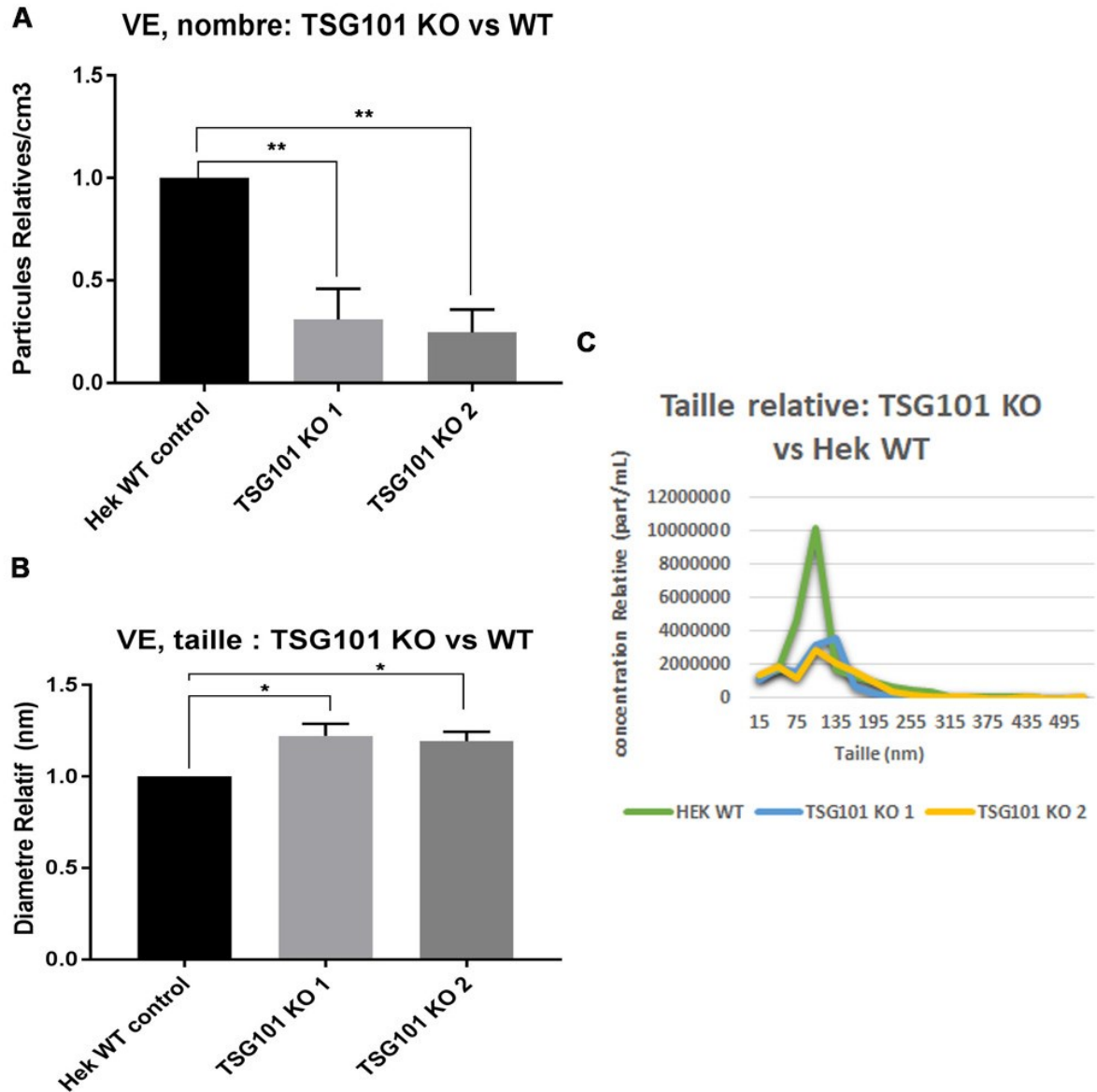


Figure 4: La délétion du gène TSG101 affecte le nombre et la taille de VE secrétées par les cellules. A) L'analyse de suivi des nanoparticules prélevées des cellules TSG101 KO et purifiées par centrifugation différentielle a révélé une diminution de plus de 50% de la production de VE comparativement à celles obtenues des cellules HEK WT. Cependant, B) une augmentation de taille des VE de cellules KO a été observée dans les mêmes échantillons pour un total de 4 échantillons provenant de 4 expérimentations distinctes. C) Ce graphe Excel qui représente de façon plus

claire la différence de nombre et de taille montrée sur les figures 4A et 4B a été réalisé avec les données de Word pad émises automatiquement après le chargement d'un échantillon de VE dans le zetaview.

TSG101 KO beaucoup moins nombreux (entre 3 et 4 millions) ont majoritairement une taille autour de 100 et 135 nm.

3.1.4 Le KO du TSG101 diminue l'abondance d'autres marqueurs protéiques

Le silence de certains gènes médiant la traduction de protéines spécifiques modifie également la présence d'autres protéines dans les VE. Cependant, l'immunomicroscopie prouve que chaque gène modifie différemment la taille ou la cargaison protéique des VE.¹⁰⁵ Selon cette étude réalisée par *Colombo et al. 2013*, la délétion du gène TSG101 - pour la protéine TSG101 du complexe ESCRT - réduit l'expression de la protéine CD63.¹⁰⁵

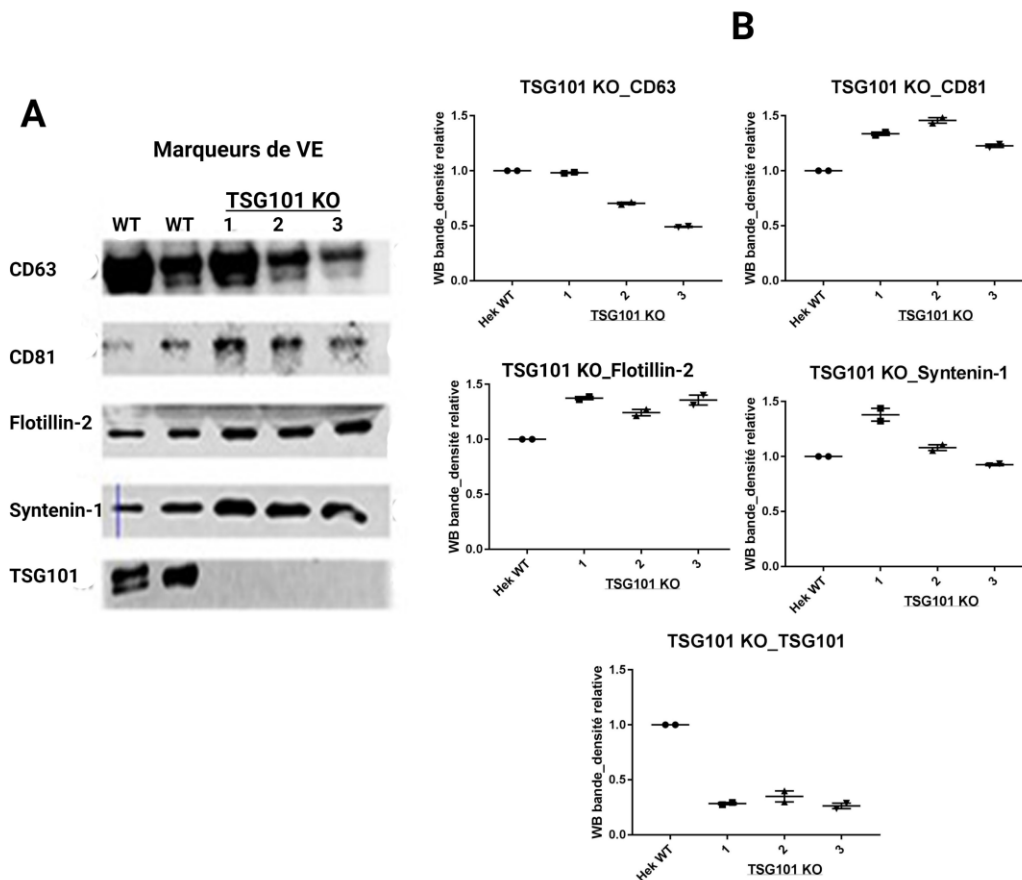


Figure 5 : Identification et quantification des marqueurs de VE, des VE de cellules TSG101 KO. A) Le Western Blot réalisé avec des échantillons d'exosomes purifiés des cellules TSG101 KO. Ces échantillons proviennent des 3 puits 1, 2 et 4 de KO représentés sur la figure 3D et ont été chargés ici dans les puits identifiés 1,2 et 3. Les 2 premiers puits contiennent des échantillons d'exosomes de cellules HEK WT. 15 µg de protéines a été considéré pour chacun des échantillons. N=2 B) Les graphes représentées ici ont été obtenues sur graphPad Prism9 à partir de la quantification de l'intensité des bandes de protéines sur Fiji J.

Les VE purifiées des cellules KO ont été mis sur gel en vue de la vérification de certains marqueurs et la quantification a été effectuée à l'aide de Fiji J. Les analyses suivantes (Figure 5) démontrent une diminution relative des protéines CD63, Syntenine-1 (surtout dans le 3^e puit) et TSG101 dont le gène n'est d'ailleurs pas exprimé dans ces VE. Tandis que les protéines CD81 et Flotilline-2 sont augmentées. Ces résultats nous laissent suggérer que le TSG101 influence le chargement des VE à différents points, cependant l'abondance de certaines protéines n'est pas touchée par cette déplétion.

3.1.5 L'absence du gène TSG101 dans les cellules modifie l'enrichissement du micro-ARN 451 dans les VE

Dans le but d'approfondir nos expériences sur l'impact que peut avoir la non-expression du gène TSG101, nous avons quantifié les montants de certains micro-ARN dans les exosomes KO. Le micro-ARN 451 étant normalement très abondant dans les exosomes,¹¹¹ son expression a été mesurée et comparée aux micro-ARN U6 et miR-16 qui sont des gènes de référence interne le plus souvent utilisés pour la normalisation de micro-ARN.¹⁵⁹ Nous avons eu recours à deux conditions, l'une pour laquelle nous avons utilisé un même montant d'ARN et l'autre avec un même volume d'ARN purifié des VE de cellules TSG101 KO. L'analyse qPCR des miARN est réalisée à l'aide du kit Mir-X TB Green qRT-PCR (Takara Bio cat no. 638816). L'amorce 3' pour toutes les réactions est l'amorce 3' universelle mRQ fournie dans le kit. L'amorce 5' utilisée est conçue par

notre laboratoire pour la cible spécifique et commandée à IDT (Integrated DNA Technology). Les stocks d'amorces sont dilués à 100µM. Nos analyses ont révélé une diminution de l'enrichissement du miR-451 d'environ 50% dans les 2 conditions de RT-qPCR (décrit dans la section méthode), après avoir utilisé la formule suivante : $C_T = (C_{T \text{ miR-451}} - C_{T \text{ U6}})_{\text{cible}} - (C_{T \text{ miR-451}} - C_{T \text{ U6}})_{\text{contrôle}}$ et $C_T = (C_{T \text{ miR-451}} - C_{T \text{ miR-16}})_{\text{cible}} - (C_{T \text{ miR-451}} - C_{T \text{ miR-16}})_{\text{contrôle}}$.

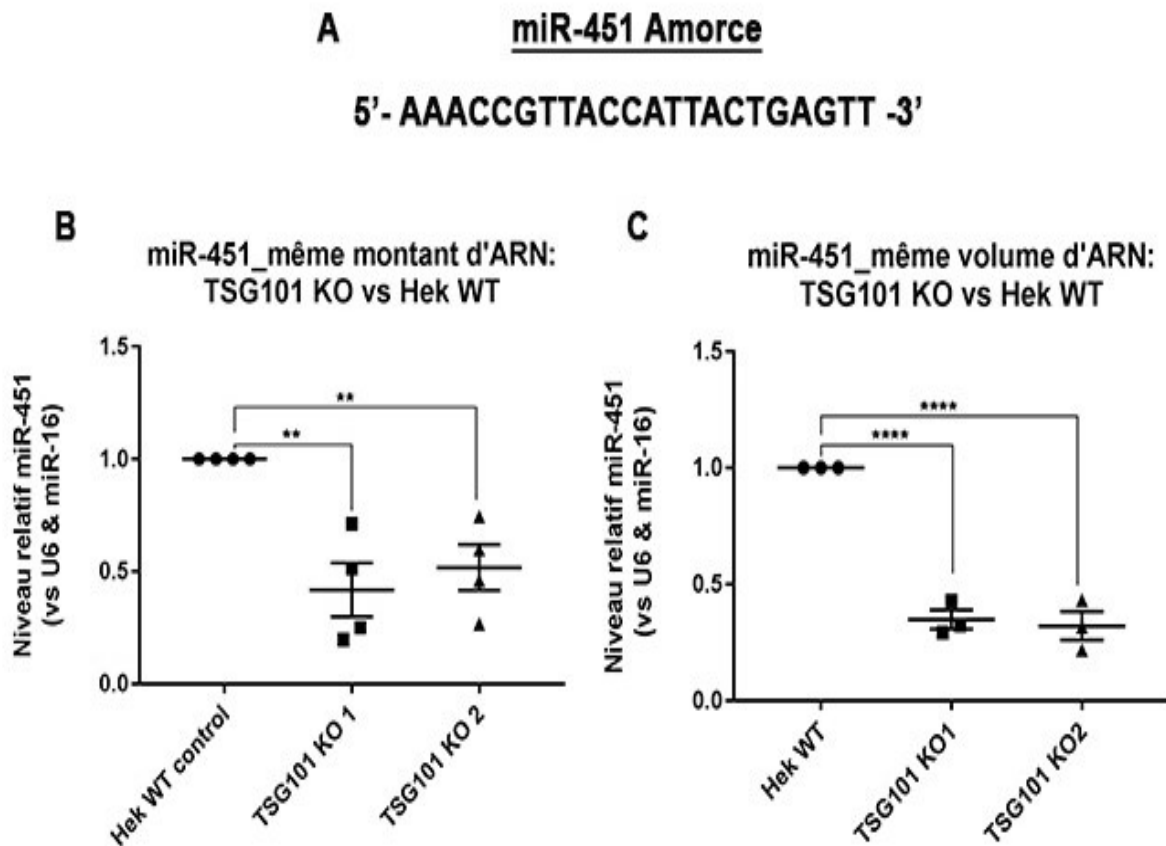


Figure 6 : L'absence du gène TSG101 dans les cellules modifie l'enrichissement du micro-ARN 451 dans les VE. A) Cette séquence de 22 nt constitue l'amorce miR-451 pour la réaction qPCR. **B)** Cette réaction qPCR est réalisée avec un montant d'ARN de 500 ng, dilué après l'ADNc, à raison de 2 µl pipeter dans chaque puits avec 3 puits pour chaque condition. N=4 **C)** Nous avons suivi le schéma précédent pour cette réaction, avec la différence de l'utilisation du même volume d'ARN, soit 6.5 µl pour chaque échantillon. N=3

Alors que les niveaux de miR-16 et de U6 sont très faiblement régulés à la baisse dans les deux conditions de l'expérimentation.

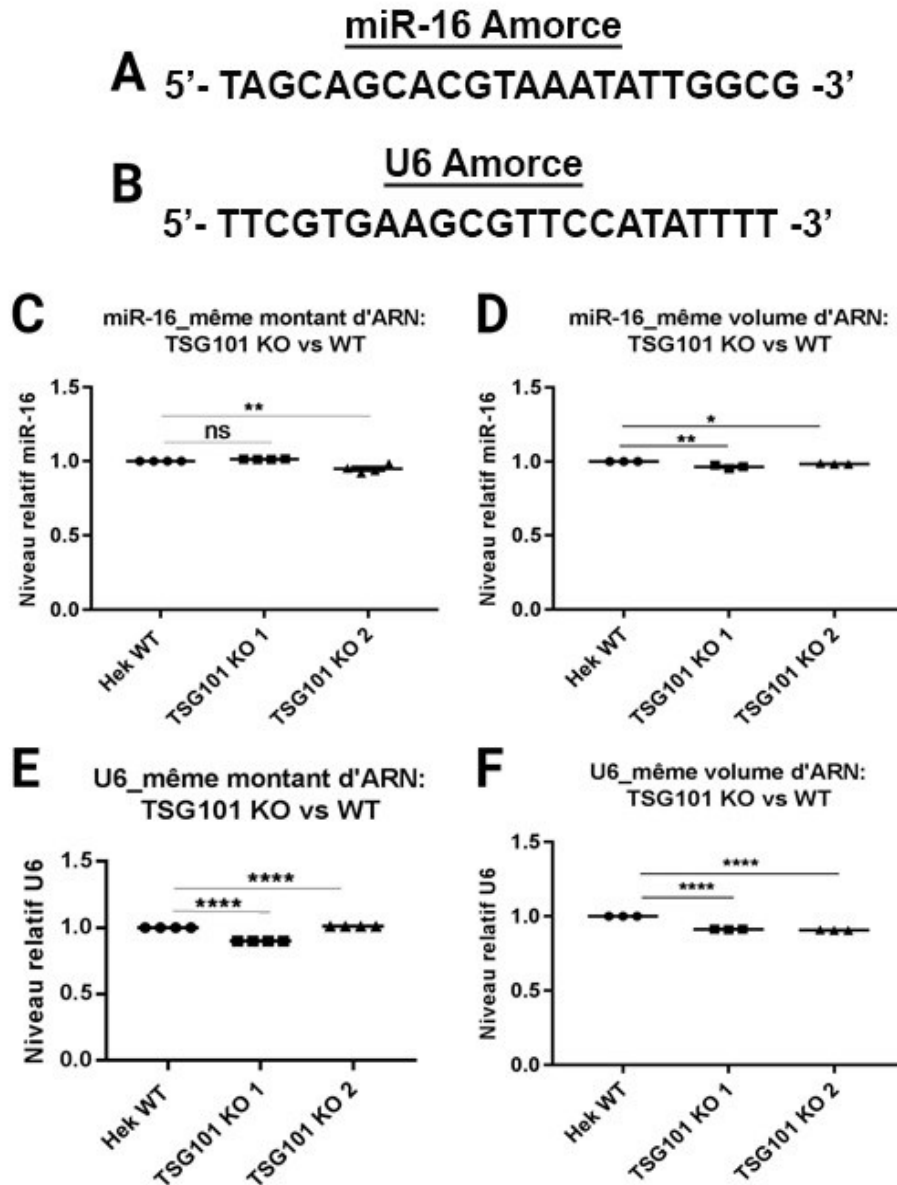


Figure 7 : Les niveaux des micro-ARN (miR-16 et U6) sont légèrement modifiés dans les VE TSG101 KO. A&B)

Ces séquences de 22 nt constituent les amorces miR-16 et U6 pour les réactions qPCR. **C&E)** Ces réactions qPCR ont été réalisées avec un montant d'ARN de 500 ng, dilué après l'ADNc, à raison de 2 µl pipeter dans chaque puit avec 3 puits pour chaque condition. N=4 **D&F)** Nous avons suivi le schéma précédent pour ces réactions, avec la différence de l'utilisation du même volume d'ARN, soit 6.5 µl pour chaque échantillon. N=3

3.1.6 Production et validation de cellules avec inhibition de la sphingomyélinase 2 neutre (nSMase2) par l'utilisation du siARN SMPD3

Une classe d'enzymes nommées sphingomyélinases neutres (N-SMases) est nécessaire pour déclencher la réaction d'hydrolyse de la sphingomyéline en vue de générer le céramide. Ce sphingolipide est très actif biologiquement et est impliqué dans divers processus de la cellule dont la production de VE.¹⁷⁵ Les SMases ont été classées en 4 sous-types en se basant sur le pH (potentiel d'hydrogène) favorisant leur activité optimale, dont un pH acide, alcalin ou neutre. Parmi ces 4 sous-types de SMases - nSMase 1 (NSM1 ou N1), nSMase 2 (NSM2 ou N2), nSMase 3 (NSM3 ou N3) et nSMase associée aux mitochondries (MA-nSMase) - le nSMase2 attire la plus grande attention à cause de sa stabilité et de son implication dans des fonctions cellulaires telles que la prolifération cellulaire et la mort cellulaire programmée, ainsi que la réponse inflammatoire et la pathogenèse de plusieurs maladies, entre autres.¹⁷⁷

La nSMase 2 se trouve insérée au niveau de la membrane plasmique de l'appareil de golgi (qui lui à sa part d'implication dans la formation des MVB) et est codée par le gène de la sphingomyéline phosphodiesterase 3 (SMPD3).¹⁷⁶ Par conséquent, la non-expression de la N-SMase-2 doit nécessairement passer par l'inhibition de l'expression de la SMPD3 qui peut être induite soit par l'inhibiteur GW4869 soit par le siARN SMPD3.¹⁰⁵ Ce dernier a été utilisé dans notre étude afin de mener la même suite d'expérimentations que nous avons eues avec les cellules et les VE TSG101 KO.

Deux séquences de siARN SMPD3 ont été utilisées afin d'avoir deux groupes de cellules transfectées différentes. Nous avons suivi le protocole décrit plus haut dans la section méthode. Des cellules HEK293 Wild-type ensemencées dans des assiettes de 10 cm (4 au total), ont été transfectées en utilisant le lipofectamine RNA imax et l'OPTIMEM. Deux de ces assiettes ont été utilisées comme contrôles dont un négatif, transfectée avec le "Universal Negative Control siARN"

et un dit positif dont les cellules n'ont pas été traitées. Toutes les assiettes ont été soumises aux mêmes conditions et laissées dans l'incubateur pendant 3 jours avant que les cellules soient prélevées et traitées avec le tampon de lyse cellulaire en vue de vérification de l'absence de la protéine N-SMase-2 par Western Blot.

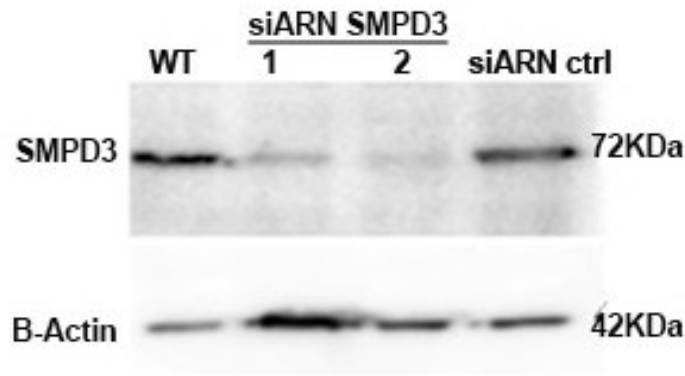


Figure 8 : Vérification de la réussite de la transfection des cellules HEK WT avec le siARN SMPD3. A) Western Blot réalisé en soumettant la membrane à l'anticorps primaire anti-SMPD3 (R&D system, MAB7184). 15 µg de protéines ont été chargées dans chaque puit. Le premier puit (Figure 8) contient les cellules HEK WT non traitées, le dernier puit est chargé avec l'échantillon de cellules de contrôle négatif (siARN control). Les puits notés 1 et 2 contiennent les échantillons de cellules transfectées avec le siARN SMPD3. La β -Actine - protéine du cytosquelette présente dans toutes les cellules et qui n'a pas été modifiée dans notre étude – a été mis sur la même membrane permettant ainsi de certifier la présence de protéine dans les puits SMPD3.

3.1.7 L'inhibition de la nSMase2 par le siARN SMPD3 dans les cellules affecte négativement la production des VE

Le silence de l'expression de la sphingomyélinase 2 neutre dans les cellules influence non seulement le tri de la cargaison mais également la production et l'excrétion de VE dans le milieu extracellulaire.¹⁹ En effet, la nSMase 2 contribue aux mécanismes entraînant le bourgeonnement des VIL en ETT puis MVB. Il a été rapporté que l'ensemble de ces mécanismes d'action dirigés par la nSMase 2 pour aboutir à la sécrétion d'exosomes peuvent être régulées par la modulation

de l'activité ATPase. Ce complexe enzymatique a pour but de diminuer l'acidité de la lumière des MVB, la rendant ainsi favorable à la sécrétion des exosomes. Par conséquent, l'inhibition de la nSMase 2 entraîne l'acidification de la lumière des MVB en induisant l'assemblage du complexe ATPase aboutissant ainsi à une diminution de la sécrétion d'exosomes.¹⁷⁸

Ici, des VE ont été purifiées par centrifugation différentielle à partir du surnageant des cellules traitées avec le siARN SMPD3. L'analyse du suivi des nanoparticules a révélé une diminu-

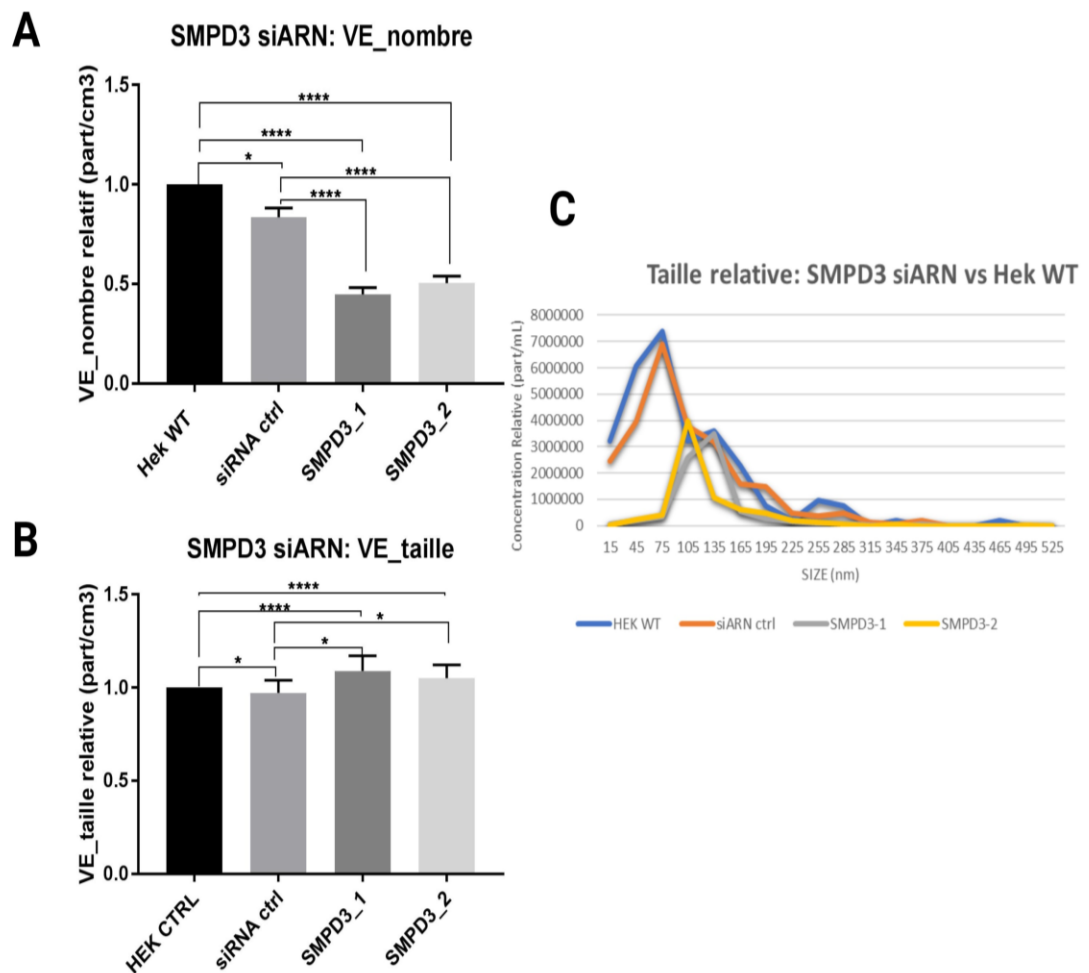


Figure 9 : Modifications de nombre et de taille des VE provenant des cellules avec N-SMase 2 inhibée. A) Diminution de plus de 50% de la production de VE comparativement à celles obtenues des cellules HEK WT. Cependant, **B)** une augmentation de taille de ces VE a été observée dans les mêmes. N=4 **C)** Ce graphe Excel qui

représente de façon plus claire la différence de nombre et de taille montrée sur les figures 9A et 9B a été réalisé avec les données de Word pad émises automatiquement après le chargement d'un échantillon de VE dans la machine zetaview.

tion d'environ 50% de la production d'exosomes produits par ces cellules. Par ailleurs, une différence de taille légèrement plus élevée de ces exosomes comparativement à ceux des cellules Wild-type a été observée.

3.1.8 L'inhibition de la nSMase2 diminue l'expression de certains marqueurs

Le céramide, produit par l'hydrolyse de la sphingomyéline par des sphingomyélinases ou par la dégradation de sphingolipides complexes contenues dans les lysosomes, joue un rôle majeur dans les voies de biogenèse indépendante de ESCRT et influence également le tri de la cargaison et la production de VE.¹⁹ Ce sphingolipide est donc nécessaire au tri des protéines dites protéolipidiques en VIL dont le destin sera la sécrétion.¹⁷⁸

Notre étude démontre que le céramide pourrait influencer l'expression ou la cargaison de certains marqueurs de VE par ces modifications considérables observées à cause de l'inhibition de la N-SMase 2. Le tétraspanines CD63, qui également assure la cargaison dans les VE pour une voie indépendante de la machinerie ESCRT a été fortement diminué, ainsi que le CD81 (à une différence moindre). Le Flotilline-2 et la Syntenine-1 ont été faiblement modifiés, respectivement, un peu à la baisse et, à peu près à la même intensité en comparaison avec les contrôles (siARN contrôle négatif et cellules HEK WT non traitées). Le TSG101, qui est une protéine du complexe I, ESCRT a été régulé à la baisse dans ces expériences. Cela nous amène à penser que ces deux voies impliquant le TSG101 d'une part et le céramide d'autre part pourrait s'influencer entre elles

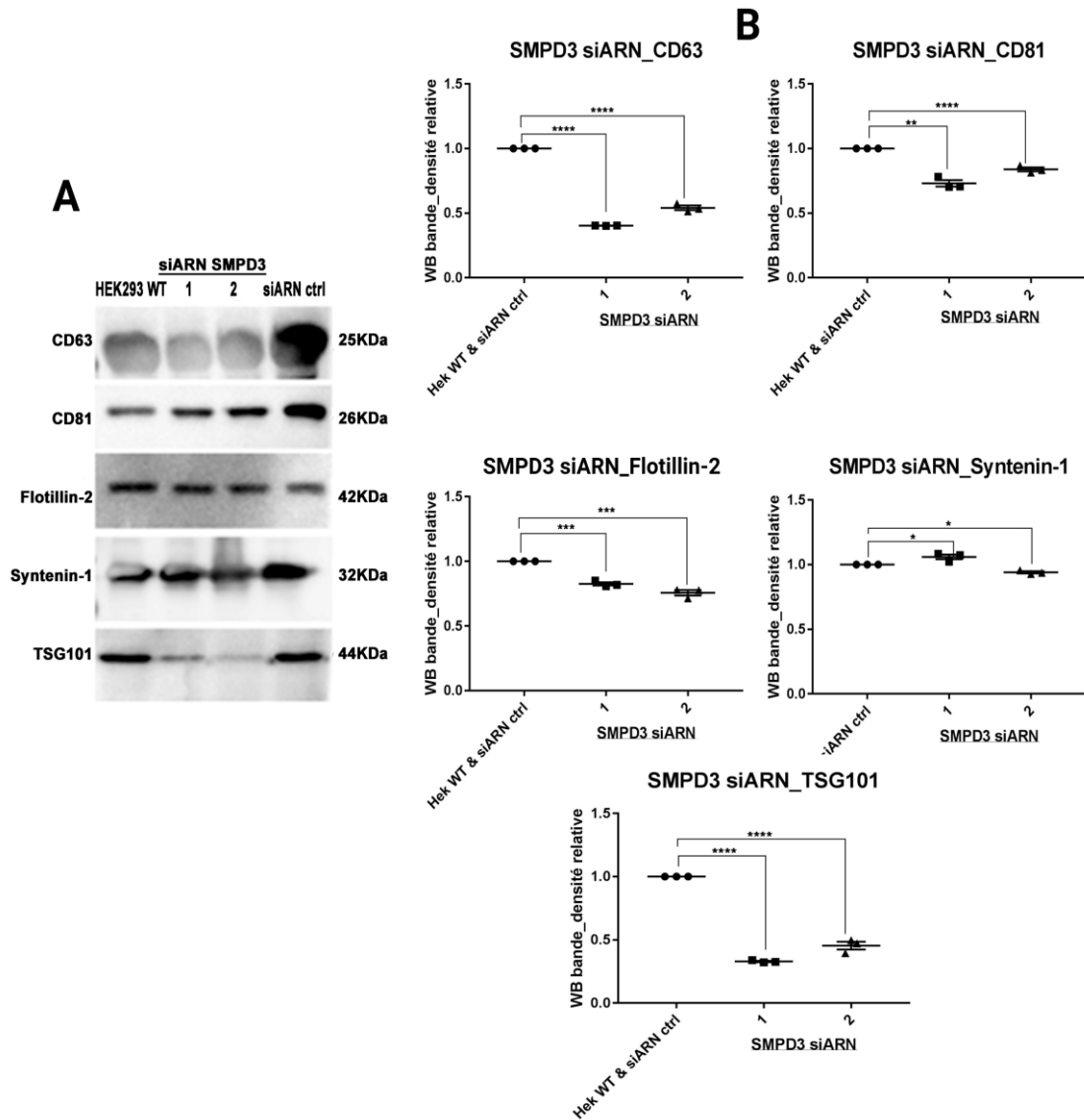


Figure 10: L'absence de la N-SMase 2 dans les cellules à un impact sur certains marqueurs de VE. A) Les puits ont été chargés dans le même ordre que sur la figure 8, à 15 µg de protéines pour chaque échantillon. Les différents anticorps ont ensuite été mis sur les membranes pour analyse. N=3 **B)** Les graphes représentés ici ont été obtenues sur graphPad Prism9 à partir de la quantification de l'intensité des bandes de protéines (des membranes de Western Blot) sur Fiji J.

et que l'absence de l'une impacte l'expression de l'autre. De plus, le profilage des mêmes marqueurs étudiés dans les 2 expériences se ressemble, d'où la possibilité que ces 2 voies se comportent de la même façon dans la biogenèse des exosomes

3.1.9 L'inhibition de la nSMase2 par le siARN SMPD3 diminue l'abondance du miR-451 dans les VE

Le micro-ARN 451 étant normalement très abondant dans les exosomes, son expression a été mesurée et comparée aux micro-ARN U6 et miR-16 qui sont des gènes de référence interne le

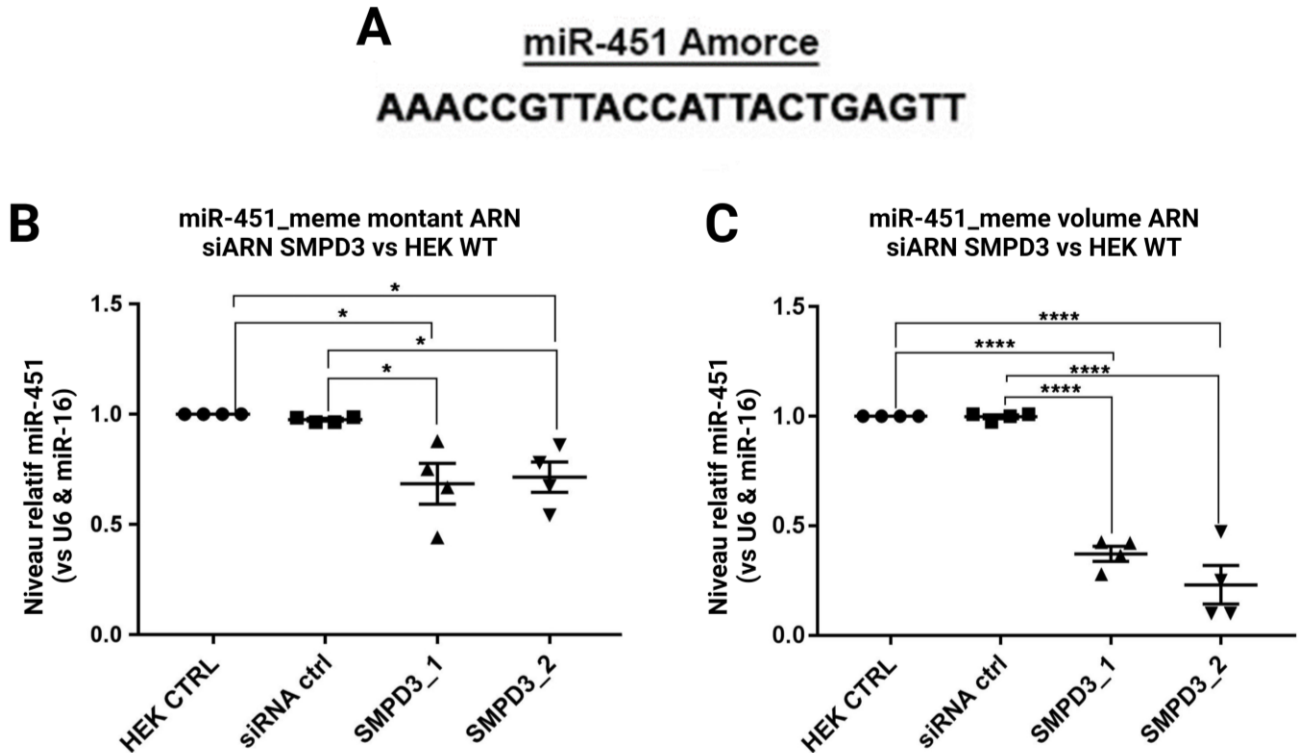


Figure 11 : L'absence de l'enzyme n-SMase-2 dans les cellules modifie l'enrichissement du micro-ARN 451 dans

les VE. A) Cette séquence de 22 nt constitue l'amorce miR-451 pour la réaction qPCR. B) Cette réaction qPCR est réalisée avec un montant d'ARN de 500 ng, dilué après l'ADNc, à raison de 2 µl pipeter dans chaque puits et 3 puits pour chaque condition. N=4 C) Nous avons suivi le schéma précédent pour cette réaction, avec la différence de l'utilisation du même volume d'ARN, soit 6.5 µl pour chaque échantillon. N=4

plus souvent utilisés pour la normalisation de micro-ARN. Nous avons eu recours à deux conditions, l'une pour laquelle nous avons utilisé un même montant d'ARN et l'autre avec un même volume d'ARN. Ces VE ont été purifiées à partir des cellules traitées avec le siARN

SMPD3. L'analyse qPCR des miARN est réalisée à l'aide du kit Mir-X TB Green qRT-PCR (Takara Bio cat no. 638816). L'amorce 3' pour toutes les réactions est l'amorce 3' universelle mRQ fournie dans le kit. L'amorce 5' utilisée est conçue par notre laboratoire pour la cible spécifique et commandée à IDT (Integrated DNA Technology). Les stocks d'amorces sont dilués à 100µM. Nos analyses ont révélé une diminution de l'enrichissement du miR-451 d'environ 50% dans les 2 conditions de RT-qPCR en adoptant la formule suivante : $C_T = (C_{T \text{ miR-451}} - C_{T \text{ U6}})_{\text{cible}} - (C_{T \text{ miR-451}} - C_{T \text{ U6}})_{\text{contrôle}}$ et $C_T = (C_{T \text{ miR-451}} - C_{T \text{ miR-16}})_{\text{cible}} - (C_{T \text{ miR-451}} - C_{T \text{ miR-16}})_{\text{contrôle}}$.

Alors que les niveaux de miR-16 et de U6 restent pratiquement inchangés dans les deux conditions de l'expérimentation.

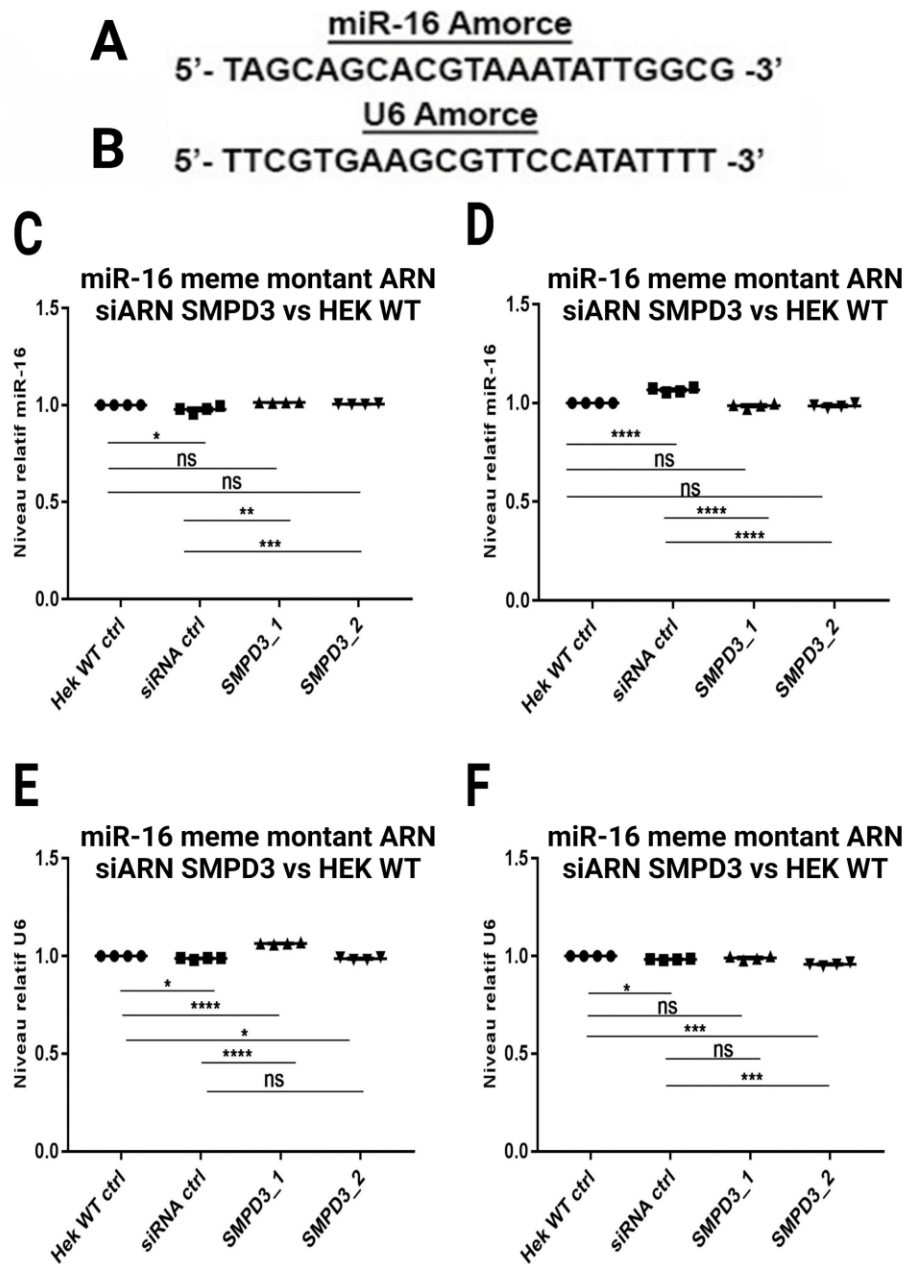


Figure 12 : Les niveaux des micro-ARN (miR-16 et U6) sont légèrement modifiés dans les VE provenant de cellules traitées avec le siARN SMPD3. **A&B**) Ces séquences de 22 nt constituent les amorces miR-16 et U6 pour les réactions qPCR. **C&E**) Ces réactions qPCR ont été réalisées avec un montant d'ARN de 500 ng, dilué après l'ADNc, à raison de 2 µl pipeter dans chaque puit et 3 puits pour chaque condition. **D&F**) Nous avons suivi le schéma précédent pour ces réactions, avec la différence de l'utilisation du même volume d'ARN, soit 6.5 µl pour chaque échantillon. N=4

Discussion 1

3.1.1 Des marqueurs de VE ont été identifiés et différenciés de ceux des cellules

Après la découverte des exosomes, il s'est révélé important de trouver des techniques qui peuvent permettre de les identifier facilement *in vitro*, afin de mener des expériences ultérieures permettant de les caractériser et de découvrir leurs potentiels. Étant donné que la taille des sous-catégories de VE peut se chevaucher et que des outils ayant la capacité de bien les décanter font défaut, les marqueurs protéiques et lipidiques se trouvant à la surface ou dans la lumière des exosomes constituent un moyen simple, abordable et efficace facilitant l'identification de ces nano vésicules combien convoitées.

Dans une étude menée par Kowal et al., on a pu identifier plusieurs protéines - telles que Flotillin-1, les protéines de choc thermique de 70 kDa (HSC70/HSP73, HSP70/HSP72) ou le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et les protéines de classe II, habituellement utilisées comme marqueurs protéiques des exosomes, à différents niveaux de flottaison dans un gradient de densité.⁵⁵ La procédure d'immuno-isolement, qui consiste à séparer des molécules par l'utilisation d'anticorps spécifiques, leur a également permis de déceler la présence simultanée des 3 protéines de tétraspanines dans une sous population de VE dérivées des endosomes faisant référence aux exosomes.⁵⁵

Dans cette étude, nous avons pu identifier des protéines habituellement réputées pour être des marqueurs de VE, comme des tétraspanines (CD9, CD63), Flotillin-2, Syntenine-1, Alix dans le culot obtenu après centrifugation différentielle du surnageant de cellules HEK293 de type sauvage. En contrepartie, nous avons utilisé un culot de cellules traité avec la solution de lyse cellulaire (pour l'extraction des protéines) à la même concentration (15 µg pour 20 µl) comme

contrôle négatif. L'absence de ces marqueurs protéiques dans les puits avec échantillons de cellules lysées mais présents dans les autres puits chargés avec des échantillons de VE nous a permis d'avoir la certification que nous avons bien des VE dans le culot que nous avons pu obtenir par ultracentrifugation. En revanche, la protéine TOMM20, qui est un marqueur spécifique des cellules à cause de son origine mitochondriale, n'a été identifié que dans les puits avec échantillon de cellules.

3.1.2 Production et validation des cellules TSG101 Knock Out

L'une des grandes découvertes réalisées au cours de cette dernière décennie est celle de la possibilité de l'application du système à répétitions palindromiques courtes régulièrement espacées regroupées avec des séquences associées (CRISPR/Cas9) des bactéries comme outil pouvant permettre d'éditer de façon précise des gènes dans les cellules en culture ou carrément dans les organismes animaux ou humains.¹³⁷ Ce système, découvert (mais non bien compris) par Ishino et al. en 1987 dans l'ADN de la bactérie *E. coli*, constitue le système immunitaire adaptatif utilisé par les bactéries et les archées leur permettant de conquérir une résistance contre l'invasion des phages et des éléments génétiques mobiles notamment les virus, en ciblant de manière spécifique des séquences d'acides nucléiques.¹³⁸

Ce système de défense adopté par les bactéries fonctionne en 3 étapes : d'abord il y a l'intervention des enzymes appelées nucléases (ciseaux moléculaires) qui sont utilisées pour couper un morceau d'ADN viral nommé Protospaceur, lors de la première invasion microbienne. Ce fragment d'ADN est alors stocké dans le génome de la bactérie entre des séquences palindromiques répétées en compagnie d'autres fragments de virus qui ont été précédemment en contact avec la bactérie. Cela forme ce qu'on appelle une mémoire immunitaire. Par la suite, lors d'une future invasion microbienne avec le même virus, l'enzyme Cas9 entreprend la

reconnaissance virale pour le motif adjacent au Protospaceur (PAM, qui est une courte séquence se situant en aval du site à atteindre) et attend le signal de l'ARN guide avant de procéder à la cassure double brin de l'ADN viral. Cet ARN guide est constitué d'un ARN complémentaire à l'espaceur viral qui a été stocké après la première invasion virale, désigné sous le nom d'ARN CRISPR (ARNcr) et d'un autre ARN appelé ARN trans-activant (ARNtracr) qui va servir d'échafaudage. Après la reconnaissance du PAM, la nucléase Cas9 procèdera à la localisation de la séquence cible en amont, sous la direction de l'ARN guide et crée enfin une cassure double brin dans l'ADN viral entraînant sa neutralisation puisqu'il est dépourvu de système de réparation de l'ADN.^{140,143,144}

Convoité par la recherche biomédicale, ce mécanisme moléculaire utilisé pour la première fois dans les cellules humaines par les Drs Doudna et Charpentier en 2012, est maintenant très prisé dans l'édition d'ARN, d'ADN, de base ou d'amorce.¹³⁹ Il est de nos jours utilisé dans la thérapie cellulaire et génique dont les divers essais cliniques pour le traitement de différentes maladies comme l'anémie falciforme et la cécité héréditaire, pour ne citer que celles-là. Il est tout aussi bien utilisé dans le diagnostic de maladies tel que très récemment mis en action dans des tests diagnostiques de la covid19, ainsi que dans l'agriculture et la bioénergie.^{136,139} Par ailleurs, d'autres méthodes permettant des manipulations du génome, telles que les nucléases à doigts de Zinc (ZFN) et les nucléases effectrices de type activateur de transcription « TAL effector nucleases » (TALEN) ont été à la disposition des chercheurs des années de cela.^{141,142} Cependant, leur utilisation était devenue limitée en raison de leur manque de spécificité à atteindre la cible.¹³⁹ Cette nouvelle méthode de reprogrammation génétique (CRISPR/Cas9) se basant sur la réparation de l'ADN après la cassure double brin, reconnaît et clive des séquences d'ADN de façon hautement spécifique. De plus, elle utilise soit la jonction d'extrémité non homologue (NHEJ) qui va entraîner

une invalidité des gènes cibles d'où un Knock Out, soit la réparation dirigée par homologie (HDR) qui confère la possibilité d'insérer de nouveaux gènes ou de fragments de matériels génétiques, d'où un Knock In.¹⁴⁵

Notre étude avait pour but de provoquer la déplétion d'un ou de plusieurs gènes dans les cellules. Ainsi, nous avons eu recours à cette technologie polyvalente d'édition génique pour obtenir un Knock out du gène de susceptibilité aux tumeurs 101 (TSG101) dans des cellules HEK293T. Ces cellules ont été ensuite utilisées pour réaliser d'autres expériences nous permettant de déceler les différents impacts que peut avoir cette modification génique sur la production, la présence des marqueurs protéiques et le contenu en certains ARN des VE.

3.1.3 Le KO du TSG101 diminue la production d'exosomes et modifie leur taille

Il a été rapporté que le silence de plusieurs gènes de l'ADN cellulaire a pour conséquence la modification de la production des VE en termes de nombre et de taille. Parmi ces gènes on a le HRS, le STAM1, le VPS4B, l'Alix et le TSG101 (tous faisant partie ou associés au complexe ESCRT) dont la non-expression peut, pour certains d'entre eux (comme Alix), augmenter, et pour d'autres (comme le VPS4B) diminuer la sécrétion de VE, bien que cela dépend aussi du type de cellules.^{4,105} Par ailleurs, ces modifications de taille, de nombre et/ou de contenu induites par l'absence des gènes mentionnés ci-dessus sont différentes pour chacun de ces gènes modifiés et ces différences ont été révélées lors de la quantification des VE à l'aide de l'immuno-microscopie électronique.¹⁰⁵ Une autre étude a pu démontrer que dans les cellules dont les sous-unités du complexe ESCRT ont été appauvries, il y a des modifications de la morphologie de certains composants et une production de VIL plus larges.³⁸ De même, d'autres marqueurs protéiques tel que le Rab27a a une influence sur la régulation de la production et du contenu des exosomes. Ainsi

la déplétion de ce gène aboutit non seulement à une modification de l'expression de certains marqueurs mais également à une diminution de la sécrétion des exosomes.³⁹

Dans cette étude, la délétion du gène TSG101 induite par la méthode CRISPR dans les cellules HEK293T nous a donné comme résultat une diminution considérable du nombre de VE relarguées par ces cellules Knock Out, tandis que la taille de ces VE serait plutôt augmentée par rapport à celle des VE secrétées par les cellules dont l'expression du TSG101 n'a pas été amenée au silence. Ces résultats nous démontrent que l'absence d'un constituant du complexe ESCRT dont le TSG101, à lui seul, peut parvenir à réguler à la baisse la production et le relargage des VE à plus de 50%. Ce qui correspond à la littérature qui révèle qu'il y a une diminution considérable des VE à être secrétées par les cellules avec TSG101 non exprimé.^{105,149} Le TSG101 étant impliqué dans le processus de biogenèse des exosomes depuis la formation des tubes vacuolaires des endosomes précoces, joue également un rôle dans l'invagination négative de la membrane endosomale et aurait la capacité de modifier la structure de ces endosomes selon cette étude menée par Razi et al.¹⁴⁹ Cela nous permet de suggérer que l'augmentation de taille des VE que nous observons dans notre étude est forcément liée à cette influence que possède le TSG101 sur la structure des endosomes.

3.1.4 Le KO du TSG101 diminue l'abondance d'autres marqueurs protéiques

Le TSG101, gène régulateur négatif de croissance tumorale, est ubiquitaire et interfère dans divers processus moléculaires et cellulaires que ce soit dans des conditions physiologiques ou pathologiques.¹⁴⁶ Découvert au cours des années 1990 dans une étude menée par Li et al., des modifications liées au Knock out fonctionnel apportées à ce gène a entraîné une transformation au niveau de la cellule et une expression à la hausse de la stathmine qui est également un gène impliqué dans la croissance tumorale.¹⁴⁸ D'autres scientifiques se sont ensuite intéressés à l'étude

de ce gène et ont élucidé son rôle bénéfique comme étant suppresseur de tumeur dans le cancer du sein.¹⁴⁷

Le TSG101 fait partie du complexe ESCRT qui est fortement impliqué dans la biogenèse des VE et est nécessaire à la survie ainsi qu'à l'homéostasie cellulaire, au point que des cellules dépourvues de ce gène sont vouées au phénomène d'autophagie par arrêt du cycle cellulaire.¹⁴⁶ Il a aussi été rapporté que le Knock Out du TSG101 dans les cellules HeLa diminue l'expression de la protéine tétraspanique CD63 et du CMH II qui est associé également aux VE.¹⁰⁵ La réduction de son expression en utilisant un siARN a pratiquement le même effet et inhibe la formation de structures endocytaires positives CD63 (Stuffers et al., 2009). Ici, notre étude a démontré une régulation à la baisse de la protéine CD63 et syntenine-1 (cette dernière à un niveau moindre), tandis que les protéines CD81 et Flotilline-2 seraient plutôt régulées à la hausse dans les cellules HEK293T. Ceci peut corrélérer avec la littérature qui stipule que la production de VE pour une voie indépendante de ESCRT n'aurait aucun effet sur l'accumulation de la Flotillin-2 dans le VE.²² En outre, une étude réalisée sur le Knock Out de la protéine Rab27a a pu démontrer que cette déplétion a su entraîner la modification de certains marqueurs comme le CD63, le Tsg101, l'Alix, HSP70, et du même coup, diminue la sécrétion d'exosomes d'environ 70%. Cependant, l'absence de ce gène est sans effet sur d'autres marqueurs de petites vésicules extracellulaires (pVE) tels que CD9, Mfge8.³⁹ Par ailleurs, cela suggère le rôle important de certains constituants de la machinerie ESCRT dont le TSG101 dans la composition protéique des VE secrétées, tout comme la protéine Alix qui a la propriété de modifier la cargaison protéique des VE.¹⁰⁵

3.1.5 L'absence du gène TSG101 dans les cellules modifie l'enrichissement du micro-ARN 451 dans les exosomes tandis qu'il n'aurait presque pas d'effet sur leur enrichissement en miR-16 et U6

Il était important pour nous de porter notre curiosité sur l'impact que pourrait avoir le silençage du gène TSG101 sur la composition des VE en micro-ARN vus les effets déjà observés de son absence sur la production, la taille et l'abondance des marqueurs protéiques des VE. Connaissant l'abondance du miR-451 dans les exosomes,¹¹¹ nous y avons jeté notre dévolu tout en considérant les micro-ARN U6 et miR-16 comme gènes de référence habituellement utilisés.¹⁵⁹ Ces expériences nous ont révélé une baisse considérable du miR-451 dans les VE de cellules KO, tandis que cette modification génique n'aurait presque pas d'effet sur les autres micro-ARN utilisés dans l'étude. Ceci n'est pas forcément élucidé dans la littérature, mais nous pouvons suggérer que de même que la déplétion du TSG101 n'affecte pas la cargaison de tous les marqueurs protéiques, comme observé précédemment (Figure 5), il n'aurait pas d'impact sur la cargaison de certains micro-ARN non plus.

Par ailleurs, le miR-451 est le seul micro-ARN qui a été rapporté comme utilisant une voie autre que Dicer (gène codant pour la ribonucléase clef du mécanisme d'interférence ARN) pour parvenir à sa maturité.^{173,174} Cette voie particulière est probablement liée à l'abondance de sa sécrétion, beaucoup plus que les autres micro-ARN, dans les exosomes¹²¹ et est peut-être, par nos suggestions, affectée par l'absence du TSG101 contrairement à la voie Dicer.

3.1.6 Production et validation de cellules avec inhibition de la sphingomyélinase neutre 2 (nSMase2) par l'utilisation du siARN SMPD3

Un fait intéressant est que même l'absence complète et simultanée des protéines faisant partie des 4 sous-unités du complexe ESCRT n'abolit pas totalement la production de MVB.¹⁰⁵ Il

a aussi été relaté que les composants de la voie endocytaire restaient intacts et clairement différenciés après inhibition de la machinerie ESCRT.³⁸ Tout ceci a suscité l'intérêt pour des études sur d'autres voies possibles de formation des VIL et par conséquent, des exosomes. Et l'une des voies qui a été retrouvée est celle liée au céramide sphingolipidique.³⁸

L'aboutissement à cette voie nécessite l'action de l'enzyme sphingomyélinase neutre II, fortement impliquée dans la signalisation cellulaire, qui va hydrolyser la sphingomyéline en céramide. Par conséquent, le fait d'inhiber l'action de cette enzyme aurait annulé l'hydrolyse de la sphingomyéline d'où l'absence du céramide. Ce phénomène d'inhibition peut être provoqué soit en réduisant au silence l'expression de la sphingomyélinase neutre par un siARN, soit en inhibant son activité avec le médicament GW4869.⁷ Ici, nous avons utilisé deux séquences de siARN en vue de parvenir à l'abolition de la voie liée au céramide dans les cellules HEK293T, la suite des expériences qui ont été réalisées nous ont permis d'observer l'impact que peut avoir cette inhibition sur le nombre, la taille ainsi que la cargaison des VE dont certains marqueurs protéiques et des micro-ARN.

3.1.7 L'inhibition de la nSMase2 par le siARN SMPD3 dans les cellules affecte négativement la production des exosomes

Les différentes voies de biogenèse des exosomes élucidées à travers la littérature, sont indépendantes l'une de l'autre et affectent, chacune de leur côté, la formation de MVB. Comme déjà révélée par d'autres études, la sécrétion d'exosomes est réduite après l'inhibition de la sphingomyélinase neutre dans les cellules.^{7,105} Cependant, cette observation n'est pas vraie pour tous les types de cellules produisant des exosomes. Une étude réalisée par Van Niel et al. en 2011 a démontré que l'inhibition de la sphingomyélinase II n'a aucun effet sur la formation des MVB dans les cellules de mélanome,¹³ alors que cette réduction était observée pour les cellules HeLa.³⁸

Nos expériences avec le siARN SMPD3 ciblant la sphingomyélinase II ont également démontré une diminution du nombre de VE à être secrétées par les cellules HEK293T. Cependant, on a noté une augmentation dans la taille de la majeure partie de ces VE, ce qui nous laisse suggérer que l'absence du céramide dans les cellules aurait un effet négatif sur la morphologie régulière des VIL et n'intervient pas uniquement dans la production des VE en termes de quantité.

3.1.8 L'inhibition de la nSMase2 diminue l'expression de certains marqueurs

Les lipides, en particulier le céramide, jouent un rôle majeur non seulement dans la formation des MVB (pour une voie indépendante de ESCRT), mais interviennent également dans la sécrétion ainsi que dans propriétés fonctionnelles des exosomes.³⁶ Ces dernières impliquent l'influence que peut avoir le céramide sur la cargaison exosomale, dont la nature et la proportion des marqueurs protéiques des exosomes. En nous basant sur ces déclarations, nous arrivons à comprendre les observations que nous avons eu avec nos expériences qui démontrent une diminution des protéines tétraspaniques CD63 et CD81, ainsi que les marqueurs Flotillin-2 et TSG101, alors que la protéine syntenin-1 n'est que faiblement diminuée. Ce qui nous intrigue dans ces résultats c'est le fait que le TSG101, faisant partie de la voie dépendante du complexe ESCRT et qui n'a pas été modifié dans cette expérimentation, est également régulé à la baisse. Cela nous permet de suggérer une possible réaction croisée entre ces 2 voies de biogenèse des MVB dans les cellules et que la production du céramide pourrait dépendre du TSG101 et vice versa.

3.1.9 L'inhibition de la nSMase2 par le siARN SMPD3 diminue l'abondance du miR-451, sans effet considérable sur celle des micro-ARN U6 et 16.

Le céramide et les micro-ARN peuvent s'influencer mutuellement selon ces études que nous allons énoncer ci-après. A travers ces recherches menées sur l'anémie et l'érythropoïèse, on a pu découvrir que le céramide joue un rôle dans la différenciation de certains micro-ARN tels que

miR-144, miR-451, miR-44a, miR-223 et miR-155, en modulant la voie FT-miR (Facteurs de transcription - micro-ARN).¹⁶⁹ D'un autre côté, la régulation à la hausse du miR-34a entraîne une accumulation de céramide dans les cellules musculaires en inhibant le céramide kinase, provoquant ainsi le vieillissement musculaire par une résistance à l'insuline.¹⁷⁰

Dans notre étude comme dans ces dernières, tous les micro-ARN ne sont pas étudiés. Ceci nous empêche de faire une évaluation plus comparative des ARN dont l'abondance peut être altérée ou non par l'inhibition de l'hydrolyse du céramide. Par ailleurs, le même schéma observé avec la déplétion du TSG101 (diminution de l'abondance du miR-451 et la non-modification de celle de miR-16 et U6) et ici nous fait penser que ces deux voies (TSG101 et céramide) se coïncident et produisent à peu près les mêmes effets sur les marqueurs protéiques, la production, la morphologie et la cargaison en micro-ARN des VE.

3.2 Ingénierie de la distribution des VE du sang vers le cerveau

Il a été rapporté que, face aux défis que confrontent les chercheurs dans l'utilisation des nano transporteurs synthétiques comme véhicules de molécules à charges thérapeutiques notamment la traversée de la BHE, les VE peuvent parvenir au cerveau et délivrer leurs cargos (siARN et autres). Néanmoins, différentes modifications biochimiques sont souvent nécessaires dans le but, non seulement de potentialiser la livraison efficace (surtout de cargaisons exogènes), mais aussi de minimiser la livraison non spécifique de ces nano vésicules de transport naturel.^{156,157}

3.2.1 Injection de VE aux souris

Notre étude avait également pour but de découvrir s'il existe une différence dans la bio distribution des VE dans l'organisme selon les organes et les types de cellules d'origine.

La procédure mis en place pour cette expérimentation est illustrée dans la figure suivante et le protocole est détaillé plus haut (dans la section méthodologie). En effet, une concentration de

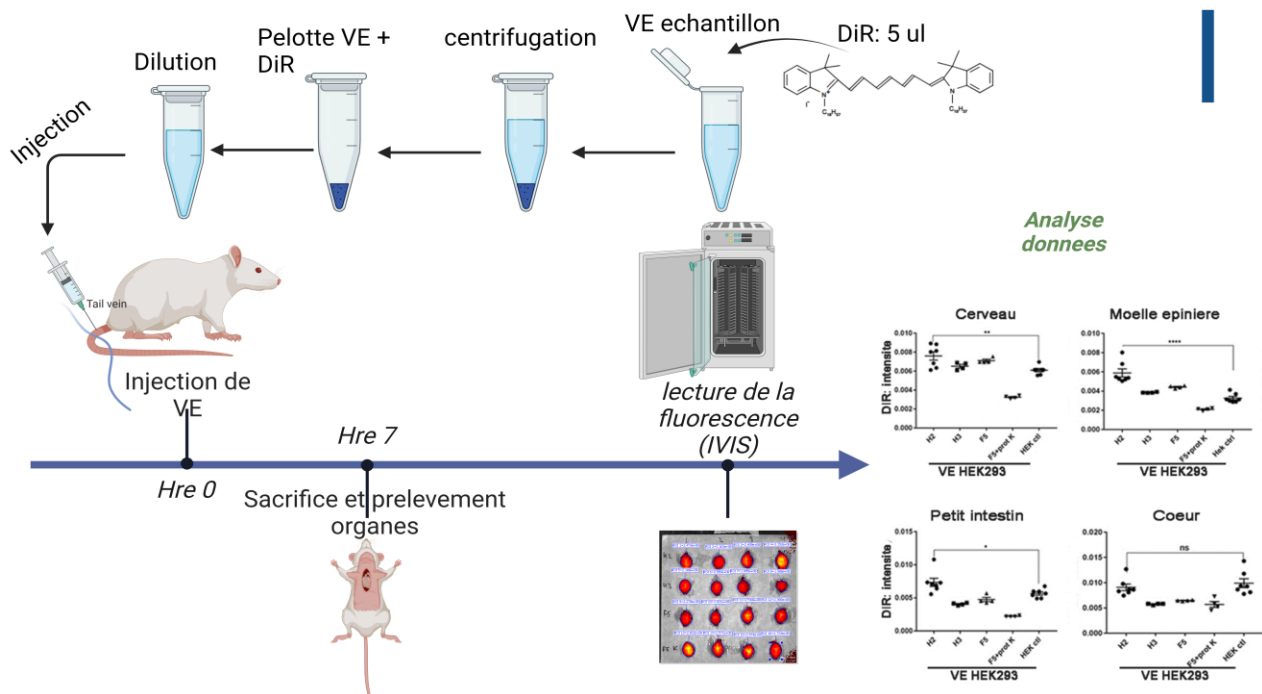


Figure 13: Injection de VE aux souris. L'une des veines de la queue des souris a été utilisée pour l'injection de 1ml (1×10^{13}) d'exosomes marqués au DiR (5 μ l). Les échantillons ont été centrifugés pour enlever l'excès de DiR avant l'injection. L'euthanasie a eu lieu 7 heures après cette injection en procédant par l'administration intra péritonéale du pentobarbital sodique a raison de 10mg/kg, suivie de la dislocation cervicale. Les organes ont été ensuite prélevés pour l'analyse de la fluorescence dans le IVIS. Le logiciel graph Pad prism9 a été utilisée pour l'analyse des données.

1×10^{13} exosomes/ml a été marquée au DiR puis injectée aux souris à raison de 200 μ l/souris et 4 souris pour chaque condition. Elles ont été ensuite sacrifiées 7 heures après l'injection, les organes prélevés et l'intensité de la fluorescence a été quantifier à l'aide de la machine IVIS.

3.2.1.1 Injection de VE de cellules U118 de type sauvage, une absorption diminuée au niveau du cerveau

Cette première expérience a été réalisée avec les exosomes purifiés par FFT à partir de cellules U118 de type sauvage. Un échantillon de 5 μ l de DiR ajoutés dans 1 ml de 1xPBS a été également injecté aux souris, après incubation, centrifugation et la re suspension de la pelotte, comme contrôle négatif. Cette expérience démontre une absorption moindre des exosomes par le

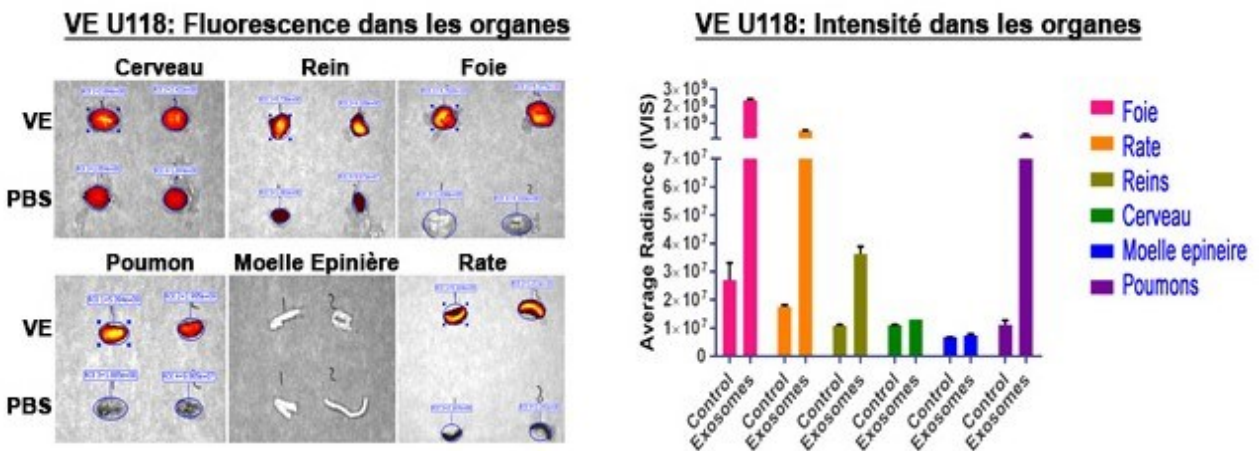


Figure 14 : Des VE purifiées de cellules U118 WT ont été injectés aux souris, une absorption diminuée au niveau du cerveau. A) Cette figure montre la fluorescence des différents organes (cerveau, reins, foie, poumons, moelle épinière, rate) qui ont été prélevés des souris 7 heures après injection des exosomes marqués et du PBS comme

contrôle. **B)** Quatre (4) souris ont été injectées pour chaque condition. Les données chiffrées des intensités détectés dans les organes à partir de la machine IVIS ont été traitées et analysées sur graph Pad prism9.

cerveau et la moelle épinière comparativement aux autres organes. Aussi, n'y a-t-il presque aucune différence entre l'absorption des exosomes et celle du PBS dans le cerveau et la moelle épinière tandis que cette différence est très importante dans les autres organes. La procédure susmentionnée (figure 13) a été appliquée.

3.2.1.2 Injection de VE de cellules H2, une meilleure absorption au niveau du cerveau

L'expérience a été répétée avec les exosomes des cellules H2, H3 et F5 qui sont des cellules ayant été traités avec des anticorps pour une affinité contre les récepteurs à l'insuline (H2, H3) et à la transferrine (F5) des cellules endothéliales des capillaires cérébraux. Ce mécanisme permettrait aux VE purifiées de ces cellules de traverser la BHE par RMT et de délivrer leurs cargaisons du côté luminal des cellules endothéliales ayant contact avec le tissu cérébral.^{96,156}

En effet, des cellules HEK293 WT ont été flanquées par ces séquences H2, H3, F5, respectivement, liée à l'extrémité N-terminale de la protéine PTGFRN en vue de l'optimisation de l'expression ainsi qu'une liaison avec la protéine Flag liée à l'extrémité C-terminale qui servira à la vérification de la réussite de l'expérience par Western Blot. La confection de ces cellules a été réalisée en appliquant le protocole décrit plus haut dans le chapitre traitant de la méthodologie.

Ces résultats démontrent une absorption significative des VE H2 au niveau du cerveau et la moelle épinière, à comparer aux exosomes des cellules Wild type. Cette absorption est également plus importante pour les exosomes H2 que pour ceux de H3 et F5, D'autres organes comme les reins, les poumons et les petits intestins absorbent également ces exosomes avec une significativité, ce qui n'est pas le cas pour le foie, le cœur et la rate. Par ailleurs, cette expérience

a révélé que les échantillons d'exosomes qui ont été traités avec la protéinase K (une enzyme qui catalyse les protéines de surface des exosomes) ont une absorption diminuée dans presque tous les organes, comparativement aux échantillons d'exosomes non traités du même type.

A la microscopie, la fluorescence des exosomes H2 a été également remarquée dans le tissu cérébral (identifiée à l'aide de l'anticorps Flag dont la protéine a été antérieurement liée à la séquence H2 dans les cellules), à comparer aux cerveaux de souris injectées avec des exosomes de cellules de type sauvage. Le CD3, qui représente l'anticorps dirigé contre la molécule d'adhésion et de signalisation des cellules endothéliales (PECAM-1),¹⁶⁰ a été utilisé dans cette expérience dans le but d'identifier les cellules endothéliales des vaisseaux cérébraux au microscope. On a donc eu une signalisation positive de cet anticorps dans les 2 cas de figure de l'expérience (Tissu cérébral avec VE-H2 et tissu cérébral avec VE-WT), et les signalisations CD31 et Flag sont colocalisées à différents points.

Ces résultats sont représentés à partir des figures 15, 16 et 17 qui suivent.

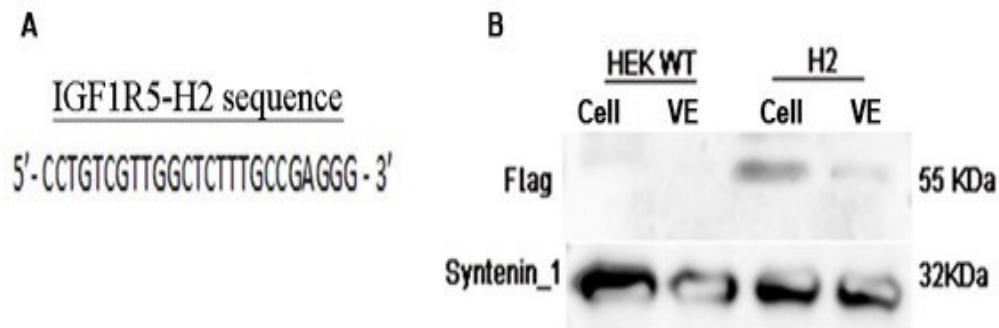


Figure 15 : Vérification de la présence de la protéine Flag dans les cellules et les exosomes. A) Séquence de l'anticorps IGF1R5 flanquée à l'extrémité terminale N de la protéine PTGFRN et la protéine Flag reliée à l'extrémité terminale C. Des cellules HEK293T WT ont été utilisées et le Dr James Taylor a confectionné ces cellules en utilisant la méthode de Gibson. B) Ce western blot a été réalisée avec 15 µg de protéines dans chaque puits, respectivement,

cellule et exosomes HEK293 WT, cellules et exosomes H2. L'anticorps anti syntenine-1 a été mis sur cette même membrane en vue de certifier la présence de protéine dans les puits chargés d'échantillons de cellules et de VE de type sauvage.

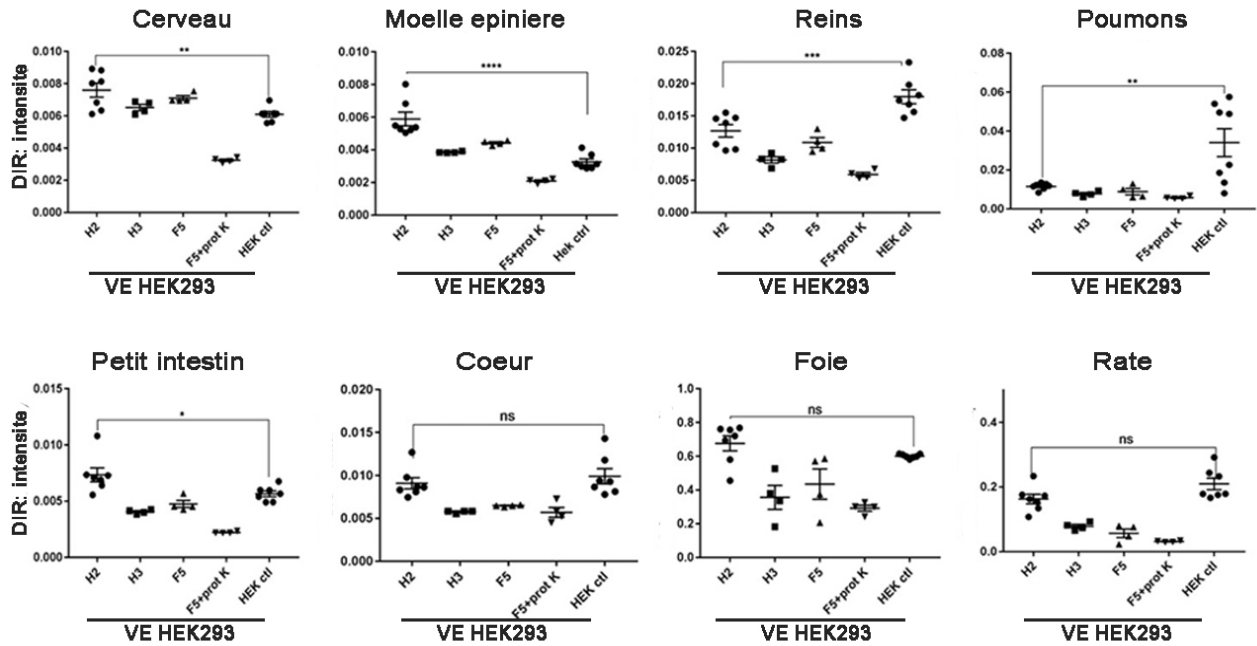


Figure 16 : Une absorption significative de VE purifiées des cellules H2 au niveau du cerveau. La lecture de la fluorescence des exosomes dans les différents organes à l'aide de la machine IVIS a fait ressortir des données qui ont été traitées puis analysées statistiquement sur graph pad prism9. N=2

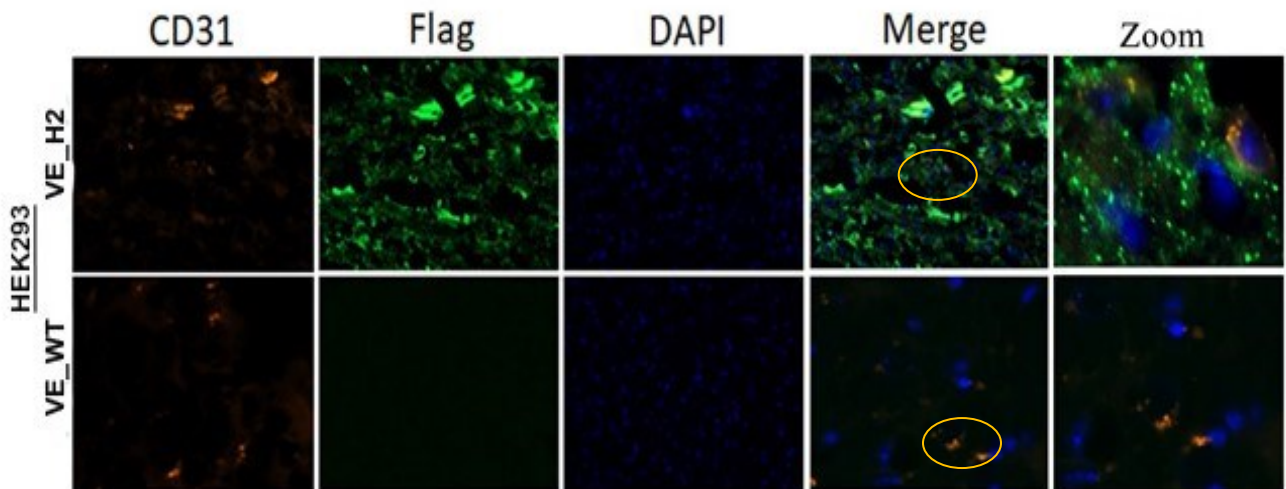


Figure 17 : Microscopie : les exosomes H2 sont vérifiés au niveau du tissu cérébral. A) représente différents clichés qui ont été obtenus à partir du microscope M2. La fluorescence orange représente l'anticorps primaire anti-CD31 pour le marquage des cellules endothéliales (les vaisseaux) et la fluorescence verte correspond à l'anticorps anti-Flag pour le marquage des exosomes H2. Cette fluorescence est alors présente dans le tissu cérébral des souris qui ont été injectées avec des exosomes provenant de cellules H2 tandis qu'elle est absente dans le cerveau des souris injectées avec des exosomes de type sauvage. Par ailleurs, la fluorescence orange est présente dans les deux conditions. Ces images ont été prises par Dr Kallol Dutta à l'aide microscope M2.

Discussion 2

3.2.1 Injection de VE aux souris

La découverte des VE et les nombreuses études sur ces nanoparticules qui se sont suivies ont permis d'apprécier la plupart de leurs caractéristiques et de leurs potentialités fonctionnelles. Elles étaient, de ce fait, convoitées pour être utilisées à des fins thérapeutiques et diagnostiques et les expériences qui se sont ensuite déroulées concernaient leurs purifications, des essais avec des cellules et leurs injections aux souris pour pouvoir mieux apprécier et différencier leurs actions ainsi que leurs propriétés. Ces démarches ont permis de révéler les atouts qu'elles possèdent pour des applications très prometteuses dans le domaine, tels que leurs capacités à être chargées de molécules, à délivrer leurs contenus (protéines, lipides, acide nucléiques), à modifier des cellules cibles et à traverser des barrières biologiques. De plus, les VE offrent une capacité de stockage, une stabilité et une disponibilité, ainsi qu'une tolérance immunitaire et une clairance rapide dans la circulation sanguine donnant la possibilité de procéder à des injections répétées à des organismes animaux et humains.²⁰

Normalement, les exosomes injectés ont tendance à s'accumuler plus facilement dans certains organes comme le foie, la rate, les reins, les poumons, le tractus gastro-intestinal,¹⁶³ et

témoignent donc d'une plus grande difficulté à être délivrés dans des organes protégés par une barrière biologique tel que le cerveau et la moelle épinière.¹⁶⁶ Cet organotropisme peut être influencé par divers facteurs tels que l'état physiopathologique de la cellule qui impacte la nature de la cargaison des exosomes, sans oublier l'origine cellulaire, la composition membranaire, la dose d'injection et la voie d'administration des VE.¹⁶³ Cependant, plusieurs études ont pu prouver que des modifications exosomales - qu'elles soient directes (manipulations chimiques de la surface des exosomes par des liaisons covalentes ou non covalentes) ou indirectes (manipulations géniques de la cellule pour la production d'un type spécifique d'exosomes) - peuvent favoriser l'administration d'exosomes pour une cible spécifiques.²⁰

3.2.1.1 Injection de VE de cellules U118, une absorption diminuée au niveau du cerveau

L'utilisation d'un colorant proche infrarouge (DiR) nous a permis de retracer la signalisation des VE dans les tissus. Ce colorant lipophile a déjà fait ses preuves dans plusieurs études^{162,163} et son efficacité est justifiée par sa bonne pénétrance tissulaire et son faible autofluorescence.¹⁶⁴ Par ailleurs, dans l'objectif de minimiser la fluorescence de DiR libre circulant qui pourrait être détectée et prise pour une fluorescence liée aux VE, nous avons procédé à l'exsanguination avant le prélèvement des organes.

Comme dit plus haut, l'origine cellulaire n'est pas sans effet sur l'affinité de distribution des VE. Des études ont pu le prouver en comparant l'intensité de la fluorescence du colorant dans des organes différents après injection de VE purifiées à partir de divers types de cellules.^{20,163} Il a été également rapporté que des VE provenant de cellules cancéreuses auraient un tropisme pour la tumeur en question en vue d'une livraison thérapeutique ciblée contre ce cancer.^{162,165} Tout comme,

pour une livraison ayant pour cible le cerveau, il serait plus propice d'utiliser des VE de cellules souches neurales, de cellules endothéliales, ou dérivant de cellules tumorales du cerveau.¹⁶⁶

Les VE de cellules du glioblastome humain non modifiées (U-118 de type sauvage) utilisées dans cette étude, montrent une absorption dans les organes, similaire à ce que démontrent d'autres études,¹⁶³ à savoir une accumulation préférentielle dans le foie, la rate, les poumons, les reins et le système nerveux central (pour un ordre décroissant de l'intensité de VE marquées au DiR détectée). Cette faible absorbance observée au niveau du cerveau et la moelle épinière serait peut-être moindre pour d'autres types cellulaires naïfs. Cependant, la similarité de l'absorption du DiR (avec PBS) par rapport aux VE remarquée dans ces 2 organes nous permet de suggérer que les VE des cellules U-118 ne seraient pas les meilleures à être utilisées pour une livraison de molécules thérapeutiques au cerveau.

3.2.1.2 Injection de VE de cellules H2, une meilleure absorption au niveau du cerveau

La bio distribution des VE n'est pas seulement influencée par le type de cellules d'où elles proviennent, mais également par leurs compositions membranaires ou intra-vésiculaires. Celles-ci peuvent être modifiées directement, en agissant sur les exosomes, ou indirectement, en procédant à des modifications de la cellule.²⁰ Toutes ces possibles manipulations n'ont pour but que d'orienter de façon plus précise les cibles à atteindre et de faciliter le passage des VE à travers des membranes des plus protectrices de certains organes comme la BHE. Cette barrière, du fait de sa constitution et sa sélectivité serrée, protège le cerveau des agressions nocives de la circulation sanguine, mais, du même coup, limite les possibilités de traitement de la plupart des affections qui l'atteignent. Cela est dû au fait que des molécules à charges thérapeutiques et même certaines VE ne parviennent pas à répondre à ses critères de sélection.¹⁵⁵

Dans ce contexte, différentes voies de pénétration ont été envisagées et utilisées en se basant sur les procédures biochimiques mises en place par la membrane même (BHE) pour s'approvisionner en molécules nutritives provenant du flot sanguin circulant. L'une de ces voies concerne la transcytose médiée par les récepteurs. En effet, les récepteurs membranaires des cellules endothéliales liés à l'insuline et à la transferrine jouent un rôle de transporteurs pour le passage de molécules nutritives vers le cerveau. Cette voie très intéressante peut permettre aux VE d'atteindre le cerveau si elles possèdent des ligands (anticorps) correspondants pouvant être reconnus par l'une ou l'autre de ces récepteurs.^{96,156}

Dans le cadre de notre étude, des cellules HEK293T ont été flanquées d'anticorps à domaine unique, IGF1R5 (H2), IGF1R4 (H3) et FC5 (F5) pour une reconnaissance par les récepteurs à l'insuline (H2, H3) et à la transferrine (F5) des cellules endothéliales de la BHE. Ce qui a été testée aussi par certaines études.^{167,168} Nos données nous ont révélés qu'effectivement il y a une augmentation de l'absorption des VE dans le cerveau et la moelle épinière comparativement aux VE des cellules HEK293T, tandis que cette situation serait inversée au niveau des poumons et des reins. Par ailleurs, les VE des cellules F5 traitées avec la protéinase K ont démontré une absorption moindre dans tous les organes, par rapport à celles qui n'ont pas été traitées avec la protéinase K. Cela témoigne d'une part, de l'efficacité des anticorps pour une meilleure absorption au parenchyme cérébral, d'autre part, cela nous laisse penser que les protéines de surface des VE auraient un effet positif en ce qui concerne leur absorption dans les tissus y compris le cerveau.

Chapitre 4 : DISCUSSION

Cette étude s'inscrit dans le cadre de la recherche fondamentale qui représente un soutien pour la recherche appliquée mais qui, cependant, est caractérisée par une certaine incertitude concernant ce que l'on va découvrir. Cette incertitude représente, certes, un handicap en ce qui a trait à des programmations futures, puisqu'on se trouve dans l'impossibilité de programmer ce que l'on ignore et on est obligé, de ce fait, de s'appuyer sur ce qui est déjà parvenu à la connaissance pour en découvrir d'autres.¹²⁵ Cependant, la recherche fondamentale, qui se base sur la curiosité et la détermination d'aboutir à de nouvelles découvertes, a toute son importance et représente la base pour des recherches menées sur les maladies existantes tant pour ce qui a trait à leurs diagnostics qu'à leurs traitements. C'est le cas, par exemple de beaucoup de traitements rénovateurs qui existent ces jours-ci mais dont les recherches ont été mobilisées par la simple curiosité des décennies plus tôt, sans avoir en tête que les résultats auraient été servis à de nouvelles découvertes très prometteuses plus tard.¹²⁶ Cela nous permet de mettre en évidence l'importance de la recherche fondamentale même quand la préoccupation d'une étude ne met l'emphase que sur la compréhension d'un phénomène biologique voire même de juste essayer de répondre à une question de recherche qui semble être intéressante.

Les exosomes, découverts pour la première fois par Stahl et al. au cours des années 1980, ont été décrits comme étant des vésicules secrétées par les réticulocytes lors de leur maturation. Ce processus d'exocytose observé au microscope a valu le nom d'« exosomes » donné à ces vésicules et a permis du coup d'émettre l'hypothèse que ces dernières sont des moyens utilisés par la cellule pour se débarrasser soit de ses produits de métabolisme, de ce qu'elle peut avoir en surplus, de ses organites défectueux ou de ses molécules inutiles ou nocives.^{127,128} Au cours de ces

2 dernières décennies, les nombreuses recherches menées sur ces vésicules nanométriques ont permis de découvrir non seulement la complexité de leur biogenèse et de leurs fonctions mais également l'impact fonctionnel qu'elles peuvent avoir sur des cellules, contigües ou distantes, dans lesquelles ils sont internalisés. Cette potentialité d'influencer le comportement des cellules receveuses en y délivrant leurs contenus, constitue la clé du rôle combien important que jouent les exosomes dans la communication intercellulaire et a suscité des idées qui consistent à les convoiter comme véhicules pour des molécules thérapeutiques utiles.¹²⁹ Ce rôle convoité pour les exosomes implique tout aussi bien une affinité hautement spécifique afin de pouvoir délivrer les charges thérapeutiques à des cellules cibles. Cette caractéristique a été également identifiée chez les exosomes et leur a valu leur utilisation dans le diagnostic, le suivi et le pronostic de certaines affections comme les pathologies cardiovasculaires, neurodegeneratives¹³⁰ et le cancer, en se basant sur leurs biomarqueurs spécifiques.^{131,132} Mises à part ces potentialités, les exosomes peuvent être bio-conçus, ils sont d'une grande biocompatibilité avec une excellente capacité de charge utile ainsi qu'une faible immunogenicité.¹³³ Les exosomes sont donc devenus un tournant révolutionnaire et très prometteur dans le domaine de la recherche biomédicale.

Des études sur les VE connaissent une expansion rapide cette dernière décennie et leur hétérogénéité est devenue une évidence, bien qu'il manque encore d'outils spécifiques pouvant permettre de nettement les distinguer en fonction de leurs origines intracellulaires différentes et, éventuellement, de leurs fonctions différentes.^{134,135} Par conséquent, il y a un co-isolément des exosomes avec les autres petites vésicules extracellulaires, des lipoprotéines et des complexes protéiques, lors de l'utilisation des procédures d'isolation actuellement disponibles. Par conséquent, on parvient à des fonctionnalités et des marqueurs protéiques non spécifiques à chaque sous-type de VE et une confusion évidente dans la littérature. Cependant, les exosomes, formés à

partir des MVB et libérés dans le milieu extracellulaire après la fusion de ces derniers avec la membrane plasmique, sont classiquement définis en se basant sur leur taille, ainsi que sur leur cargaison en protéines qui sont identiques à celles des vésicules intraluminales.⁵⁵ Toutefois, le défaut de matériels et de méthodes de purification juste des exosomes à partir du surnageant de cellules, nous a obligé à faire usage des deux concepts, tantôt d'exosomes, tantôt de « vésicules extracellulaires (VE) », de façon plus générale, dans tout le texte.

De l'identification des exosomes, à leur utilisation comme outils de diagnostic et de transport de biomolécules à charges thérapeutiques (encore à l'étude), beaucoup de recherches se sont menées dans le but de mieux cerner la structure, le fonctionnement, les propriétés et toutes les possibilités d'utilisation qu'offrent ces vésicules nanométriques. Ces études ont permis également de les catégoriser en différentes sous populations en fonction de leur taille, leur morphologie, leur origine cellulaire, leur cargaison, leurs marqueurs protéiques, leurs fonctions ainsi que leur bio distribution. Toutefois, il reste encore beaucoup de choses à découvrir sur ces vésicules mystérieuses et des études se poursuivent encore. Dans cet ordre d'idée, notre étude s'est portée sur l'élucidation de certains comportements que des sous types de VE peuvent présenter après avoir modifié certains des gènes qui sont impliqués dans leur biogenèse. De même, des préférences de distribution dans les organes que certaines sous-populations de VE peuvent avoir en fonction de leurs origines cellulaires et/ou des modifications moléculaires que l'on peut apporter dans des cellules productrices, sont présentées.

D'une part, nos expérimentations nous ont révélé que la taille, le nombre, le contenu ainsi que l'expression de certains marqueurs protéiques dits spécifiques des VE est différente quand on procède à la modification de certains gènes comme le TGS101 qui est impliqué dans le processus de biogenèse des exosomes comme faisant partie du complexe ESCRT. La déplétion provoquée de

ce gène en faisant usage de la méthode CRISPR régule à la baisse la production de VE de manière significative, tandis que la taille de ces vésicules a augmenté. De même, l'expression des marqueurs protéiques CD63 et Syntenine-1 a été diminuée, tandis qu'elle serait sans effet sur CD81 (protéine tétraspanique au même titre que le CD63) et la Flotilline-2. Des micro-ARN réputés pour être abondant dans les VE, dont le miR-451 a drastiquement diminué alors que d'autres (U6 et miR-16) sont restés intacts.

En nous référant à la littérature, le TSG101 a aussi pour fonction de trier les protéines vacuolaires (VPS) qui feront partie de la membrane endosomale et cela détermine le destin des MVB vers les lysosomes ou non.¹⁸¹ Le TSG101 fait partie des gènes dont le silence modifie, de façon positive ou négative, la production et l'excrétion des VE.^{4,105} La déplétion du TSG101 de son côté régule plutôt à la baisse cette secretion¹⁴⁹ et entraîne des modifications morphologiques de certains constituants des MVB entraînant ainsi une production de VIL élargies d'où la sécrétion d'exosomes de plus grande taille.³⁸ En outre, les chercheurs Stuffers et al. ont eu également à faire cette remarque en ce qui concerne la diminution de l'expression du CD63 dans les VE dont l'action du TSG101 a été inhibée par l'utilisation d'un siARN.³⁸ Par ailleurs, la Flotilline-2 - protéine ubiquitaire et stable qui est impliquée dans les processus d'adhésion et de trafic cellulaires ainsi que dans l'endocytose des cargaisons membranaires, le trafic endosomal, le tri et le recyclage de molécules spécifiques pour la cargaison des endosomes¹⁷² - n'a subi aucune modification en termes d'expression dans les VE des cellules TSG101 Knock Out.²² En ce qui concerne les micro-ARN, il n'est pas encore révélé de rapport direct entre le TSG101 et ces petits ARN non codants. Néanmoins, il a été rapporté que le complexe ESCRT joue un rôle majeur dans le chargement des micro-ARN dans les VE¹⁷¹ et que ce mécanisme de chargement, quoique non bien élucidée, est sélectif selon Guduric-Fuchs et ses collègues.¹⁷³ Par ailleurs, le miR-451 qui s'est avéré être le

micro-ARN avec le niveau d'expression le plus élevé dans les VE, est non canonique (indépendante de Dicer) et nécessite, à l'opposé des autres micro-ARN, la protéine Ago2 pour sa maturation. De ce fait, la suppression de cette protéine réduit l'expression du miR-451 dans les VE.^{173,174} Ceci nous amène à suggérer que le TSG101 joue donc un rôle, probablement de façon indirecte sur Ago2, et impacte l'enrichissement des miR-451 dans les VE. A l'opposé, le KO du TSG101 n'affecterait pas la voie Dicer.

En tenant compte de ces résultats, nous pouvons aussi avancer que, non seulement, toutes les protéines, même celles faisant partie d'une seule catégorie comme les tétraspanines, ne sont pas affectées de manière similaire, lors de la modification d'un gène. Ce qui suggère que des molécules protéiques catégorisées ne sont peut-être pas de la même origine intracellulaire ou ne sont pas mobilisées dans les VE par un même processus. Mais également, l'absence d'un seul des complexes de la machinerie ESCRT (TSG101-complexe ESCRT-I) parvient à influencer la production des VE en termes de nombre, de taille et de cargaison nucléiques (micro-ARN) et protéiques, bien que le silence de tout le complexe ESCRT (ou presque) n'aurait pas complètement altérer la biogenèse d'exosomes.¹⁰⁵

En outre, pour une voie indépendante de la machinerie ESCRT, la voie céramide a été découverte et la suppression de l'expression de ce sphingolipide altère également la libération de VE par certains types de cellules.^{7,13,38} Le céramide intervient non seulement dans la sécrétion d'exosomes mais interfère également dans les caractéristiques fonctionnelles de ceux-ci, ce qui implique leurs constituants protéiques et/ou nucléiques.³⁶ Il a été également rapporté que le céramide joue tout aussi bien un rôle dans la différenciation de certains micro-ARN en utilisant la voie FT-miR, alors que d'autres micro-ARN tel que le miR-34a influencerait plutôt l'accumulation du céramide dans les cellules.¹⁷⁰ Ainsi, nos expérimentations nous ont démontré que contrairement

aux effets de la déplétion du TSG101, l'inhibition de l'enzyme SMase2 permettant d'aboutir à l'absence du céramide dans les cellules HEK293T affecte négativement l'expression des 2 protéines tétraspaniques utilisées dans cette étude dont CD63 et CD81 ainsi que la Flotilline-2. Ces 2 dernières n'ont pas été modifiées par la déplétion du TSG101. Cependant, l'expression de la protéine TSG101 a été diminuée alors que celle-ci fait partie de la voie ESCRT. Aussi, le miR-451 a-t-il été régulé à la baisse et les micro-ARN U6 et miR-16 non modifiés, comme c'était le cas pour le silençage du TSG101. Ces résultats presque similaires obtenus à partir de la modification de 2 molécules révélées comme impliquées de façon séparée dans les 2 voies de biogenèse des exosomes, nous font suggérer qu'en fait ces 2 voies pourraient se comporter de la même façon en ce qui a trait à la production et le chargement de la cargaison exosomale et que l'une parvient juste à suppléer l'autre. En d'autres termes, l'absence de l'une incite le relai de l'autre, mais qu'elles agiraient sur les mêmes voies pour un même type de VE. Cependant, la diminution de l'expression du TSG101 dans les VE avec céramide non exprimé nous fait penser à la possibilité que ces 2 voies interfèrent également entre elles. En fait, la biologie fonctionnelle de la voie indépendante de ESCRT pourrait être, de préférence, complémentaire à la biogenèse dépendante de cette machinerie. Reste à savoir comment serait l'expression du SMase 2 dans les VE dans lesquelles le TSG101 n'est pas exprimée.

D'autre part, les exosomes s'accumulent dans des organes non ciblés également après injection, de ce fait, l'analyse de la bio distribution est essentielle pour une thérapie à base de VE. Il a été prouvé que la distribution *in vivo* des VE est influencée, entre autres, par la source cellulaire de ces vésicules ainsi que par la nature de leurs cargaisons, intraluminales ou membranaires, qui peuvent être influencées par des modifications géniques, chimiques ou enzymatiques apportées au niveau cellulaire ou directement sur les exosomes.^{20,163} Ces manipulations de différentes sortes

pouvant être effectuées sur les cellules et/ou les exosomes ont pour but de faciliter l'atteinte spécifique d'une cible à partir d'injection de VE. Cette approche est surtout très intéressante quand on tient compte de la difficulté que présente certaines barrières biologiques à être traverser même par ces bio-vésicules, comme le cerveau.¹⁵⁵ Comme c'était déjà fait dans d'autres travaux de recherches,^{156,167,168} la voie d'endocytose médiée par les récepteurs (notamment les récepteurs liés à l'insuline et à la transferrine) endothéliaux des capillaires formant la BHE a été utilisée. Cette approche a été justifiée en considérant le coefficient de perméabilité x surface (PS) de différents récepteurs de la BHE tels que : Insuline, Transferrine, IgG, Albumine et Facteur de croissance nerveuse, dans une étude réalisée par Poduslo et al. Leurs expériences ont démontré que les valeurs PS pour IgG et albumine étaient faibles dans différentes régions du cerveau alors que celles pour la transferrine et l'insuline y étaient très élevées particulièrement au niveau du tronc cérébral. En se basant sur ces valeurs PS fiables, ils ont alors conclu que ces récepteurs, en particulier l'insuline, peuvent servir de cibles spécifiques pour l'administration de médicament au niveau du SNC.¹⁸⁰

A la suite de ces avancées, d'autres études se sont menées en apportant certaines modifications aux cellules qui vont parvenir à sécréter des VE ayant des anticorps membranaires dirigés contre les récepteurs endothéliaux liés à l'insuline et à la transferrine, afin de pouvoir comparer l'absorption de ces VE par le tissu cérébral par rapport à celle des VE naïves.^{156,157,168} Dans notre étude, les résultats obtenus révélant, dans un premier temps, une nette réduction de l'absorption des VE des cellules U118 de type sauvage dans le tissu cérébral comparativement aux autres organes, et, dans un second temps, une augmentation de cette absorption dans le cerveau avec l'utilisation des VE purifiées des cellules qui ont été flanquées de l'IGF1R5 (H2) en particulier, nous amène à nous pencher sur la conclusion que l'utilisation de la voie médiée par les récepteurs pour une absorption significative de VE par le parenchyme cérébral est efficace.

Considérant les limites auxquelles fait face la médecine pour le traitement de nombreuses maladies affectant le cerveau notamment les pathologies neurodégénératives, cette voie non invasive pourrait être un moyen efficace permettant de faire face à ce défi.

4.1 Limitations et directions futures

Limitations et moyens possibles de les adresser

D'autres marqueurs protéiques, comme le CD9, faisant partie des 3 protéines tétraspaniques les plus couramment utilisés, à côté de CD63 et CD81, pourraient être utilisés pour une meilleure comparaison de cette classe de protéines.

Une autre limite que présente cette étude concerne la non-évaluation du SMPD3 dans les VE TSG101 Knock out. Il serait aussi bien de savoir comment s'exprime le céramide dans les VE TSG101 Knock Out.

Le protéome des VE permettrait de déterminer de manière plus globale l'expression protéique de ces VE modifiées.

Directions futures

Cette étude nous a suscité des questionnements qu'il est possible d'élucider plus loin. Il pourra s'agir de porter la curiosité sur les potentielles orientations suivantes :

- Étant donné qu'il est décrit dans la littérature que l'éradication de tous les complexes de la machinerie ESCRT dans les cellules ne tarit pas la sécrétion de VE, il serait intéressant d'amener au silence toutes les voies possibles de biogenèse de VE actuellement connues (voies dépendantes et voies indépendantes de ESCRT) en un seul temps, et de voir s'il y aurait ou non la présence de VE dans le surnageant

de ces cellules. Les résultats qui suivraient pourraient susciter de nouveaux questionnements sur les exosomes.

- On a vu à travers une étude que le complexe ESCRT joue un rôle dans la modification de certains composants de la cargaison exosomale et que son inhibition entrainerait la sécrétion de VIL élargies. Il reste donc à savoir comment le TSG101 est impliqué dans la modification morphologique des VE excrétées. Ce qui peut être regardé aussi pour le céramide étant donné que cette même remarque a été faite dans notre étude.
- Il serait également judicieux de chercher à savoir comment les deux voies de biogenèse interfèrent entre elles. Cela pourrait fournir des informations supplémentaires sur le processus de formation de ces nano vésicules.
- Un autre point très intéressant serait de savoir si ces VE modifiées seraient capables d'être chargées de micro-ARN ou de siARN et de les délivrer efficacement à des cellules cibles. Cette connaissance pourra être utile pour plusieurs raisons. D'abord, la livraison d'ARN par les exosomes est un de leurs potentiels les plus étudiés, de ce fait, ces trouvailles pourront être très utiles dans ce domaine. Deuxièmement, plusieurs laboratoires de recherche et compagnies (comme Codiak, Evox, ReNeuron) essaient de développer des traitements pour les patients en utilisant des exosomes pour délivrer des composantes thérapeutiques comme les ARN. Donc trouver un sous-type d'exosomes qui a cette capacité aidera ces efforts, en permettant, par exemple, la purification d'exosomes efficaces.

Chapitre 5 : CONCLUSION

L'un des plus grands défis de la recherche biomédicale depuis toujours consiste en la complexité de la cellule et de ses composantes. On ne parvient toujours pas à tout cerner, à tout expliquer ni à toujours tirer des conclusions définitives. De ce fait, les révélations des uns suscitent des questions et la curiosité des autres, et on parvient toujours à découvrir quelque chose de nouveau que ce soit du point de vue physiologique de la cellule ou pathologique. Ainsi, des molécules ou organites qui s'étaient révélés d'avoir de simple fonction autrefois, s'avèrent être plus complexes et jouent des rôles de plus grande envergure avec des recherches subséquentes. Les pathologies de leur part sont multifactorielles. Ce qui, d'une part, complique parfois la compréhension de leurs physiopathologies et une manière sûre de les traiter, cependant d'autre part, cette caractéristique multifactorielle de certaines pathologies peut offrir plusieurs voies possibles d'approches thérapeutiques.

La découverte des VE permet, au fil des temps, de pallier une large portion de la complexité de diverses pathologies existantes et constitue, on dirait, un point culminant pour le domaine de la recherche biomédicale. Du fait de leurs propriétés permettant de faire des diagnostics, de suivre l'évolution de diverses maladies et d'établir un pronostic, ainsi que de délivrer des charges moléculaires thérapeutiques, les VE suscitent de plus en plus d'intérêt de recherches et la curiosité à trouver beaucoup plus de moyens pour leurs possibles implications dans les approches théranostiques. Ces dernières exigent donc des connaissances plus approfondies sur des sous-populations de VE en ce qui a trait à leurs comportements différents, leurs cargaisons diversifiées et leur affinité de distribution différentes en fonction de l'état physiopathologique et/ou des modifications possibles. Ce sont des aspects des VE - allant du rôle d'exporteur de déchets, passant

par la communication intercellulaire qu'elles assurent, à leurs implications dans la propagation de maladies ainsi que dans le diagnostic, le suivi et le traitement - que nous avons vus être élucidés au fur et à mesure, bien qu'il en reste encore beaucoup à découvrir.

Cette thèse démontre avec succès que des sous-populations de VE, avec des modifications quantitatives et qualitatives, peuvent être secrétées par un même type de cellules et que le TSG101 et le céramide jouent un rôle prépondérant dans la production de VE suffisantes et de morphologie normale. Nos conclusions soutiennent aussi l'idée que les voies de biogenèse des exosomes (dépendantes et indépendantes de ESCRT) ne sont pas tout à fait indépendantes et que l'une peut affecter l'expression de l'autre comme on a pu le démontrer avec la diminution de l'expression du TSG101 dans les VE des cellules à céramide non exprimé. Ces travaux de recherche ont pu aussi démontrer que des VE modifiées avec des anticorps pour atteindre une cible spécifique comme le cerveau y parviennent de manière significative grâce aux récepteurs liés à l'insuline présents dans l'endothélium des capillaires formant la BHE.

REFERENCES

1. Geoffrey M. Cooper, *La cellule : une approche moléculaire*, De Boeck Université, 1999, p. 347-383
2. Doyle LM, Wang MZ. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. PMC 2015
doi: [10.3390/cells8070727](https://doi.org/10.3390/cells8070727)
3. McAndrews KM, Kalluri R. Mechanisms associated with biogenesis of exosomes in cancer. *Mol Cancer*. 2019 Mar 30;18(1):52. doi: 10.1186/s12943-019-0963-9. PMID: 30925917; PMCID: PMC6441149.\
4. Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(2):193-208. doi:10.1007/s00018-017-2595-9
5. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014;30:255-289. doi:10.1146/annurev-cellbio-101512-122326
6. Llorente A, Skotland T, Sylvänne T, et al. Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1831(7):1302-1309. doi:10.1016/j.bbaliip.2013.04.011
7. Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*. 2008;319(5867):1244-1247. doi:10.1126/science.1153124
8. Wubbolts R, Leckie RS, Veenhuizen PT, et al. Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J Biol Chem*. 2003;278(13):10963-10972. doi:10.1074/jbc.M207550200
9. De Jong, OG, Verhaar, MC, Chen, Y., Vader, P., Gremmels, H., Posthuma, G., ... & Van Balkom, BW (2012). Les conditions de stress cellulaire se reflètent dans la teneur en protéines et en ARN des exosomes dérivés des cellules endothéliales. *Journal des vésicules extracellulaires* , 1 (1), 18396.
10. Hanson, PI, & Cashikar, A. (2012). Morphogénèse des corps multivésiculaires. *Revue annuelle de biologie cellulaire et du développement* , 28 , 337-362.
11. Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Sciencesmag*. 2020; Vol. 367 num 6478 doi:10.1126 / science.aau 6977
12. Ghossoub R, Lembo F, Rubio A, et al. Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2. *Nat Commun*. 2014;5:3477. Published 2014 Mar 18. doi:10.1038/ncomms4477
13. van Niel G, Charrin S, Simoes S, et al. The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Dev Cell*. 2011;21(4):708-721. doi:10.1016/j.devcel.2011.08.019

14. Wolfers J, Lozier A, Raposo G, et al. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med.* 2001;7(3):297-303. doi:10.1038/85438
15. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 2013;200(4):373-383. doi:10.1083/jcb.201211138
16. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol.* 2006;Chapter 3:. doi:10.1002/0471143030.cb0322s30
17. Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia.*2006;20(9):1487-1495. doi:10.1038/sj.leu.240 4296
18. Raiborg C, Stenmark H. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature.* 2009;458(7237):445-452. doi:10.1038/nature07961
19. Szwedowicz U, Łapińska Z, Gajewska-Naryniecka A, Choromańska A. Exosomes and Other Extracellular Vesicles with High Therapeutic Potential: Their Applications in Oncology, Neurology, and Dermatology. *Molecules.* 2022;27(4):1303. Published 2022 Feb 15. doi:10.3390/molecules27041303
20. Choi H, Choi Y, Yim HY, Mirzaaghasi A, Yoo JK, Choi C. Biodistribution of Exosomes and Engineering Strategies for Targeted Delivery of Therapeutic Exosomes. *Tissue Eng Regen Med.* 2021;18(4):499-511. doi:10.1007/s13770-021-00361-0
21. de Gassart A, Geminard C, Fevrier B, Raposo G, Vidal M. Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood.* 2003;102(13):4336-4344. doi:10.1182/blood-2003-03-0871
22. Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, et al. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol.* 2012;14(7):677-685. Published 2012 Jun 3. doi:10.1038/ncb2502 **(a lire)**
23. Hoshino A, Costa-Silva B, Lyden D. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature.* 2015 Nov 19;527(7578):329-35. doi: 10.1038/nature15756. Epub 2015 Oct 28. PMID: 26524530; PMCID: PMC4788391.
24. Rezaie J, Aslan C, Ahmadi M. *et al.* The versatile role of exosomes in human retroviral infections: from immunopathogenesis to clinical application. *Cell Biosci* **11**, 19 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00537-0>
25. Gurunathan S, Kang MH, Kim JH. A comprehensive Review on Factors Influences Biogenesis, Functions, Therapeutic and Clinical Implications of Exosomes. *Int J Nanomedicine.* 2021;16:1281-1312 <https://doi.org/10.2147/IJN.S291956>
26. Miguel S, Melo AS. Non-coding RNAs in Exosomes: New Players in Cancer Biology. *Bentham Science Publishers*, Volume 16, Number 5, 2015, pp. 295-303(9)
27. Saint-Pol J, Gosselet F. Petits mais costauds : Les exosomes neuronaux contrôlent l'intégrité vasculaire cérébrale. *médecine/sciences.* **34.** 303-306 (2018). doi :10.1051/medsci/20183404008.

28. Thery C, Ostrowsky M, Ingrid S. Des vésicules sécrétées *in vivo* permettent d'améliorer la réponse immune anti-tumorale. *Med Science (Paris)*, 24 6-7 (2008) 581-583
<https://doi.org/10.1051/medsci/20082467581>
29. Soung YH, Ford S, Zhang V, Chung J. Exosomes in Cancer Diagnostics. *Cancers*. 2017; 9(1):8. <https://doi.org/10.3390/cancers9010008>
30. Kahlert C, Kalluri R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J Mol Med (Berl)*. 2013;91(4):431-437. doi:10.1007/s00109-013-1020-6
31. Ohshima K, Inoue K, Fujiwara A, et al. Let-7 MicroRNA Family is Selectively Secreted into Extracellular Environment via Exosomes in a Metastatic Gastric Cancer Cell Line. *Plos one* (2010) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013247>
32. Šála M, Hollinger KR, Thomas AG, et al. Novel Human Neutral Sphingomyelinase 2 Inhibitors as Potential Therapeutics for Alzheimer's Disease. *J Med Chem*. 2020;63(11): 6028-6056. doi:10.1021/acs.jmedchem.0c00278
33. Jin L, Jing L, Bo H, Xiao-Zhong W, et al. "Exosomes: Novel Biomarkers for Clinical Diagnosis", *The Scientific World Journal*, vol. 2015, <https://doi.org/10.1155/2015/657086>
34. Alderton G. Exosomes drive premetastatic niche formation. *Nat Rev Cancer* **12**, 447 (2012). <https://doi.org/10.1038/nrc3304>
35. Kalluri R. The biology and function of exosomes in cancer. *J Clin Invest*. 2016;126(4):1208-1215. doi:10.1172/JCI81135
36. Elsherbini A, Bieberich E. Ceramide and Exosomes: A Novel Target in Cancer Biology and Therapy. *Adv Cancer Res*. 2018;140:121-154. doi:10.1016/bs.acr.2018.05.004
37. Pols MS, Klumperman J. Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp Cell Res*. 2009;315(9):1584-1592. doi:10.1016/j.yexcr.2008.09.020
38. Stuffers S, Sem Wegner C, Stenmark H, Brech A. Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic*. 2009 Jul;10(7):925-37. doi: 10.1111/j.1600-0854.2009.00920.x
39. Thery C, Raposo G, Amigorena S, Clayton A. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Current Protocols in cell biology*. First published: 01 April 2006.
<https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0322s30>
40. Parisse P, Rago I, Ulloa Severino L, et al. Atomic force microscopy analysis of extracellular vesicles. *Eur Biophys J*. 2017;46(8):813-820. doi:10.1007/s00249-017-1252-4
41. Van Acker T, Tavernier J, Peelman F. La petite GTPase Arf6 : un aperçu de ses mécanismes d'action et de son rôle dans les interactions hôte-pathogène et l'immunité innée. *Int J Mol Sci* . 2019; 20 (9): 2209. Publié le 5 mai 2019. Doi: 10.3390 / ijms2009220

42. Bast, M. (2011). Formation de vésicules MVB : ESCRT-dépendante, ESCRT-indépendante et tout le reste. *Opinion actuelle en biologie cellulaire* , 23 (4), 452-457.
43. Tamai K, Tanaka N, Nakano T, et al. Exosome secretion of dendritic cells is regulated by Hrs, an ESCRT-0 protein, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 399, Issue 3, 2010, Pages 384-390, ISSN 0006-291X, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.083>
44. Bobrie A, Colombo M, Krumeich S, Raposo G, Théry C. Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation. *J Extracell Vesicles*. 2012 doi:10.3402/jev.v1i0.18397
45. Chevillet R, Qing Kang, Ingrid K. et al. Stœchiométrie des microARN et des exosomes PNAS, octobre 2014, 111 (41) 14888-14893; DOI : 10.1073/pnas.1408301111
46. Abels ER, Breakefield XO. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell Mol Neurobiol* **36**, 301–312 (2016). <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0366-z>
47. Zhang J, Li S, Li M, et al. Exosome and Exosomal MicroRNA: Trafficking, Sorting, and Function, *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, Volume 13, Issue 1, 2015, Pages 17-24, ISSN 1672-0229, <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.02.001>
48. Hyun JY, Xiao C. MicroRNA Mechanisms of Action: What have We Learned from Mice? *Frontiers in Genetics* 6, 328 (2015) doi:10.3389/fgene.2015.00328
49. Fabbiano, F , Corsi, J , Gurrieri, E , Trevisan, C , Notarangelo, M , D'Agostino, VG . Emballage d'ARN dans des vésicules extracellulaires : un orchestre de protéines liant l'ARN ? . *J Vésicules extracellulaires*. 2020; 10: e12043. <https://doi.org/10.1002/jev2.12043>
50. Kamalika M, Bartika G, Souvik G et al. La liaison reversible HuR-microARN contrôle l'exportation extracellulaire de miR-122 et augmente la reponse au stress. *EMBOpress* (2016). <https://www.embopress.org/doi/full/10.15252/embr.201541930>
51. Leidal AM, Debnath J. LC3-dependent extracellular vesicle loading and secretion (LDELS). *Autophagy*. 2020 Jun;16(6):1162-1163. doi: 10.1080/15548627.2020.1756557. Epub 2020 Apr 24. PMID: 32330402; PMCID: PMC7469500.
52. Liao W, Du Y, Zhang C, et al. Exosomes: The next generation of endogenous nanomaterials for advanced drug delivery and therapy. *Acta Biomater*. 2019;86:1-14. doi:10.1016/j.actbio.2018.12.045
53. Zhang H, Freitas D, Kim HS, et al. Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation. *Nat Cell Biol*. 2018;20(3):332-343. doi:10.1038/s41556-018-0040-4
54. Robbins PD, Morelli AE. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(3):195-208. doi:10.1038/nri3622

55. Kowal J, Arras G, Colombo M, et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(8):E968-E977. doi:10.1073/pnas.1521230113
56. Wen SW, Lima LG, Lobb RJ, et al. Breast Cancer-Derived Exosomes Reflect the Cell-of-Origin Phenotype. *Proteomics*. 2019;19(8):e1800180. doi:10.1002/pmic.201800180
57. Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G, Théry C. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat Cell Biol*. 2019;21(1):9-17. doi:10.1038/s41556-018-0250-9
58. Ridder K, Keller S, Dams M, et al. Extracellular vesicle-mediated transfer of genetic information between the hematopoietic system and the brain in response to inflammation [published correction appears in PLoS Biol. 2018 Mar 12;16(3):e1002623]. *PLoS Biol*. 2014;12(6):e1001874. Published 2014 Jun 3. doi:10.1371/journal.pbio.1001874
59. Parolini I, Federici C, Raggi C, et al. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J Biol Chem*. 2009;284(49):34211-34222. doi:10.1074/jbc.M109.041152
60. Sullivan R, Saez F, Girouard J, Frenette G. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells Mol Dis*. 2005;35(1):1-10. doi:10.1016/j.bcmd.2005.03.005
61. Vojtech L, Woo S, Hughes S, et al. Exosomes in human semen carry a distinctive repertoire of small non-coding RNAs with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(11):7290-7304. doi:10.1093/nar/gku347
62. Delorme-Axford E, Donker RB, Mouillet JF, et al. Human placental trophoblasts confer viral resistance to recipient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(29):12048-12053. doi:10.1073/pnas.1304718110
63. Montecalvo A, Larregina AT, Shufesky WJ, et al. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood*. 2012;119(3):756-766. doi:10.1182/blood-2011-02-338004
64. Foster BP, Balassa T, Benen TD, et al. Extracellular vesicles in blood, milk and body fluids of the female and male urogenital tract and with special regard to reproduction. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2016;53(6):379-395. doi:10.1080/10408363.2016.1190682
65. Capello M, Vykoukal JV, Katayama H, et al. Exosomes harbor B cell targets in pancreatic adenocarcinoma and exert decoy function against complement-mediated cytotoxicity. *Nat Commun*. 2019;10(1):254. Published 2019 Jan 16. doi:10.1038/s41467-018-08109-6
66. Asai H, Ikezu S, Tsunoda S, et al. Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nat Neurosci*. 2015;18(11):1584-1593. doi:10.1038/nn.4132
67. Baker S, Polanco JC, Götz J. Extracellular Vesicles Containing P301L Mutant Tau Accelerate Pathological Tau Phosphorylation and Oligomer Formation but Do Not Seed Mature Neurofibrillary Tangles in ALZ17 Mice. *J Alzheimers Dis*. 2016;54(3):1207-1217. doi:10.3233/JAD-160371

68. Falker C, Hartmann A, Guett I, et al. Exosomal cellular prion protein drives fibrillization of amyloid beta and counteracts amyloid beta-mediated neurotoxicity. *J Neurochem.* 2016;137(1):88-100. doi:10.1111/jnc.13514
69. Yuyama K, Sun H, Usuki S, et al. A potential function for neuronal exosomes: sequestering intracerebral amyloid- β peptide. *FEBS Lett.* 2015;589(1):84-88. doi:10.1016/j.febslet.2014.11.027
70. Stuenkel A, Kunadt M, Kruse N, et al. Induction of α -synuclein aggregate formation by CSF exosomes from patients with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Brain.* 2016;139(Pt 2):481-494. doi:10.1093/brain/awv346
71. Basso M, Pozzi S, Tortarolo M, et al. Mutant copper-zinc superoxide dismutase (SOD1) induces protein secretion pathway alterations and exosome release in astrocytes: implications for disease spreading and motor neuron pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem.* 2013;288(22):15699-15711. doi:10.1074/jbc.M112.425066
72. Iguchi Y, Eid L, Parent M, et al. Exosome secretion is a key pathway for clearance of pathological TDP-43. *Brain.* 2016;139(Pt 12):3187-3201. doi:10.1093/brain/aww237
73. Rajagopal C, Harikumar KB. The Origin and Functions of Exosomes in Cancer. *Front Oncol.* 2018;8:66. Published 2018 Mar 20. doi:10.3389/fonc.2018.00066
74. Cai J, Han Y, Ren H, et al. Extracellular vesicle-mediated transfer of donor genomic DNA to recipient cells is a novel mechanism for genetic influence between cells. *J Mol Cell Biol.* 2013;5(4):227-238. doi:10.1093/jmcb/mjt011
75. Thakur BK, Zhang H, Becker A, et al. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res.* 2014;24(6):766-769. doi:10.1038/cr.2014.44
76. Salehi M, Sharifi M. Exosomal miRNAs as novel cancer biomarkers: Challenges and opportunities. *J Cell Physiol.* 2018;233(9):6370-6380. doi:10.1002/jcp.26481
77. Thind A, Wilson C. Exosomal miRNAs as cancer biomarkers and therapeutic targets. *J Extracell Vesicles.* 2016;5:31292. Published 2016 Jul 19. doi:10.3402/jev.v5.31292
78. Chen IH, Xue L, Hsu CC, et al. Phosphoproteins in extracellular vesicles as candidate markers for breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(12):3175-3180. doi:10.1073/pnas.1618088114
79. Castillo J, Bernard V, San Lucas FA, et al. Surfaceome profiling enables isolation of cancer-specific exosomal cargo in liquid biopsies from pancreatic cancer patients. *Ann Oncol.* 2018;29(1):223-229. doi:10.1093/annonc/mdx542
80. Yang KS, Im H, Hong S, et al. Multiparametric plasma EV profiling facilitates diagnosis of pancreatic malignancy. *Sci Transl Med.* 2017;9(391):eaal3226. doi:10.1126/scitranslmed.aal3226
81. Yeo RW, Lai RC, Zhang B, et al. Mesenchymal stem cell: an efficient mass producer of exosomes for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(3):336-341. doi:10.1016/j.addr.2012.07.001

82. Kordelas L, Rebmann V, Ludwig AK, et al. MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease. *Leukemia*. 2014;28(4):970-973. doi:10.1038/leu.2014.41
83. Cheng L, Sharples RA, Scicluna BJ, Hill AF. Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood. *J Extracell Vesicles*. 2014;3:10.3402/jev.v3.23743. Published 2014 Mar 26. doi:10.3402/jev.v3.23743
84. Ohno S, Takanashi M, Sudo K, et al. Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells. *Mol Ther*. 2013;21(1):185-191. doi:10.1038/mt.2012.180
85. Katakowski M, Buller B, Zheng X, et al. Exosomes from marrow stromal cells expressing miR-146b inhibit glioma growth. *Cancer Lett*. 2013;335(1):201-204. doi:10.1016/j.canlet.2013.02.019
86. Perets N, Hertz S, London M, Offen D. Intranasal administration of exosomes derived from mesenchymal stem cells ameliorates autistic-like behaviors of BTBR mice. *Mol Autism*. 2018;9:57. Published 2018 Nov 21. doi:10.1186/s13229-018-0240-6
87. Williams AM, Denny IS, Bhatti UF, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Provide Neuroprotection and Improve Long-Term Neurologic Outcomes in a Swine Model of Traumatic Brain Injury and Hemorrhagic Shock. *J Neurotrauma*. 2019;36(1):54-60. doi:10.1089/neu.2018.5711
88. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009;19(1):92-105. doi:10.1101/gr.082701.108
89. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(12):5003-5008. doi:10.1073/pnas.1019055108
90. Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(16):7223-7233. doi:10.1093/nar/gkr254
91. Tan A, Rajadas J, Seifalian AM. Exosomes as nano-theranostic delivery platforms for gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(3):357-367. doi:10.1016/j.addr.2012.06.014
92. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Likhacheva S, Wood MJ. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol*. 2011;29(4):341-345. doi:10.1038/nbt.1807
93. Yao, Y., Wang, J., Liu, Y. *et al.* Variantes du virus adéno-associé de sérotype 9 avec une meilleure pénétration de la barrière hémato-encéphalique chez les rongeurs et les primates. *Nat. Biomédical. Eng* **6**, 1257–1271 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41551-022-00938-7>
94. Kumar, P., Wu, H., McBride, J. *et al.* Délivrance transvasculaire de petits ARN interférents au système nerveux central. *Nature* **448**, 39-43 (2007). <https://doi.org/10.1038/nature05901>

95. Yuan D, Zhao Y, Banks WA, et al. Macrophage exosomes as natural nanocarriers for protein delivery to inflamed brain. *Biomaterials*. 2017;142:1-12. doi:10.1016/j.biomaterials.2017.07.011
96. Yogi A, Hussack G, van Faassen H, et al. Brain Delivery of IGF1R5, a Single-Domain Antibody Targeting Insulin-like Growth Factor-1 Receptor. *Pharmaceutics*. 2022;14(7):1452. Published 2022 Jul 12. doi:10.3390/pharmaceutics14071452
97. Pardridge WM. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx*. 2005;2(1):3-14. doi:10.1602/neurorx.2.1.3
98. Dignat-George F, Bonifay A, Lacroix R, Les microvésicules cellulaires : biomarqueurs émergents en pathologie cardiovasculaire : intérêt dans le risque thrombotique de la COVID 19, Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine, Volume 205, Issue 2, 2021, Pages 166-179, ISSN 0001-4079, <https://doi.org/10.1016/j.banm.2020.04.016>.
99. Schiller M, Bekeredjian-Ding I, Heyder P, Blank N, Ho AD, Lorenz HM. Autoantigens are translocated into small apoptotic bodies during early stages of apoptosis. *Cell Death Differ*. 2008;15(1):183-191. doi:10.1038/sj.cdd.4402239
100. Gregory CD, Pound JD. Microenvironmental influences of apoptosis in vivo and in vitro. *Apoptosis*. 2010;15(9):1029-1049. doi:10.1007/s10495-010-0485-9
101. Li X, Corbett AL, Taatizadeh E, et al. Challenges and opportunities in exosome research- Perspectives from biology, engineering, and cancer therapy. *APL Bioeng*. 2019;3(1):011503. Published 2019 Mar 27. doi:10.1063/1.5087122
102. Willms E, Johansson H, Mäger I *et al*. Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Sci Rep* 6, 22519 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep22519>
103. Tiruvayipati S, Wolfgeher D, Yue M, et al. Variability in protein cargo detection in technical and biological replicates of exosome-enriched extracellular vesicles. *PLoS One*. 2020;15(3):e0228871. Published 2020 Mar 2. doi:10.1371/journal.pone.0228871
104. Ran FA, Hsu PD, Wright J, et al. Ingénierie du génome à l'aide du système CRISPR-Cas9. *Protocoles naturels*. 2013 novembre;8(11):2281-2308. DOI : 10.1038/nprot.2013.143. PMID : 24157548 ; PMCID : PMC3969860.
105. Colombo M, Moita C, van Niel G, et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J Cell Sci*. 2013;126(Pt 24):5553-5565. doi:10.1242/jcs.128868
106. Jeppesen DK, Fenix AM, Franklin JL, et al. Reassessment of Exosome Composition. *Cell*. 2019;177(2):428-445.e18. doi:10.1016/j.cell.2019.02.029
107. Ciardiello C, Cavallini L, Spinelli C, et al. Focus on Extracellular Vesicles: New Frontiers of Cell-to-Cell Communication in Cancer. *Int J Mol Sci*. 2016;17(2):175. Published 2016 Feb 6. doi:10.3390/ijms17020175

108. Zhao S, Li J, Zhang G, et al. Exosomal miR-451a Functions as a Tumor Suppressor in Hepatocellular Carcinoma by Targeting LPIN1. *Cell Physiol Biochem*. 2019;53(1):19-35. doi:10.33594/000000118
109. Xu Y, Lai Y, Cao L, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells-derived exosomal microRNA-451a represses epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting ADAM10. *RNA Biol*. 2021;18(10):1408-1423. doi:10.1080/15476286.2020.1851540
110. Wei GY, Hu M, Zhao L, Guo WS. MiR-451a suppresses cell proliferation, metastasis and EMT via targeting YWHAZ in hepatocellular carcinoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019;23(12):5158-5167. doi:10.26355/eurrev_201906_18180
111. Reshke R., Taylor JA, Savard A *et al.* Reduction of the therapeutic dose of silencing RNA by packaging it in extracellular vesicles via a pre-microRNA backbone. *Nat Biomed Eng* 4, 52–68 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0502-4>
112. Altuvia Y, Landgraf P, Lithwick G, et al. Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(8):2697-2706. Published 2005 May 12. doi:10.1093/nar/gki567
113. Li Y, Wang J, Dai X, et al. miR-451 regulates FoxO3 nuclear accumulation through Ywhaz in human colorectal cancer. *Am J Transl Res*. 2015;7(12):2775-2785. Published 2015 Dec 15.
114. Liu Q, Hu Y, Zhang M, Yan Y, Yu H, Ge L. microRNA-451 protects neurons against ischemia/reperfusion injury-induced cell death by targeting CELF2. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2018;14:2773-2782. Published 2018 Oct 23. doi:10.2147/NDT.S173632
115. Szatanek R, Baj-Krzyworzeka M, Zimoch J, Lekka M, Siedlar M, Baran J. The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization. *Int J Mol Sci*. 2017;18(6):1153. Published 2017 May 29. doi:10.3390/ijms18061153
116. Peltier HJ, Latham GJ. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA*. 2008;14(5):844-852. doi:10.1261/rna.939908
117. Mortarino, M., Gioia, G., Gelain, M. E., Albonico, F., Roccabianca, P., Ferri, E., & Comazzi, S. (2010). Identification of suitable endogenous controls and differentially expressed microRNAs in canine fresh-frozen and FFPE lymphoma samples. *Leukemia research*, 34(8), 1070-1077.
118. Lou G, Ma N, Xu Y, et al. Differential distribution of U6 (RNU6-1) expression in human carcinoma tissues demonstrates the requirement for caution in the internal control gene selection for microRNA quantification. *Int J Mol Med*. 2015;36(5):1400-1408. doi:10.3892/ijmm.2015.2338
119. Yan, X., Liang, H., Deng, T. *et al.* L'identification de nouvelles cibles de miR-16 et la caractérisation de leurs fonctions biologiques dans les cellules cancéreuses. *Mol Cancer* 12 , 92 (2013). <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-92>

120. Masè, M., Grasso, M., Avogaro, L. *et al.* La sélection de gènes de référence est essentielle pour l'analyse de l'expression des miARN dans le tissu cardiaque humain. Zoom sur la fibrillation auriculaire. *Sci Rep* 7 , 41127 (2017). <https://doi.org/10.1038/srep41127>
121. Bai H, Wu S. miR-451: A Novel Biomarker and Potential Therapeutic Target for Cancer. *Onco Targets Ther.* 2019;12:11069-11082. Published 2019 Dec 16. doi:10.2147/OTT.S230963
122. Saint-Pol, J., Gosselet, F., Duban-Deweere, S., Pottiez, G., & Karamanos, Y. (2020). Cibler et traverser la barrière hémato-encéphalique avec des vésicules extracellulaires. *Cellules* , 9 (4), 851.
123. Leng L, Dong X, Gao X, et al. Exosome-mediated improvement in membrane integrity and muscle function in dystrophic mice. *Mol Ther.* 2021;29(4):1459-1470. doi:10.1016/j.ymthe.2020.12.018
124. Zhao T, Sun F, Liu J, et al. Emerging Role of Mesenchymal Stem Cell-derived Exosomes in Regenerative Medicine. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2019;14(6):482-494. doi:10.2174/1574888X14666190228103230
125. Joliot, P. (2011). Recherche fondamentale et recherche appliquée. *Les conférences du Collège de France.*
126. Spector JM, Harrison RS, Fishman MC. Fundamental science behind today's important medicines. *Sci Transl Med.* 2018;10(438):eaaq1787. doi:10.1126/scitranslmed.aaq1787
127. Pan BT, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone RM. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol.* 1985;101(3):942-948. doi:10.1083/jcb.101.3.942
128. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem.* 1987;262(19):9412-9420.
129. Record M, Subra C, Silvente-Poirot S, Poirot M. Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors. *Biochem Pharmacol.* 2011;81(10):1171-1182. doi:10.1016/j.bcp.2011.02.011
130. Bellingham SA, Guo BB, Coleman BM, Hill AF. Exosomes: vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases?. *Front Physiol.* 2012;3:124. Published 2012 May 3. doi:10.3389/fphys.2012.00124
131. Hood JL, San RS, Wickline SA. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Res.* 2011;71(11):3792-3801. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-4455
132. Iero M, Valenti R, Huber V, et al. Tumour-released exosomes and their implications in cancer immunity. *Cell Death Differ.* 2008;15(1):80-88. doi:10.1038/sj.cdd.4402237
133. Huda MN, Nafiujjaman M, Deaguero IG, et al. Potential Use of Exosomes as Diagnostic Biomarkers and in Targeted Drug Delivery: Progress in Clinical and Preclinical

- Applications. *ACS Biomater Sci Eng*. 2021;7(6):2106-2149.
doi:10.1021/acsbmaterials.1c00217
134. Kanada M, Bachmann MH, Hardy JW, et al. Differential fates of biomolecules delivered to target cells via extracellular vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(12):E1433-E1442. doi:10.1073/pnas.1418401112
135. Sedlik C, Vigneron J, Torrieri-Dramard L, et al. Different immunogenicity but similar antitumor efficacy of two DNA vaccines coding for an antigen secreted in different membrane vesicle-associated forms. *J Extracell Vesicles*. 2014;3:10.3402/jev.v3.24646. Published 2014 Aug 27. doi:10.3402/jev.v3.24646
136. Gostimskaya I. CRISPR-Cas9: A History of Its Discovery and Ethical Considerations of Its Use in Genome Editing. *Biochemistry (Mosc)*. 2022;87(8):777-788. doi:10.1134/S0006297922080090
137. Barrangou R. CRISPR-Cas systems and RNA-guided interference. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2013;4(3):267-278. doi:10.1002/wrna.1159
138. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. *J Bacteriol*. 1987;169(12):5429-5433. doi:10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987
139. Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife*. 2013;2:e00471. Published 2013 Jan 29. doi:10.7554/eLife.00471
140. Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*. 2011;471(7340):602-607. doi:10.1038/nature09886
141. Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet*. 2010;11(9):636-646. doi:10.1038/nrg2842
142. Bogdanove AJ, Voytas DF. TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. *Science*. 2011;333(6051):1843-1846. doi:10.1126/science.1204094
143. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(39):E2579-E2586. doi:10.1073/pnas.1208507109
144. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337(6096):816-821. doi:10.1126/science.1225829
145. Yang H, Ren S, Yu S, et al. Methods Favoring Homology-Directed Repair Choice in Response to CRISPR/Cas9 Induced-Double Strand Breaks. *Int J Mol Sci*. 2020;21(18):6461. Published 2020 Sep 4. doi:10.3390/ijms21186461
146. Ferraiuolo RM, Manthey KC, Stanton MJ, Triplett AA, Wagner KU. The Multifaceted Roles of the Tumor Susceptibility Gene 101 (TSG101) in Normal Development and

- Disease. *Cancers (Basel)*. 2020;12(2):450. Published 2020 Feb 14. doi:10.3390/cancers12020450
147. Li L, Li X, Francke U, Cohen SN. The TSG101 tumor susceptibility gene is located in chromosome 11 band p15 and is mutated in human breast cancer. *Cell*. 1997;88(1):143-154. doi:10.1016/s0092-8674(00)81866-8
 148. Li L, Cohen SN. Tsg101: a novel tumor susceptibility gene isolated by controlled homozygous functional knockout of allelic loci in mammalian cells. *Cell*. 1996;85(3):319-329. doi:10.1016/s0092-8674(00)81111-3
 149. Razi M, Futter CE. Distinct roles for Tsg101 and Hrs in multivesicular body formation and inward vesiculation. *Mol Biol Cell*. 2006;17(8):3469-3483. doi:10.1091/mbc.e05-11-1054
 150. Guneysu, D. (2022). *Dispositif intégré microfluidique pour la qualification de vésicules extracellulaires: mise au point de calibrants biomimétiques et de biopuces d'immunocapture* (Doctoral dissertation, Université Bourgogne Franche-Comté).
 151. Guescini M, Genedani S, Stocchi V, Agnati LF. Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *J Neural Transm (Vienna)*. 2010;117(1):1-4. doi:10.1007/s00702-009-0288-8
 152. Guescini M, Guidolin D, Vallorani L, et al. C2C12 myoblasts release micro-vesicles containing mtDNA and proteins involved in signal transduction. *Exp Cell Res*. 2010;316(12):1977-1984. doi:10.1016/j.yexcr.2010.04.006
 153. Silverman JM, Christy D, Shyu CC, et al. CNS-derived extracellular vesicles from superoxide dismutase 1 (SOD1)^{G93A} ALS mice originate from astrocytes and neurons and carry misfolded SOD1. *J Biol Chem*. 2019;294(10):3744-3759. doi:10.1074/jbc.RA118.004825
 154. Kumar S, Phaneuf D, Cordeau P Jr, Boutej H, Kriz J, Julien JP. Induction of autophagy mitigates TDP-43 pathology and translational repression of neurofilament mRNAs in mouse models of ALS/FTD. *Mol Neurodegener*. 2021;16(1):1. Published 2021 Jan 7. doi:10.1186/s13024-020-00420-5
 155. Kanodia JS, Gadkar K, Bumbaca D, et al. Prospective Design of Anti-Transferrin Receptor Bispecific Antibodies for Optimal Delivery into the Human Brain. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. 2016;5(5):283-291. doi:10.1002/psp4.12081
 156. Friden PM, Walus LR, Musso GF, Taylor MA, Malfroy B, Starzyk RM. Anti-transferrin receptor antibody and antibody-drug conjugates cross the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(11):4771-4775. doi:10.1073/pnas.88.11.4771
 157. Jones AR, Shusta EV. Blood-brain barrier transport of therapeutics via receptor-mediation. *Pharm Res*. 2007;24(9):1759-1771. doi:10.1007/s11095-007-9379-0
 158. Bien-Ly N, Yu YJ, Bumbaca D, et al. Transferrin receptor (TfR) trafficking determines brain uptake of TfR antibody affinity variants. *J Exp Med*. 2014;211(2):233-244. doi:10.1084/jem.20131660

159. Xiang M, Zeng Y, Yang R, et al. U6 is not a suitable endogenous control for the quantification of circulating microRNAs. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;454(1):210-214. doi:10.1016/j.bbrc.2014.10.064
160. Lertkiatmongkol P, Liao D, Mei H, Hu Y, Newman PJ. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *Curr Opin Hematol.* 2016;23(3):253-259. doi:10.1097/MOH.0000000000000239
161. Battistelli M, Falcieri E. Apoptotic Bodies: Particular Extracellular Vesicles Involved in Intercellular Communication. *Biology (Basel).* 2020;9(1):21. Published 2020 Jan 20. doi:10.3390/biology9010021
162. Smyth T, Kullberg M, Malik N, Smith-Jones P, Graner MW, Anchordoquy TJ. Biodistribution and delivery efficiency of unmodified tumor-derived exosomes. *J Control Release.* 2015;199:145-155. doi:10.1016/j.jconrel.2014.12.013
163. Wiklander OP, Nordin JZ, O'Loughlin A, et al. Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting. *J Extracell Vesicles.* 2015;4:26316. Published 2015 Apr 20. doi:10.3402/jev.v4.26316
164. Kalchenko V, Shivtiel S, Malina V, et al. Use of lipophilic near-infrared dye in whole-body optical imaging of hematopoietic cell homing. *J Biomed Opt.* 2006;11(5):050507. doi:10.1117/1.2364903
165. Qiao L, Hu S, Huang K, et al. Tumor cell-derived exosomes home to their cells of origin and can be used as Trojan horses to deliver cancer drugs. *Theranostics.* 2020;10(8):3474-3487. Published 2020 Feb 10. doi:10.7150/thno.39434
166. Yang T, Martin P, Fogarty B, et al. Exosome delivered anticancer drugs across the blood-brain barrier for brain cancer therapy in *Danio rerio*. *Pharm Res.* 2015;32(6):2003-2014. doi:10.1007/s11095-014-1593-y
167. Abulrob A, Sprong H, Van Bergen en Henegouwen P, Stanimirovic D. The blood-brain barrier transmigration single domain antibody: mechanisms of transport and antigenic epitopes in human brain endothelial cells. *J Neurochem.* 2005 Nov;95(4):1201-14. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03463.x. PMID: 16271053
168. Alata W, Yogi A, Brunette E, et al. Targeting insulin-like growth factor-1 receptor (IGF1R) for brain delivery of biologics. *FASEB J.* 2022;36(3):e22208. doi:10.1096/fj.202101644R
169. Orsini, M. (2017). Inhibition de l'érythropoïèse par la voie TNF α /sphingomyélinase/céramide: rôle du réseau de régulation microARN/facteurs de transcription et impact sur l'autophagie (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).
170. Kukreti, H., & Amuthavalli, K. (2020). MicroRNA-34a causes ceramide accumulation and effects insulin signaling pathway by targeting ceramide kinase (CERK) in aging skeletal muscle. *Journal of Cellular Biochemistry*, 121(5-6), 3070-3089.
171. Duong Ngoc Diem Nguyen , William M. Chilian , Shamsul Mohd Zain , Muhammad Fauzi Daud et Yuh-Fen Pung . 2021. Régulation des microARN des cellules musculaires lisses vasculaires et son importance dans les maladies cardiovasculaires. *Journal*

canadien de physiologie et pharmacologie . **99** (9): 827-838. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2020-0581>

172. Meister M, Tikkanen R. Endocytic trafficking of membrane-bound cargo: a flotillin point of view. *Membranes (Basel)*. 2014;4(3):356-371. Published 2014 Jul 11. doi:10.3390/membranes4030356
173. Guduric-Fuchs J, O'Connor A, Camp B, O'Neill CL, Medina RJ, Simpson DA. Selective extracellular vesicle-mediated export of an overlapping set of microRNAs from multiple cell types. *BMC Genomics*. 2012;13:357. Published 2012 Aug 1. doi:10.1186/1471-2164-13-357
174. Yang JS, Maurin T, Robine N, et al. Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(34):15163-15168. doi:10.1073/pnas.1006432107
175. Hannun YA, Obeid LM. Many ceramides. *J Biol Chem*. 2011;286(32):27855-27862. doi:10.1074/jbc.R111.254359
176. Hofmann K, Tomiuk S, Wolff G, Stoffel W. Cloning and characterization of the mammalian brain-specific, Mg²⁺-dependent neutral sphingomyelinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(11):5895-5900. doi:10.1073/pnas.97.11.5895
177. Insausti-Urkia N, Solsona-Vilarrasa E, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC. Sphingomyelinases and Liver Diseases. *Biomolecules*. 2020;10(11):1497. Published 2020 Oct 30. doi:10.3390/biom10111497
178. Choezom D, Gross JC. Neutral sphingomyelinase 2 controls exosome secretion by counteracting V-ATPase-mediated endosome acidification. *J Cell Sci*. 2022;135(5):jcs259324. doi:10.1242/jcs.259324
179. Willms E, Cabañas C, Mäger I, Wood MJA, Vader P. Extracellular Vesicle Heterogeneity: Subpopulations, Isolation Techniques, and Diverse Functions in Cancer Progression. *Front Immunol*. 2018;9:738. Published 2018 Apr 30. doi:10.3389/fimmu.2018.00738
180. Poduslo JF, Curran GL, Berg CT. Macromolecular permeability across the blood-nerve and blood-brain barriers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(12):5705-5709. doi:10.1073/pnas.91.12.5705
181. Ferraiuolo RM, Manthey KC, Stanton MJ, Triplett AA, Wagner KU. The Multifaceted Roles of the Tumor Susceptibility Gene 101 (TSG101) in Normal Development and Disease. *Cancers (Basel)*. 2020;12(2):450. Published 2020 Feb 14. doi:10.3390/cancers12020450