



HAL
open science

Les exosomes : méthodes d'études, composition, fonctions, intérêt en médecine humaine et vétérinaire

Nicolas Wurtz

► **To cite this version:**

Nicolas Wurtz. Les exosomes : méthodes d'études, composition, fonctions, intérêt en médecine humaine et vétérinaire. Médecine vétérinaire et santé animale. 2022. dumas-03970750

HAL Id: dumas-03970750

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03970750v1>

Submitted on 2 Feb 2023

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

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

Année 2022

LES EXOSOMES : MÉTHODES D'ÉTUDES, COMPOSITION, FONCTIONS, INTÉRÊT EN MÉDECINE HUMAINE ET VÉTÉRINAIRE

THÈSE

pour obtenir le diplôme d'État de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE
présentée et soutenue publiquement devant
la Faculté de Médecine de Créteil (UPEC)
le 12 juillet 2022

par

Nicolas WURTZ

sous la direction de

Sylvain BELLIER

JURY

Présidente du jury :	Mme Sophie LE PODER	Professeure à l'EnvA
Directeur de thèse :	M. Sylvain BELLIER	Professeur à l'EnvA
Examinatrice :	Mme Fanny PILOT-STORCK	Professeure à l'EnvA

Liste des enseignants intervenant dans l'encadrement des thèses de Doctorat vétérinaire



Version du 8 février 2022

Liste des Professeurs et Maîtres de conférences titulaires de l'HDR

M	Adjou	Karim	Professeur	DPASP
M	Audigié	Fabrice	Professeur	DEPEC
M	Bellier	Sylvain	Professeur	DSBP
M	Blaga	Radu	Maître de conférences HDR	DPASP
M	Blot	Stephane	Professeur	DEPEC
M	Boulouis	Henri-Jean	Professeur émérite	DSBP
Mme	Chahory	Sabine	Professeur	DEPEC
M	Chateau	Henry	Professeur	DSBP
Mme	Chetboul	Valerie	Professeur	DEPEC
Mme	Crevier-Denoix	Nathalie	Professeur	DSBP
M	Degueurce	Christophe	Professeur	DSBP
M	Denoix	Jean-Marie	Professeur	DEPEC
M	Desquilbet	Loïc	Professeur	DSBP
Mme	Dufour	Barbara	Professeur émérite	DPASP
M	Eloit	Marc	Professeur	DSBP
M	Fayolle	Pascal	Professeur émérite	DEPEC
M	Fédérighi	Michel	Professeur	DPASP
M	Fontbonne	Alain	Professeur	DEPEC
Mme	Gilbert	Caroline	Professeur	DSBP
M	Grandjean	Dominique	Professeur	DEPEC
Mme	Grimard-Ballif	Bénédicte	Professeur	DPASP
Mme	Haddad-Hoang Xuan	Nadia	Professeur	DPASP
M	Jouvion	Gregory	Professeur	DSBP
M	Kohlhauer	Matthias	Maître de conférences HDR	DSBP
Mme	Le Poder	Sophie	Professeur	DSBP
M	Manassero	Mathieu	Professeur	DEPEC
Mme	Maurey-Guénec	Christelle	Maître de conférences HDR	DEPEC
M	Millemann	Yves	Professeur	DPASP
M	Perrot	Sébastien	Maître de conférences HDR	DSBP
Mme	Pilot-Storck	Fanny	Professeur	DSBP
M	Ponter	Andrew	Professeur	DPASP
Mme	Rivière	Julie	Maître de conférences HDR	DPASP
Mme	Robert	Céline	Professeur	DSBP
M	Tiret	Laurent	Professeur	DSBP
M	Tissier	Renaud	Professeur	DSBP
M	Verwaerde	Patrick	Professeur	DEPEC
Mme	Viateau	Véronique	Professeur	DEPEC

Liste des Maîtres de conférences et Ingénieurs de recherche DMV

M	Arné	Pascal	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barassin	Isabelle	Maître de conférences	DPASP
Mme	Benchezkroun	Ghita	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Bertoni	Lelia	Maître de conférences	DEPEC
M	Bolnot	Francois	Maître de conférences	DPASP
Mme	Canonne-Guibert	Morgane	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Chevallier	Lucie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Cochet-Faivre	Noëlle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Constant	Fabienne	Maître de conférences	DPASP
Mme	Cordonnier-Lefort	Nathalie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Crepeaux	Guillemette	Maître de conférences	DSBP
Mme	De Paula Reis	Alline	Maître de conférences	DPASP
Mme	Decambroun	Adeline	Maître de conférences	DEPEC
M	Delsart	Maxime	Maître de conférences associé	DPASP
M	Desbois	Christophe	Maître de conférences	DEPEC
M	Deshuillers	Pierre	Maître de conférences	DSBP
M	Gauthier	Michel	Maître de conférences associé	DPASP
Mme	Guétin-Poirier	Valentine	Maître de conférences	DPASP
Mme	Jacquet	Sandrine	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Lagrée	Anne-Claire	Maître de conférences	DSBP
Mme	Le Roux	Delphine	Maître de conférences	DSBP
Mme	Legrand	Chantal	Maître de conférences associé	DSBP
Mme	Marignac	Genevieve	Maître de conférences	DSBP
M	Maufré	Vincent	Maître de conférences	DPASP
Mme	Mtimet	Narjès	Maître de conférences	DPASP
Mme	Mespouilhès-Rivière	Céline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Mortier	Jérémy	Maître de conférences associé	DEPEC
M	Nudemann	Nicolas	Maître de conférences	DEPEC
M	Pignon	Charly	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Polack	Bruno	Maître de conférences	DSBP
Mme	Ravary-Plumioën	Bérandère	Maître de conférences	DPASP
M	Reyes-Gomez	Edouard	Maître de conférences	DSBP
Mme	Risco-Castillo	Véronica	Maître de conférences	DSBP
Mme	Rose	Hélène	Maître de conférences associé	DSBP

Remerciements

A la Présidente du Jury de cette thèse, Mme S. Le Poder, Professeure à l'ENVA,

Je vous adresse des remerciements respectueux pour avoir accepté de présider le jury de thèse.

A M. S.Bellier, Professeur à l'EnvA,

Je vous adresse des remerciements chaleureux pour m'avoir accompagné et dirigé pour la réalisation de ce travail de thèse. Merci pour votre investissement, votre patience et votre compréhension.

A Mme F.Pilot-Storck, Professeure à l'EnvA,

Je vous adresse des remerciements sincères pour avoir accepté de corriger ce travail et m'avoir fait l'honneur d'être mon assesseure.

A ma famille, à Chloé,

Merci pour votre soutien indéfectible, même dans les moments difficiles.

Table des matières

Liste des figures.....	3
Liste des tableaux	5
Liste des abréviations	7
Introduction.....	9
Première partie : Biogenèse des exosomes et analyse compositionnelle	11
1. Les vésicules extracellulaires, une famille hétéroclite	11
A. Les exosomes	12
B. Les microvésicules.....	13
C. Les corps apoptotiques	13
2. Composition des exosomes	14
A. Protéines	15
B. Lipides.....	16
C. Acides nucléiques	17
3. Biogenèse des exosomes	19
A. Assortiment pré-vésiculaire	19
B. Voies ESCRT dépendantes	19
a. Complexe ESCRT	20
b. Synténine/syndécane et ALIX	22
c. Protéine SIMPLE	22
d. Acidification des corps multi-vésiculaires.....	22
C. Voies ESCRT indépendantes.....	22
a. Céramides	22
b. Tétraspansines.....	23
c. Modifications post-traductionnelles	23
4. Sécrétion	26
A. Recyclage ou sécrétion.....	26
B. Transport des corps multi-vésiculaires et protéines RAB.....	26
C. Fusion membranaire et protéines SNARE	28
5. Méthodes d'études	28
A. Méthodes d'isolement	29
a. Ultracentrifugation	29
b. Isolement par taille	30
c. Affinité immuno.....	32
d. Précipitation	32
e. Microfluidique	33
B. Méthodes de caractérisation	35
a. Analyse physique	35
b. Analyse biochimique.....	36
Deuxième partie : Applications fonctionnelles – diagnostiques - thérapeutiques	39
1. Exosomes et physiologie	39
A. Immunité	39
B. Reproduction.....	41
C. Cellules souches et développement.....	43
D. Physiologie du système nerveux.....	44
E. Physiologie cardiovasculaire	46
F. Physiologie rénale.....	48
2. Exosomes et pathologie	50
A. Néoplasies	50

<i>B. Affections neurologiques</i>	58
<i>C. Affections cardiovasculaires</i>	61
<i>D. Affections rénales</i>	64
<i>E. Maladies infectieuses</i>	66
3. Exosomes et biomarqueurs.....	68
<i>A. Biomarqueurs néoplasiques</i>	68
<i>B. Biomarqueurs neurologiques</i>	74
<i>C. Biomarqueurs cardiovasculaires</i>	75
<i>D. Biomarqueurs urinaires</i>	77
<i>E. Autres biomarqueurs</i>	78
4. Exosome et thérapie.....	81
<i>A. Modalités d'usage thérapeutique</i>	81
a. Approche pré-isolement ou indirecte.....	82
b. Approche post-isolement ou directe.....	88
<i>B. Applications thérapeutiques vétérinaires</i>	92
a. Délivrance thérapeutique ciblée.....	92
b. Médecine régénérative.....	93
c. Vaccination et immunothérapie.....	94
Conclusion	97
Liste des références bibliographiques	99

Liste des figures

Figure 1 : Nombre de publications par an sur Pubmed entre 1946 et 2021 concernant le terme de vésicules extracellulaires (d'après Bazzan <i>et al.</i> , 2021)	11
Figure 2 : Représentation schématique de la composition d'un exosome et des fonctions associées aux composants vésiculaires (d'après Jadli <i>et al.</i> , 2020).....	15
Figure 3 : Composition en acides nucléiques des exosomes (d'après Huang <i>et al.</i> , 2013).....	18
Figure 4 : Biogenèse des vésicules extracellulaires (d'après van Niel <i>et al.</i> , 2018).....	20
Figure 5 : Modèle de polymérisation des chaînes d'ubiquitine (d'après Ikeda et Dikic, 2008).....	21
Figure 6 : Origine de la diversité des exosomes (d'après van Niel <i>et al.</i> , 2018)	25
Figure 7 : Schéma récapitulatif des mécanismes impliqués dans le transport et la fusion membranaire des corps multi-vésiculaires (d'après van Niel <i>et al.</i> , 2018)	27
Figure 8 : Exemple de protocole de centrifugation différentielle et à gradient de densité (d'après Li <i>et al.</i> , 2017).....	30
Figure 9 : Représentation schématique du fonctionnement de la technique de fractionnement par couplage flux-force (Li <i>et al.</i> , 2017)	32
Figure 10 : Régulation immunitaire et vésicules extracellulaires (d'après Robbins <i>et al.</i> , 2016)	40
Figure 11 : Exosomes et système nerveux (d'après Domingues <i>et al.</i> , 2020 et Yuyama et Igarashi, 2016).....	45
Figure 12 : Exosomes et physiologie cardiaque (d'après Wagner et Radisic, 2021).....	48
Figure 13 : Exosomes et physiologie rénale (adapté de Kwon, 2019)	49
Figure 14 : Etapes du développement tumoral (d'après Stefanius <i>et al.</i> , 2021).....	51
Figure 15 : Implication des exosomes dans la favorisation de l'inflammation chronique par <i>Helicobacter pylori</i> (d'après Y. Chen <i>et al.</i> , 2018).....	53
Figure 16 : Marqueurs pathologiques de la maladie d'Alzheimer (d'après Rastogi <i>et al.</i> , 2021).....	58
Figure 17 : Marqueurs pathologiques de la maladie de Parkinson (d'après Rastogi <i>et al.</i> , 2021).....	60
Figure 18 : Implication des exosomes dans les affections cardiovasculaires (Guo <i>et al.</i> , 2020).....	62
Figure 19 : Implication des exosomes dans les affections rénales (d'après S. A. Lee <i>et al.</i> , 2021).....	64
Figure 20 : Modulation de la réponse immunitaire par les vésicules extracellulaires (d'après Schorey et Harding, 2016).....	67
Figure 21 : Biomarqueurs issus du cargo exosomal (modifié de Urabe <i>et al.</i> , 2020).....	68

Figure 22 : Expression d'un pool de quatre ARNm dans un contexte de maladie valvulaire dégénérative chez le chien (V. K. Yang <i>et al.</i> , 2017)	76
Figure 23 : Modèle de thérapie exosomale	81
Figure 24 : Modèle d'ingénierie génomique pour l'affichage membranaire (modifié de Jafari <i>et al.</i> , 2020).....	82
Figure 25 : Bioingénierie de surface exosomale par édition génomique (d'après Liang <i>et al.</i> , 2021)	84
Figure 26 : Modèle d'ingénierie génomique pour le chargement de protéines (d'après Jafari <i>et al.</i> , 2020).....	86
Figure 27 : Principe d'ingénierie cellulaire pour le chargement d'ARN (d'après Jafari <i>et al.</i> , 2020)	87
Figure 28 : Représentation des méthodes physico-chimiques de chargement de molécules (modifié de Wu <i>et al.</i> , 2021)	88
Figure 29 : Bioingénierie de surface exosomale par modification physico-chimique (modifié de Liang <i>et al.</i> , 2021).....	91

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des vésicules extracellulaires (Jadli <i>et al.</i> , 2020; adapté de Y. Zhang <i>et al.</i> , 2019).....	12
Tableau 2 : Composition protéique des exosomes et fonctions biologiques associées (adapté de Y. Zhang <i>et al.</i> , 2019)	16
Tableau 3 : Composition lipidique des exosomes et fonctions biologiques associées (adapté de Y. Zhang <i>et al.</i> , 2019)	17
Tableau 4 : Tri du contenu en ARN exosomal sur la base de motifs endogènes spécifiques (d'après Wei <i>et al.</i> , 2021)	24
Tableau 5 : Approche comparative des techniques d'isolement des exosomes (d'après Doyle et Wang, 2019).....	29
Tableau 6 : Avantages et inconvénients des techniques d'isolement (d'après Zhang <i>et al.</i> , 2018; Li <i>et al.</i> , 2017).....	34
Tableau 7 : Effet de l'augmentation de l'expression des protéines et acides nucléiques exosomaux dérivés de cardiomyocytes sur la fonction cardiaque (d'après Wagner et Radisic, 2021; Yu et Wang, 2019).....	47
Tableau 8 : Fonctions exosomale et développement tumoral (d'après Stefanius <i>et al.</i> , 2021).....	57
Tableau 9 : Protéines et ARNmi exosomaux impliqués dans les maladies cardiovasculaires (d'après Q. Liu <i>et al.</i> , 2021, liste non exhaustive).....	63
Tableau 10 : Performance diagnostique de miR-21 exosomal (d'après F. Liu <i>et al.</i> , 2021)	69
Tableau 11 : Biomarqueurs exosomaux en oncologie	73
Tableau 12 : Biomarqueurs exosomaux en médecine vétérinaire	80

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ALIX : *ALG-2 interacting protein X*

APP : Précurseur de l'amyloïde β

ARN : Acide ribonucléique, messenger (ARNm) ou non codant (ARNnc)

ARNmi : micro-ARN, aussi noté miR-XXX

ARNnc : ARN non codant : ARN circulaires (ARNcirc), ARN interférant (ARNi), long ARN non codant intergénomique (ARNlinc), long non codant (ARNlnc) ; micro-ARN (ARNmi), ARNpiwi, ARN ribosomique (ARNr), petit ARN nucléaire (ARNsn), petit ARN nucléolaire (ARNsno) et ARN de transfert (ARNt)

A β : Amyloïde bêta

CAF : Fibroblastes associés au cancer

CD : *Cluster of differentiation* : glycoprotéines utilisées en nomenclature pour l'immunophénotypage

CIBN : *CRY-interacting basic-helix-loop helix 1*

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : Cellules présentatrices d'antigènes

CRISPR/Cas9 : *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein 9*

DC : Cellules dendritiques

DPSE-PEG : *1, 2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-polyethylene glycol*

EGFR : *Epidermal growth factor receptor*

ELISA : *Enzyme-linked immunosorbent assay*

ESCRT : *Endosomal sorting complexes required for transport*

EXPLOR : *Exosomes for protein loading via optically reversible protein-protein interaction*

HER : *Human epidermal growth factor receptor*

HGF : *Hepatocyte growth factor*

HIV-1 : Virus de l'immunodéficience humaine

HRS : *Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*

HSP : *Heat shock protein*

HUR : *Human antigen R*

ISEV : *International Society for Extracellular Vesicles*

LAMP : *Lysosome associated membrane protein*

MISEV : *Minimal Information for the Study of Extracellular Vesicles*

MSC : Cellules souches mésenchymateuses
MVB : *Multivesicular bodies*
NDFIP1 : *Nedd-4 family interacting protein 1*
Nef : *Negative regulatory factor* du HIV
NF- κ β : *Nuclear factor κ β*
NK : lymphocytes *natural killer*
nSMASE : *Neutral sphingomyelinase ; sphingomyélinase neutre*
PAP : *Prostatic acid phosphatase*
PDGFR : *Platelet-derived growth factor receptor*
PD-L1 : *Programmed death-ligand 1*
PEG : *Polyethylene glycol*
PSA : *Prostate specific antigen*
RAB : *Ras-related protein*
RVG : *Rabies virus glycoprotein*
SIMPLE : *Small integral membrane protein of the lysosome/late endosome*
SIRP α : *Signal regulatory protein α*
SNARE : *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor*
TAR : *Transactivating response element*
TAT : *Transactivator of transcription protein*
TDE : *Tumor Derived Exosomes*
TGF : *Transforming growth factor*
TNF : *Tumor necrosis factor*
TSG : *Tumor susceptibility gene*
UTR : *Untranslated region*
VAMP : *Vesicle associated membrane protein*
VE : Vésicules extracellulaires
VEGF : *Vascular endothelial growth factor*
VSVG : *Vesicular stomatitis virus glycoprotein*
 α -syn : Alpha synucléine

Introduction

Les premières observations de vésicules extracellulaires (VE) circulantes sont rapportées il y a 50 ans environ. Wolf s'intéresse aux mécanismes de la coagulation et met en évidence la présence de résidus issus des plaquettes, à l'effet pro-coagulant (Wolf, 1967). Pourtant ces éléments ont été considérés comme des résidus de la machinerie de recyclage cellulaire. La libération de vésicules semblables est également décrite chez les procaryotes dans les années 60 (Knox *et al.*, 1966).

En 1983, Harding visualise le mécanisme de formation des plus petites vésicules, issues des endosomes tardifs : la formation de ces vésicules passe par l'invagination de la membrane endosomale et la captation de composants cytosoliques à l'origine de corps multi-vésiculaires (MVB) (Harding *et al.*, 1983). Ces derniers fusionnent après maturation avec la membrane plasmique et libèrent des vésicules intraluminales intervenant dans le recyclage des récepteurs à transferrine.

En 1987, Johnstone utilise le terme d'exosome, terme attribué aux vésicules d'origine endosomale, par opposition au processus d'endocytose. Les exosomes sont alors associés aux vésicules intraluminales issues de la fusion membranaire des MVB (Johnstone *et al.*, 1987).

L'hypothèse dans les années 90 est que ces vésicules pourraient avoir un rôle déterminant dans la communication intercellulaire, locale et systémique et de ce fait dans la régulation de l'homéostasie des cellules mais aussi dans le développement de certaines maladies (Johnstone, 1992). Cette hypothèse confirmée notamment par Raposo en 1996 ouvrira le champ d'études des exosomes et des VE. En effet on montre que des exosomes transportant des complexes majeurs d'histocompatibilité de type II (CMH-II) interviennent dans la réponse immunitaire et dans la communication entre cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et lymphocytes T (Raposo *et al.*, 1996).

Par la suite, on a montré que la plupart des fluides biologiques (sérum, urine, salive, lait), ou encore certaines cultures cellulaires peuvent être à l'origine de vésicules circulantes (Kowal *et al.*, 2014; Raposo et Stoorvogel, 2013; Yáñez-Mó *et al.*, 2015). On retrouve par ailleurs ce processus de formation vésiculaire chez certains unicellulaires (Aaronson *et al.*, 1971; Bazzan *et al.*, 2021). Récemment l'existence des VE a même été étudiée dans la régulation du mécanisme d'interaction entre des plantes et leurs microbiotes environnementaux (Rutter et Innes, 2018).

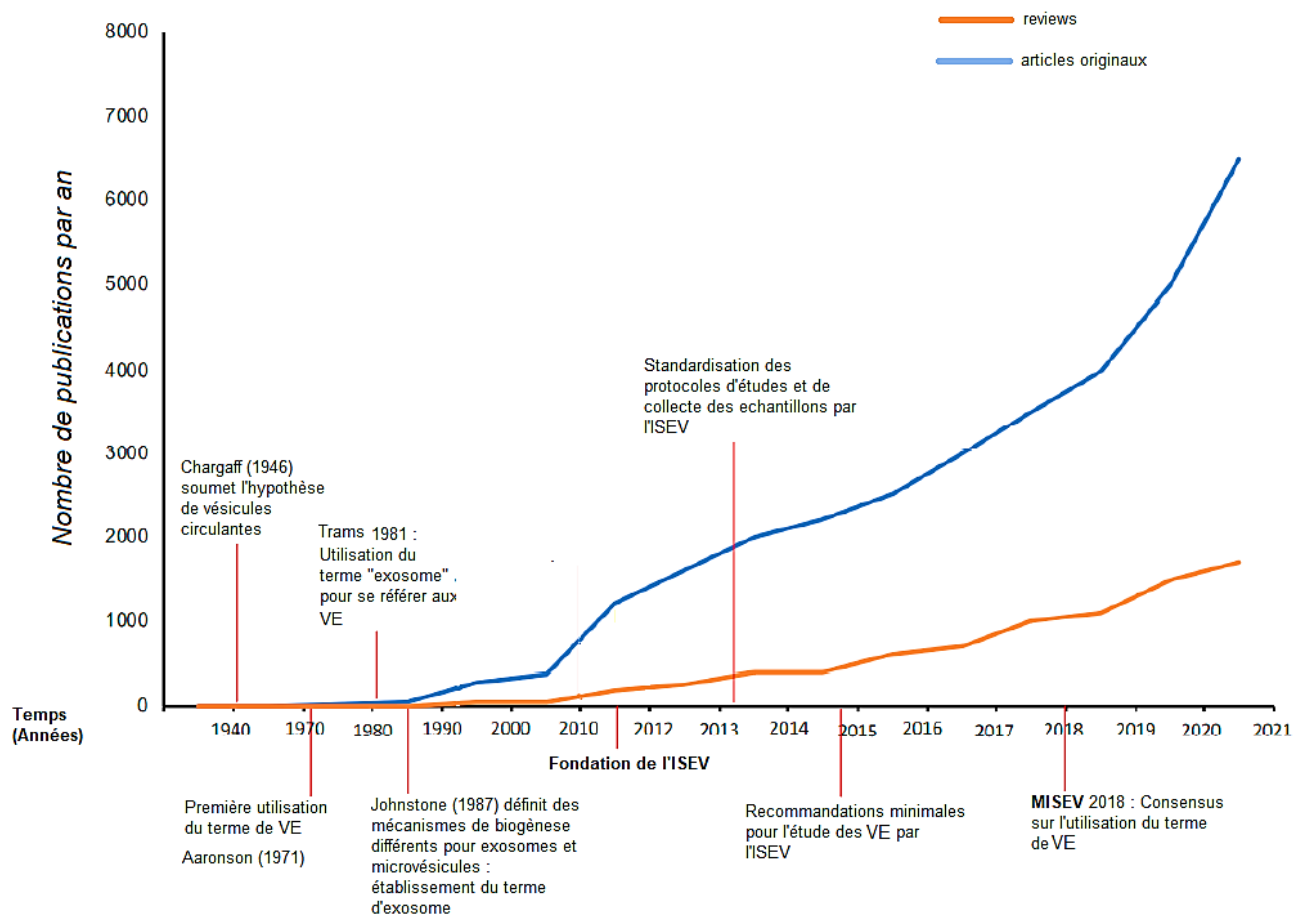
Ce mécanisme de communication intercellulaire est un processus conservé sur le plan génétique. En effet il est décrit pour l'ensemble des domaines du vivant, procaryotes comme eucaryotes (Deatherage et Cookson, 2012). Les VE sont des cibles de choix dans les études scientifiques récentes du fait de leur implication potentielle sur de nombreux processus. Si de nombreuses études s'intéressent déjà à l'analyse et l'utilisation clinique de ces vésicules en médecine humaine, les recherches passent souvent par un modèle animal. La transposition des données acquises pour la médecine humaine aux affections animales pourrait représenter un enjeu important dans le développement de nouvelles méthodes de suivis biochimiques et d'applications thérapeutiques dans le monde vétérinaire.

Première partie : Biogenèse des exosomes et analyse compositionnelle

1. Les vésicules extracellulaires, une famille hétéroclite

L'étude des VE dans le monde scientifique est relativement récente (**Figure 1**). Face à l'augmentation des références de la littérature concernant les vésicules extracellulaires, et en l'absence de critères de définition standardisés, un consensus d'experts s'est formé en 2011, regroupé sous le nom d'*International Society for Extracellular Vesicles* (ISEV), avec pour but de définir des recommandations pour l'étude des VE. Des lignes directrices ont été rédigées et sont régulièrement détaillées afin d'établir des critères de différenciation entre les populations de vésicules (*Minimal Information for the Study of Extracellular Vesicles* : MISEV). Le terme de VE est défini en rapport aux particules libérées de manière physiologique par une cellule, déterminées par une bicouche lipidique et qui ne peuvent se répliquer, ne contenant donc pas de noyau fonctionnel. (Théry *et al.*, 2018).

Figure 1 : Nombre de publications par an sur Pubmed entre 1946 et 2021 concernant le terme de vésicules extracellulaires (d'après Bazzan *et al.*, 2021)



ISEV : *International Society for Extracellular vesicles* ; MISEV : *Minimal information for the study of extracellular vesicles* ; VE : vésicules extracellulaires

Malgré les recommandations récentes, et du fait d'une importante variabilité rapportée selon les études, c'est sur la base d'un regroupement de critères que les scientifiques s'appuient pour l'étude des VE (Doyle et Wang, 2019). On distingue communément les trois catégories suivantes : exosomes, microvésicules et corps apoptotiques. Leurs caractéristiques diffèrent, et par conséquent leurs devenir dans la cellule aussi (Yáñez-Mó et al., 2015).

On retrouve dans le **Tableau 1** les principales caractéristiques des trois sous-groupes. Ainsi la différenciation s'appuie à la fois sur des critères physiques (taille, densité) mais aussi biochimiques (contenu/marqueurs/perméabilité). On retrouve dans la littérature peu de marqueurs spécifiques mais les VE présentent tout de même des profils protéiques différents (Jeppesen *et al.*, 2019). On décrit des marqueurs communs, comme certaines protéines membranaires (tétraspanines), et d'autres plus spécifiques comme des composants de la machinerie de biogenèse (*Tumor susceptibility gene 101* : TSG101, *ALG-2 interacting protein X* : ALIX), ou encore la présence ou l'absence d'organelles (pour les corps apoptotiques).

Tableau 1 : Caractéristiques des vésicules extracellulaires (Jadli *et al.*, 2020; adapté de Y. Zhang *et al.*, 2019)

Caractéristique	Exosome	Corps apoptotiques	Microvésicules
Taille	Homogène 30-100 nm	Hétérogène 1-5 µm	Hétérogène 100-1000 nm
Marqueurs	Membrane imperméable CD63, CD9, CD81, LAMP1, TSG101, ALIX, flottiline	Membrane perméable, annexine V, ADN, Histones	Membrane imperméable, intégrines, sélectine, flottiline-2
Densité	1,13-1,19 g/mL	1,16-1,28 g/mL	1,25-1,30g/mL
Contenu	Protéines, lipides, acides nucléiques (ARN et ADN)	Composants cytosoliques dont protéines, ARN, ADN fragmenté, organelles	Protéines, lipides, acides nucléiques (ARN et ADN)
Origine	Fusion membranaire des MVB	Débris cellulaires, fragmentation membranaire durant l'apoptose	Bourgeonnement membranaire direct
Lipides/Propriété de membrane	Assortiment de lipides issus de la cellule parentale - Rafts lipidiques	Externalisation de la phosphatidylsérine	Externalisation de la phosphatidylsérine, assortiment dérivant de la cellule parentale, rafts lipidiques
Sécrétion	Constitutive ou inducible	Activité myosine-ATPasique, kinase Rho	Relocalisation des phospholipides sur la membrane externe, réarrangements du cytosquelette, courbure membranaire
Méthodes de détection (non exhaustif)	Microscopie électronique, Western blot, spectrométrie de masse,	Cytométrie de flux, microscopie électronique,	Cytométrie de flux, microscopie électronique, méthodes par capture
Méthodes d'isolement (non exhaustif)	Ultracentrifugation, immunoprécipitation, kits commerciaux	Ultracentrifugation (10 000/20 000 x g)	Pas de méthodes standardisées

ADN : Acide désoxyribonucléique ; ALIX : ALG-2 interacting protein ; ARN : Acide ribonucléique ; ATP : Adénosine tri-phosphate ; CD : Cluster of differentiation ; LAMP 1 : Lysosomal associated membrane protein 1 ; MVB : Multivesicular bodies ; TSG101 : Tumor susceptibility gene 101 ;

A. Les exosomes

Les exosomes sont des nano-vésicules, présentant une bicouche lipidique, mesurant de 30 à 100 nm dont la densité varie entre 1,13 et 1,19 g/ml. Ils correspondent aux vésicules intraluminales, formées par invagination de la membrane limitante des endosomes (Doyle et Wang, 2019; Minciacchi *et al.*, 2015). Les endosomes sont les compartiments

intracellulaires, délimités par une bicouche lipidique, qui interviennent dans les processus de tri des composants cytosoliques. Ils représentent un carrefour métabolique entre la voie de synthèse protéique d'une part (appareil de Golgi) et la voie de dégradation d'autre part (lysosomes, membrane plasmique, protéasome). Les endosomes subissent une maturation, et prennent la forme d'endosomes possédant des vésicules intraluminales, aussi appelés MVB, puis sont sécrétés dans le milieu extracellulaire, libérant ainsi les exosomes (Raposo et Stoorvogel, 2013; Yáñez-Mó *et al.*, 2015). Les MVB ont pour devenir la fusion avec les lysosomes, c'est-à-dire le recyclage cellulaire ; ou alors la fusion membranaire et la sécrétion des exosomes (Johnstone, 2005; Pan *et al.*, 1985). La sécrétion est à la fois constitutive et inductible par des stimuli spécifiques (György *et al.*, 2011).

On retrouve les exosomes de manière ubiquitaire dans la majorité des cellules de l'organisme (Doyle et Wang, 2019; Jeppesen *et al.*, 2019). On s'y réfère dans la littérature selon différentes appellations ; par exemple à leur stade pré-sécrétoire, les vésicules intraluminales. Les mécanismes se rapportant à leur biogenèse et leur composition sont décrits ci-dessous.

Les exosomes sont de taille inférieure à celle des corps apoptotiques. Cette différence leur permet d'échapper plus longuement au système phagocytaire. Leur durée de circulation est en conséquence plus longue, ils présentent une meilleure capacité en termes de support de communication intercellulaire (Wu *et al.*, 2021).

B. Les microvésicules

Les microvésicules sont représentées par une population hétérogène de vésicules. On retrouve dans la littérature des appellations comme « ectosomes » ou encore « microparticules » (Théry *et al.*, 2018). Leur taille varie de 100 à 1000 nm pour une densité de 1.25 à 1.3 g/ml (Mathieu *et al.*, 2019; van Niel *et al.*, 2018), avec des formes variables. Elles ont été initialement caractérisées comme produits de plaquettes, de cellules endothéliales et de cellules de la lignée sanguine (Lynch et Ludlam, 2007; Mause et Weber, 2010). De manière comparable aux exosomes, les microvésicules contiennent nombre de molécules actives biologiquement telles que des cytokines, des enzymes, des protéines de la signalisation, des acides nucléiques, ou encore des facteurs de croissance (Jadli *et al.*, 2020; Sedgwick et D'Souza-Schorey, 2018).

La production est régulée spécifiquement selon l'état de la cellule sécrétrice et son environnement (Hessvik et Llorente, 2018; Yáñez-Mó *et al.*, 2015). Cette production passe par le bourgeonnement de la membrane plasmique, avec un remodelage et une redistribution des lipides membranaires et notamment une extériorisation de la phosphatidylsérine (Lynch et Ludlam, 2007). La régulation de la production des microvésicules est sous contrôle calcique, dont l'augmentation intracellulaire est à l'origine de l'initiation du remodelage cellulaire (Jadli *et al.*, 2020). La modification de la membrane, en association avec le cytosquelette est à l'origine de l'évagination et donc de la formation des microvésicules (Mause et Weber, 2010).

D'autres mécanismes entrent en compte dans leur formation, dont certains ont des composantes communes avec les exosomes (tétraspanines, céramides, ESCRT)(van Niel *et al.*, 2018).

C. Les corps apoptotiques

D'une taille de 1 à 5 μm , ce sont les résidus des dernières étapes de l'apoptose et des modifications morphologiques de la cellule dans le contexte de mort programmée (Doyle et Wang, 2019). On rapporte un gradient de densité de 1,18 à 1,28 g/ml. Cette famille regroupe les VE les plus grandes issues de la membrane plasmique (György *et al.*, 2011).

Un des critères de différenciation de ces VE repose sur leur composition, qui varie fortement selon la cellule d'origine et diffère de celle des microvésicules et des exosomes. On y retrouve notamment des organelles, de la chromatine et des protéines glycosylées (Doyle et Wang, 2019). Par ailleurs, on retrouve des critères similaires à certaines microvésicules, dont notamment l'exposition sur le feuillet membranaire externe de phosphatidylsérine (György *et al.*, 2011), la membrane des corps apoptotiques présente toutefois une certaine perméabilité contrairement aux autres VE (Jadli *et al.*, 2020).

Les corps apoptotiques entrent dans la régulation de fonctions spécifiques associées à l'apoptose, notamment le transfert d'oncogènes (Bergsmedh *et al.*, 2001), d'acides désoxyribonucléiques (ADN)(Holmgren *et al.*, 1999), l'immunosuppression (Savill *et al.*, 2002) et la communication intercellulaire (Orlando *et al.*, 2006; Wickman *et al.*, 2013).

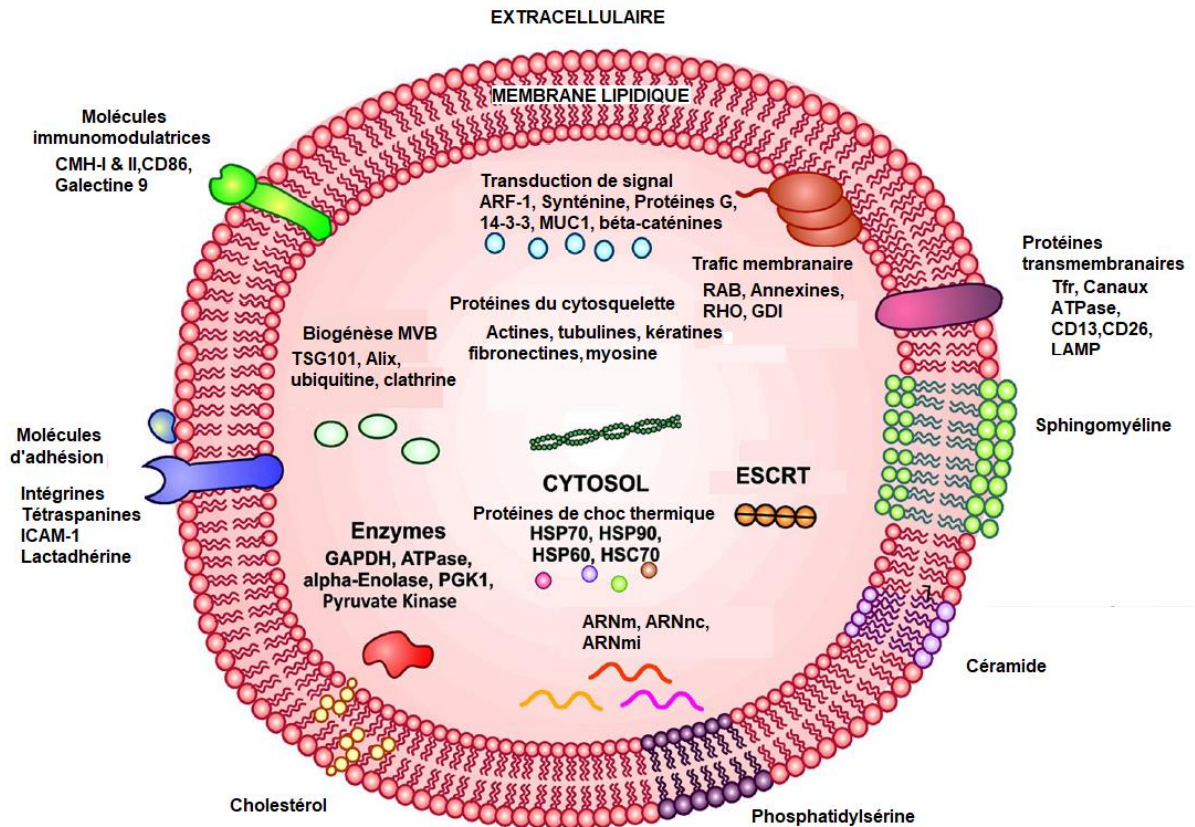
Dans la réalité, la dichotomie entre les différentes VE n'est pas aussi franche, puisqu'il semble exister des populations mixtes de microvésicules, notamment dans certaines lignées de lymphocytes T (Booth *et al.*, 2006). En effet, des VE ayant pour origine la membrane plasmique sont porteuses de biomarqueurs généralement associés aux exosomes (*Cluster of differentiation* : CD63, CD81), ce qui est en faveur d'une variabilité des mécanismes de formation des différentes VE. De plus, cette observation est aussi en faveur d'un partage des mécanismes d'appariement du contenu exosomal ou microvésiculaire, ce qui rend parfois difficile la distinction entre les populations vésiculaires (Colombo *et al.*, 2014).

2. Composition des exosomes

La composition des exosomes dépend de la cellule parentale, mais aussi de son statut physiologique à un instant donné (Boriachek *et al.*, 2018). Il s'agit de vésicules composées d'une bicouche lipidique et d'un contenu disparate (**Figure 2**). On y retrouve nombre de protéines, acides nucléiques et lipides, organisés dans le cytosol ou la membrane, avec des orientations spécifiques.

A l'heure actuelle, des études s'intéressent au recensement de la diversité de composition ou « cargo » exosomal. Deux bases de données Exocarta et Evpedia rapporte pas moins de 41 860 protéines, 7540 acides ribonucléiques (ARN) et 1116 lipides sur la base de 286 études portant sur les exosomes (Keerthikumar *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2013).

Figure 2 : Représentation schématique de la composition d'un exosome et des fonctions associées aux composants vésiculaires (d'après Jadli *et al.*, 2020)



ARF : *ADP ribosylation factor* ; CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité ; ESCRT : *Endosomal sorting complexes required for transport* ; GAPDH : *Glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase* ; HSC : *Heat shock cognate* ; HSP : *Heat shock protein* ; ICAM : *Intercellular adhesion molecule* ; LAMP : *Lysosome associated membrane protein* ; MUC1 : *Mucine-1* ; MVB : *Multivesicular bodies* ; PGK : *Phosphoglycérate kinase 1* ; RAB : *Ras-related proteins* ; Rho GDI : *Rho GDP dissociation inhibitors* ; Tfr : *Transferrin receptor* ; TSG101 : *Tumor susceptibility gene 101* ;

A. Protéines

On retrouve de nombreuses protéines différentes (**Tableau 2**), dont les protéines de transport membranaire et de fusion, mais aussi celles du cytosquelette, des protéines du métabolisme, de signalisation ou encore de transport cellulaire (Ibrahim et Marbán, 2016; Vlassov *et al.*, 2012). Les protéines les plus fréquemment retrouvées sont les tétraspanines (CD63, CD9, CD81, CD82), des glycoprotéines lysosomales (*Lysosomal associated membrane protein* : LAMP-1 et 2B), des protéines de la biogenèse des MVB (ALIX, TSG101), des protéines de choc thermique (*Heat shock protein* : HSP60,70, 27, 90), des CMH, ou encore des protéines de trafic cellulaire RAB (*Ras-related protein*) (Liu et Su, 2019).

Par ailleurs on y associe diverses enzymes dont les GTPases et des enzymes du métabolisme (péroxydases, pyruvate kinase, kinases et émolase) (Mathivanan *et al.*, 2012). Toutes ces protéines ont pour origine cytosol, la membrane plasmique ou endosomale (Boriachek *et al.*, 2018). Certaines jouent un rôle dans la biogenèse des exosomes et se retrouvent abondamment dans ces derniers. Elles peuvent donc servir de marqueurs pour les identifier (TSG101, ALIX, CD63, CD81)(Y. Zhang *et al.*, 2019).

Tableau 2 : Composition protéique des exosomes et fonctions biologiques associées (adapté de Y. Zhang *et al.*, 2019)

Famille de protéines et description	Exemples
Tétraspamines	CD9,CD63,CD81,CD82,CD37,CD53
Protéines de choc thermique	HSP90,70,27,60
Adhésion cellulaire	Intégrines, lactadhérine, ICAM-1
Présentation antigénique	CMH-I et CMH-II
Biogénèse corps multi-vésiculaires	TSG101, ALIX, Vps, RAB
Transport membranaire	LAMP 1/2, CD12, régulateur PG-like
Signalisation	GTPase HRas, Protéines Ras, ERK, SHP2, inhibiteur de dissociation du GDP, Synténine-1, protéines 14-3-3, RhoA
Composants du cytosquelette	Actines, Cofiline-1, Moésine, Myosine, Tubulines, Erzine, Radixine, Vimentine
Synthèse protéique et transcription	Histones(1,2,3), protéines ribosomiales, ubiquitine, MVP
Enzymes métaboliques	Acides gras synthase (FAS), Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, Phosphoglycérate kinase 1, phosphoglycérate mutase 1, pyruvate kinases, ATP citrate lyase, ATPase, glucose-6-phosphate isomérase, peroxyrédoxine 1, aspartate aminotransférase, aldéhyde réductase
Trafic membranaire et fusion	RAB (5/7), annexines (I, II, IV, V, VI), SNAP, dynamine syntaxine-3
Antiapoptotiques	ALIX, thiorédoxine, peroxydase
Facteurs de croissance et cytokines	TNF- α , récepteurs TNF et TGF- β
Récepteurs de mort programmée	Ligand Fas, ligand <i>Tumor Necrosis Factor</i> (TNF)
Transporteur de fer	Tfr

Alix : ALG-2 interacting protein ; CD : Cluster of Differentiation ; CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité ; ERK : Extracellular signal-regulated kinases ; HRas : Harvey rat sarcoma virus GTPase ; HSP : Heat Shock Protein ; ICAM : Intercellular adhesion molecule ; LAMP : Lysosome associated membrane protein ; MVP : Major vault protein ; RAB : Ras-related protein ; SHP : Src 2 homology 2 domain phosphatase ; SNAP : Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein ; Tfr : Transferrin receptor ; TGF : Transforming growth factor ; TNF : Tumor necrosis factor ; TSG : Tumor susceptibility gene 101 ; Vps : Vacuolar protein sorting-associated ;

B. Lipides

Les exosomes sont issus d'un remaniement de la membrane plasmique endosomale, il convient de s'interroger sur leur composition en lipides qui diffère de la composition de la membrane plasmique (Laulagnier *et al.*, 2004). Ils jouent un rôle dans le maintien de l'activité biologique par régulation du contenu lipidique (Trajkovic *et al.*, 2008). On retrouve du cholestérol, des sphingolipides, des phosphoglycérides, des céramides et des acides gras saturés (Théry *et al.*, 2002). La membrane des exosomes est relativement rigide et stable, ce qui explique en partie leur durée de circulation plus importante dans les fluides biologiques (Record *et al.*, 2014).

Outre la composition membranaire, les lipides sont aussi associés à des fonctions biologiques telles que le transport, la reconnaissance moléculaire ou l'internalisation (Subra *et al.*, 2010)(**Tableau 3**). On note par exemple la présence de prostaglandines ou de leucotriènes, des molécules intervenant dans la réaction inflammatoire.

Enfin, une fois l'exosome délivré à la cellule cible, ses composants lipidiques peuvent prendre part aux cascades moléculaires et favoriser des réactions métaboliques.

Tableau 3 : Composition lipidique des exosomes et fonctions biologiques associées (adapté de Y. Zhang *et al.*, 2019)

Catégorie de lipide	Enzymes associées	Fonctions
LTA4, LTB4, LTC4	Hydrolase LT4, Synthase LTC4	Ciblage de la migration leucocytaire
PGE2, 15d-PGJ2	COX-1, COX-2	Immunosuppression, PPAR γ ligand
PGE2	PGE synthase	Inflammation
PA	PLD2, DGK	Accroît la production exosomale
AA, LPC	cPLA2, iPLA2	Impliqué dans la courbure membranaire
/	sPLA2 IIA, sPLA2 V	Biosynthèse des prostaglandines
Céramides	nSMase 2	Tri du cargo exosomal et courbure
Cholestérol	/	Régulation de l'excrétion des exosomes
Phosphatidylsérine	/	Impliqué dans le devenir exosomal
Sphingomyéline	/	Cible de l'influx de calcium

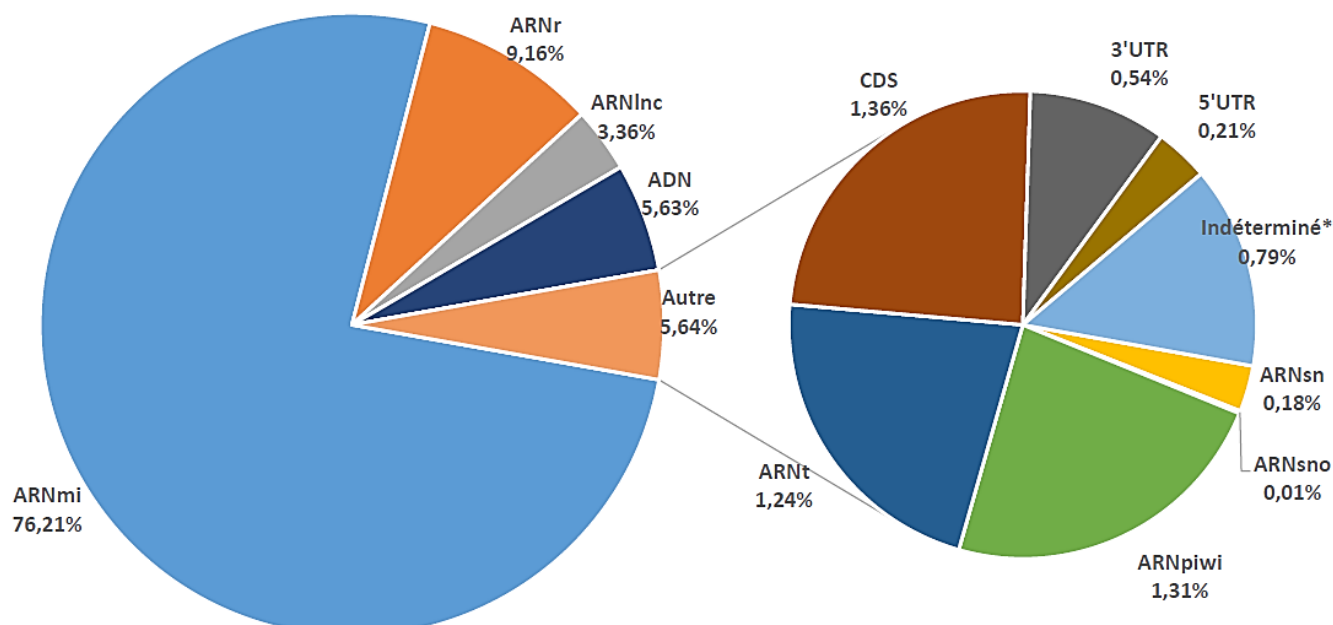
AA : Arachidonic acid ; COX : Cyclooxygenases ; DGK : Diglyceride kinase ; LTA/B/C : Leukotriene ; LPC : Lysophosphatidylcholine ; nSMASE2 : Neutral sphingomyelinase 2 ; MVB : Multivesicular bodies PA : Phosphatidic acid ; PGE2/PGJ2 : Prostaglandins ; PLD2/A2 : Phospholipase D2/A2 avec cPLA2/iPLA2 : calcium dependent/independant phospholipase A2 et sPLA2 IIA/V : secreted phospholipases IIA/V ; PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor gamma

C. Acides nucléiques

Les études portant sur les acides nucléiques sont nombreuses du fait de l'importance de ces molécules, supports de l'information génétique. Il a été montré que les exosomes transportent nombre d'ARN messagers (ARNm), de micro-ARN (ARNmi ou miR-), et autres ARN non codants (ARNnc)(Boriachek *et al.*, 2018; Colombo *et al.*, 2013)(**Figure 3**).

Les ARNnc correspondent à l'ensemble des ARN issus de la transcription de l'ADN mais qui ne seront pas traduits en protéines par la machinerie ribosomique. Ils interviennent toutefois à de nombreuses échelles dans la régulation de la synthèse protéique et/ou de la maturation des autres ARN. Parmi eux, on retrouve les ARNmi, les ARN ribosomiques (ARNr), les ARN de transfert (ARNt), les petits ARN nucléaires (ARNsn), les petits ARN nucléolaires (ARNsno), les longs brins d'ARN non codants (ARNlnc), et des ARN interagissant avec les protéines piwi (ARNpiwi).

Figure 3 : Composition en acides nucléiques des exosomes (d'après Huang *et al.*, 2013)



*La portion indéterminée correspond à la partie des ARN analysés qui n'appartiennent pas au génome humain, n'ont pas de correspondance dans la base d'études ou correspondant à des données artéfactuelles

ADN : Acide désoxyribonucléique ; ARNlnc : ARN long non codant ; ARNmi : micro-ARN ; ARNr : ARN ribosomal ; ARNsn : petit ARN nucléaire ; ARNsno : petit ARN nucléolaire ; ARNt : ARN de transfert ; CDS : séquence codante de l'ARN messenger, partie codante de gène composée d'exons ; UTR : Untranslated region, séquence non traduite ARN messenger

Les analyses de séquences ARN rapportent une grande prévalence des ARNmi qui représentent jusqu'à 42,3% des séquences lues et 76,2% des lectures cartographiables (Huang *et al.*, 2013). Les autres ARN comprennent de l'ARNr (9,2%), des ARNlnc (3,4%), de l'ARN piwi (1,3%), de l'ARNt (1,2%), des ARNsn (0,2%) et des ARNsno (**Figure 3**). L'étude de Huang portant sur 593 ARNmi rapporte la présence de 5 ARNmi très communs (miR-99a-5p, miR-128, miR-124-3p, miR-22-3p, and miR-99b-5p) qui comptabilisent 49% des séquences de ARNmi cartographiées.

L'observation d'une différence entre pool d'ARN exosomaux et pool d'ARN de la cellule parentale est en faveur d'une distribution sélective des ARN dans les exosomes (Skog *et al.*, 2008; Valadi *et al.*, 2007). Tous ces ARN peuvent être à l'origine de changements phénotypiques de la cellule de destination, et donc participer au développement de maladies (Mittelbrunn *et al.*, 2011; J. Zhang *et al.*, 2015).

Enfin, des controverses subsistent encore quant à la présence de brins d'ADN dans les exosomes mais l'observation et la confirmation de la présence d'ADN a été réitérée récemment (Spada *et al.*, 2020).

3. Biogenèse des exosomes

La voie de formation la plus classique passe par une double invagination de la membrane plasmique aboutissant à la formation des MVB, mécanisme piloté principalement par le complexe *Endosomal Sorting Complexes Required for Transport* (ESCRT) (Hanson et Cashikar, 2012).

A. Assortiment pré-vésiculaire

La première étape de la biogenèse repose sur une organisation du cargo pré-vésiculaire, avant même l'initiation de la formation des vésicules. La nature du contenu des vésicules est dépendante de la cellule dont elles sont issues (Kalra *et al.*, 2016), mais est aussi dépendante du statut physiologique ou pathologique de la cellule (Minciacchi *et al.*, 2015). La disponibilité des molécules régule également la détermination du cargo exosomal, et l'intégration des exosomes dans les différentes fonctions métaboliques. Certaines molécules favorisent directement la formation des MVB : par exemple, une surexpression du CMH-II est à l'origine d'une promotion de la production des MVB et du relargage de VE (Buschow *et al.*, 2009).

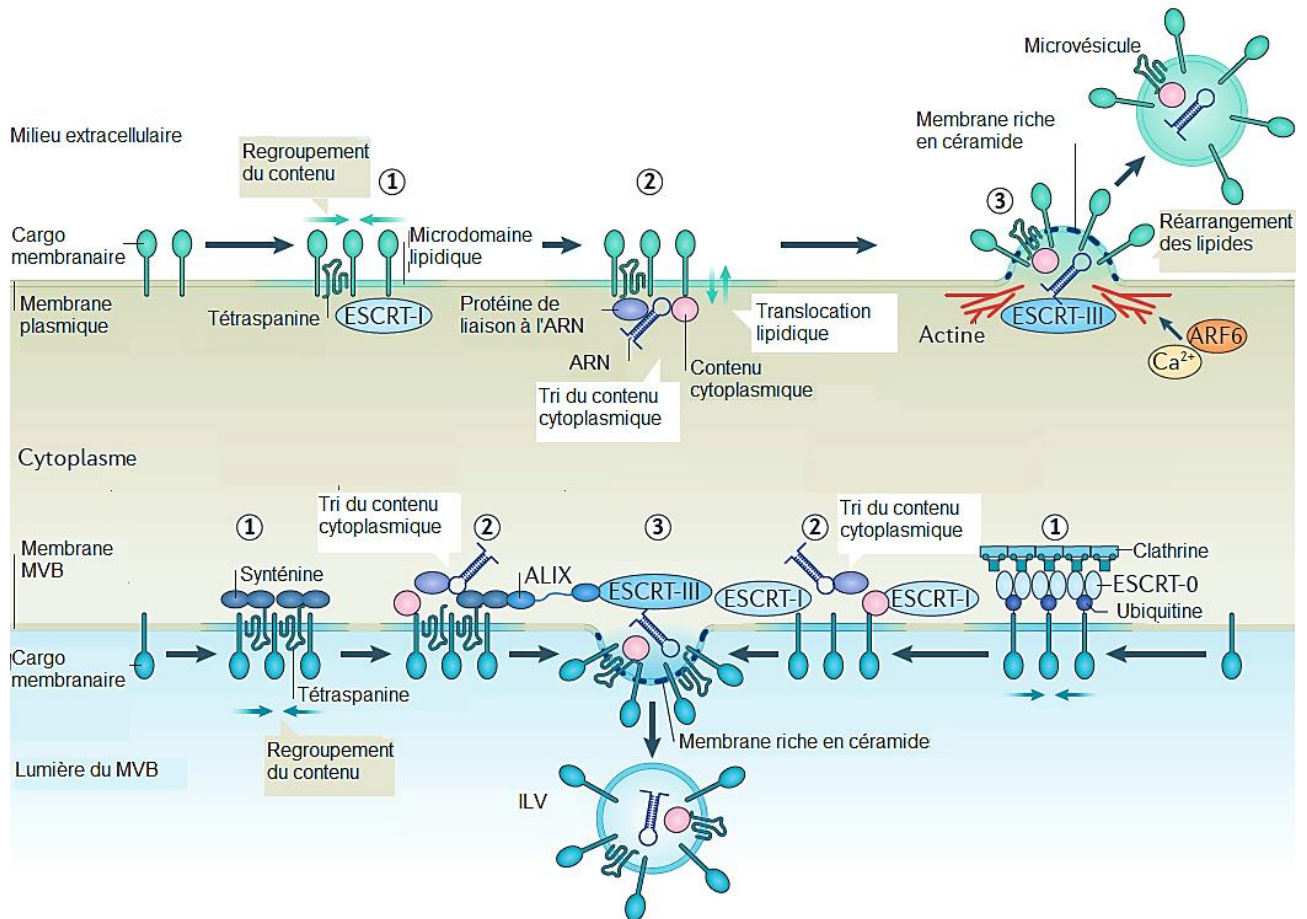
Les exosomes étant issus de la maturation des endosomes, leur contenu a souvent pour origine l'appareil de Golgi ou la membrane plasmique (Klumperman et Raposo, 2014). Les molécules préférentiellement destinées au recyclage se retrouvent donc dans les exosomes si la régulation de la machinerie lysosomale est altérée, comme c'est le cas des récepteurs à transferrine dans les réticulocytes (Vidal *et al.*, 1997). De fait toute modification des mécanismes impliqués dans la voie endosomale peut potentiellement impacter l'adressage du contenu exosomal. Selon ce principe, la synténine, agissant à la fois sur le recyclage (Zimmermann *et al.*, 2005) et dans le processus de tri du syndécane vers les MVB (Baietti *et al.*, 2012) est un candidat à la régulation du tri du contenu en amont.

Les différences de biogenèse entre microvésicules et exosomes se retrouvent dans la complexité des étapes nécessaires à leur formation. Les processus de tri du cargo se déroulent à proximité de microdomaines de la membrane plasmique (**Figure 4**).

B. Voies ESCRT dépendantes

La biogenèse exosomale comme micro-vésiculaire passe par trois phases : une première phase de ségrégation du cargo et de concentration à proximité des domaines membranaires (1), suivie d'une étape de tri et de fixation des différents composants (2) et enfin une phase de formation des vésicules (3).

Figure 4 : Biogenèse des vésicules extracellulaires (d'après van Niel *et al.*, 2018)



ARF6 : ADP ribosylation factor 6 ; ALIX : ALG2 interacting protein ; ESCRT : Endosomal sorting complexes required for transport ; ILV : Intraluminal vesicles ; MVB : Multivesicular bodies

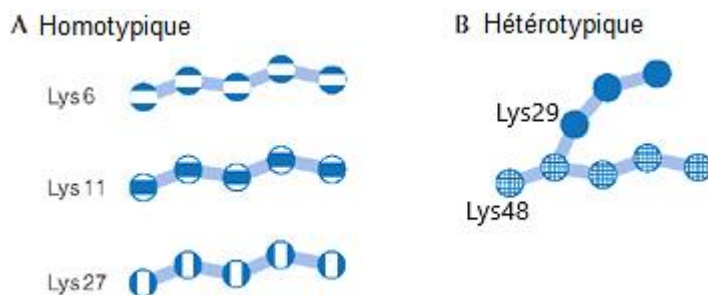
a. Complexe ESCRT

L'implication de la machinerie ESCRT dans le bourgeonnement et la scission de la membrane endosomale est une découverte relativement récente (Hurley, 2008).

Il s'agit d'un complexe protéique formé de quatre sous-unités ESCRT-0, I, II, III, qui fonctionnent en coopération pour faciliter la formation des MVB, le bourgeonnement vésiculaire et le tri des protéines intraluminales (Henne *et al.*, 2011; Hurley, 2015). Les sous-unités ESCRT-0 et ESCRT I regroupent le cargo transmembranaire ubiquitylé sur des microdomaines de la membrane des MVB. Ils recrutent, par l'intermédiaire d'ESCRT-II, le complexe ESCRT-III, à l'origine de l'invagination et de la fission des microdomaines. L'action du complexe ESCRT repose en grande partie sur l'état d'ubiquitination des molécules (Moreno-Gonzalo *et al.*, 2018).

L'ubiquitine est un polypeptide de 76 acides aminés dédié au marquage des protéines destinées à la dégradation par le protéasome (Kravtsova-Ivantsiv et Ciechanover, 2012). Cependant on rapporte la présence de nombreuses protéines ubiquitylées dans les exosomes (Huebner *et al.*, 2016). Cette observation paradoxale repose sur un système de codage de l'ubiquitine (Moreno-Gonzalo *et al.*, 2018). Elle possède sept groupements lysines en position 6, 11, 27, 29, 33, 48 et 63, qui peuvent servir de base pour une association en une chaîne, formant un polymère homo- ou hétérotypique, selon la position de la liaison (**Figure 5**). La dénomination des polymères se fera selon la position du groupement lysine (K) de fixation.

Figure 5 : Modèle de polymérisation des chaînes d'ubiquitine (d'après Ikeda et Dikic, 2008)



Ainsi certaines chaînes sont plus souvent associées aux exosomes (K63) alors que d'autres sont plutôt associées à la dégradation par le protéasome (K48). La polymérisation des chaînes d'ubiquitines serait à l'origine d'une hétérogénéité structurale et donc d'une variabilité des propriétés associées à l'ubiquitine.

De plus, il apparaît que la dé-ubiquitination des protéines est une étape importante pour l'incorporation de certaines protéines dans les exosomes, puisque l'unité ESCRT-III est capable de recruter des protéines déubiquitinases. En effet le silencing de ces protéines (c'est-à-dire la désactivation du gène codant la protéine) est associé à une augmentation de la dégradation par voie lysosomale (McCullough *et al.*, 2006; Row *et al.*, 2006).

Le système de marquage lié à l'ubiquitine est complexe et la compréhension du codage des chaînes d'ubiquitines et de leurs fonctions associées permettra de mieux assimiler son rôle dans l'importation des protéines exosomales.

Différentes études se sont appliquées à démontrer l'action des composants de la machinerie ESCRT dans les mécanismes de biogenèse.

Ainsi Tamai et son équipe ont montré que la protéine HRS, sous-unité de ESCRT0, est nécessaire dans la formation des exosomes et leur sécrétion. Les cellules dendritiques appauvries en HRS présentent une sécrétion exosomale diminuée, ainsi qu'une activité présentatrice d'antigène réduite (Tamai *et al.*, 2010). ESCRT-0 possède des domaines de liaison à l'ubiquitine, ce qui lui permet de trier les protéines ubiquitylées dans les MVB (Ren et Hurley, 2010). Par ailleurs cette sous-unité agit en interaction avec la clathrine (Henne *et al.*, 2011). La sous-unité HRS entraîne le recrutement de ESCRT-I par interaction avec sa sous-unité TSG101. ESCRT-I avec ESCRT-II vont ensuite activer le complexe ESCRT-III. La sous-unité CHMP4 de ESCRT-III permet l'assemblage oligomérique qui promeut le bourgeonnement endosomal. Par ailleurs CHMP4 intervient dans le recrutement de ALIX, ce qui permet de stabiliser l'ensemble du complexe. Une fois la scission effectuée, ESCRT-III nécessite l'action de l'ATPase *Vps4* pour se dissocier de la membrane (Henne *et al.*, 2011; Villarroya-Beltri *et al.*, 2014).

Un criblage par ARN interférant (ARNi) ciblant de nombreux composants de la machinerie ESCRT a permis de révéler ces différents rôles parmi les membres du complexe. Leur inactivation affecte l'efficacité de la sécrétion ou la composition des vésicules. Les différentes sous-unités peuvent agir de manière sélective sur les MVB destinés à l'exocytose (Colombo *et al.*, 2013).

Toutefois, les expériences s'appuyant sur le silencing de gènes du complexe ESCRT ont permis de mettre en évidence que d'autres procédés entrent en compte dans la biogenèse exosomale (Stuffers *et al.*, 2009).

b. Synténine/syndécane et ALIX

Des interactions existent entre la voie de formation classique ESCRT et d'autres protéines accessoires telles que la synténine ou la protéine ALIX, qui relie les cargo et la sous-unité de ESCRT-III (Baietti *et al.*, 2012). En interaction avec d'autres protéines du complexe ESCRT (TSG101 et CHMP4), ALIX participe au bourgeonnement et à la scission de la membrane endosomale ainsi qu'à la sélection du cargo en corrélation avec le complexe synténine/syndécane (Villarroya-Beltri *et al.*, 2014).

Les syndécanes sont des protéines membranaires qui interagissent avec une protéine cytosolique, la synténine, créant ainsi un complexe synténine-syndécane. Ce complexe est ensuite en liaison avec ALIX et la tétraspanine CD63 grâce à des domaines spécifiques LYPXnL. On observe en effet par extinction des gènes de la synténine, une réduction des taux de protéines ALIX et CD63 et du nombre d'exosomes libérés (Baietti *et al.*, 2012). Ce mécanisme dépend par ailleurs de la présence de la GTPase ARF6 (Ghossoub *et al.*, 2014).

c. Protéine SIMPLE

On rapporte une autre protéine impliquée dans la formation des exosomes. En étudiant la maladie de Charcot, il a été montré que la surexpression de la protéine membranaire associée au lysosome (SIMPLE) entraîne une augmentation de la libération d'exosomes et l'accumulation de ALIX et CD63 (Zhu *et al.*, 2013). De la même manière, l'inactivation du gène codant pour cette protéine dans des fibroblastes de souris mutées montre une diminution du nombre d'exosomes observés.

d. Acidification des corps multi-vésiculaires

Une acidification progressive tout au long de la voie d'endocytose est nécessaire à la dégradation et au recyclage des composants du cytosol (Scott et Gruenberg, 2011). Ainsi une modification du pH des MVB pourrait réduire leur dégradation et augmenterait la proportion d'exosomes libérés dans le milieu. Une expérience mimant cet effet en réduisant l'activité d'une enzyme transporteuse de protons a entraîné une réduction du recyclage lysosomal (Guo *et al.*, 2017). L'acidification des MVB pourrait donc impacter le recyclage et favoriser la sécrétion d'exosomes.

C. Voies ESCRT indépendantes

La formation des exosomes peut aussi se faire par des voies ESCRT indépendantes. Des études s'appuient sur la diminution des composants des quatre complexes ESCRT, ce qui n'empêche pas la formation des MVB (Stuffers *et al.*, 2009).

a. Céramides

Cette synthèse passe par le recrutement de microdomaines lipidiques en radeau participant à la séparation du cargo exosomal dans la membrane endosomale (Airola et Hannun, 2013).

Elle requiert la formation de céramides, ce qui fait intervenir la *neutral sphingomyelinase type II* (nSMASEII) permettant ainsi l'hydrolyse de la sphingomyéline en céramide (Trajkovic *et al.*, 2008). Les céramides permettent la formation de sous-domaines spécifiques, ce qui imposerait une courbure spontanée de la membrane (Goñi et Alonso, 2009).

Par ailleurs, le céramide est métabolisé en sphingosine 1-phosphate, capable d'activer son récepteur G inhibiteur associé, qui semble essentiel dans l'assortiment du cargo à l'intérieur des MVB (Kajimoto *et al.*, 2013). En effet la voie de signalisation induite par le sphingosine-1-phosphate impacte fortement la production des MVB marqués CD63+. Ce mécanisme souligne le rôle clé des céramides et de leurs métabolites dans la biogenèse exosomale (Castro *et al.*, 2014).

b. Tétraspánines

Les microdomaines enrichis en tétraspánines sont retrouvés de manière ubiquitaire dans les cellules, et sont spécialisés dans la compartimentation des récepteurs membranaires et des protéines de signalisation (Perez-Hernandez *et al.*, 2013). De par leur disposition transmembranaire ils forment mécaniquement des plateformes dynamiques avec les composants cytosoliques, ce qui joue un rôle dans l'assortiment des microdomaines (Charrin *et al.*, 2014).

La tétraspánine CD63, particulièrement enrichie à la surface des exosomes, est impliquée dans le tri endosomal dans les mélanocytes (Theos *et al.*, 2006; van Niel *et al.*, 2011) et dans la biogenèse des exosomes fibroblastiques de patients atteints du syndrome de Down (Gauthier *et al.*, 2017).

De la même manière CD81, 82, et CD9 jouent un rôle direct dans le tri de différentes molécules à l'intérieur des exosomes (Buschow *et al.*, 2009; Chairoungdua *et al.*, 2010).

c. Modifications post-traductionnelles

Des modifications spécifiques comme la farnésylation de certaines protéines entraîneraient leur ségrégation dans les exosomes (Luhtala *et al.*, 2017). La farnésylation permet le couplage d'un groupement farnésol (C₁₅H₂₆O) sur l'acide aminé cystéine d'une protéine, cet ajout ayant pour particularité de rendre la protéine hydrophobe. Cette propriété facilite notamment l'attache membranaire. De la même manière, de nombreuses autres modifications post traductionnelles interviennent dans les mécanismes de formation des exosomes (Moreno-Gonzalo *et al.*, 2018).

Hormis les protéines, les VE transportent de nombreux acides nucléiques, dont des ARN (Nolte-'t Hoen *et al.*, 2012; Valadi *et al.*, 2007) et des séquences ADN (Spada *et al.*, 2020). On a montré que les ARN sont triés différemment selon la présence de motifs spécifiques (Villarroya-Beltri *et al.*, 2013). On retrouve dans le **Tableau 4** un ensemble de mécanismes de tri associés aux motifs de nucléotides et aux ARN :

- Les complexes d'*Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins* (hnRNP) (J. Zhang *et al.*, 2015) reconnaissent des motifs appelés EXO-motifs qui permettent de fixer les ARN et de les adresser aux MVB. On y retrouve notamment deux molécules, hnRNPA2B1 (Villarroya-Beltri *et al.*, 2013) et SYNCRIP (Santangelo *et al.*, 2016). Ces deux protéines de la famille des hnRNP possèdent plusieurs domaines de reconnaissance de l'ARN différents, pouvant chacun fixer un ensemble d'ARNmi.
- Les séquences 3'UTR (régions non traduites terminales) de certains ARNm les destinent au contenu exosomal (Batagov et Kurochkin, 2013)
- Le complexe *miRNA-induced silencing* agissant avec la protéine AGO2 (McKenzie *et al.*, 2016)
- Les protéines de liaisons à l'ARN, comme les protéines de voûte majeures (Teng *et al.*, 2017) et la protéine *Y box binding 1* (Shurtleff *et al.*, 2016).
- Les protéines membranaires comme Vps4A et nSMASE2. Une augmentation de la protéine Vps4A conduisant à une augmentation du niveau de certains ARNmi (Wei *et al.*, 2015).

- Une voie impliquant des radeaux lipidiques se fixant à l'ARN est décrite (Janas *et al.*, 2015). Ces *rafts* lipidiques présentent des domaines de liaison correspondant à des séquences de 10 ou 11 EXO-motifs d'ARN.

Tableau 4 : Tri du contenu en ARN exosomal sur la base de motifs endogènes spécifiques (d'après Wei *et al.*, 2021)

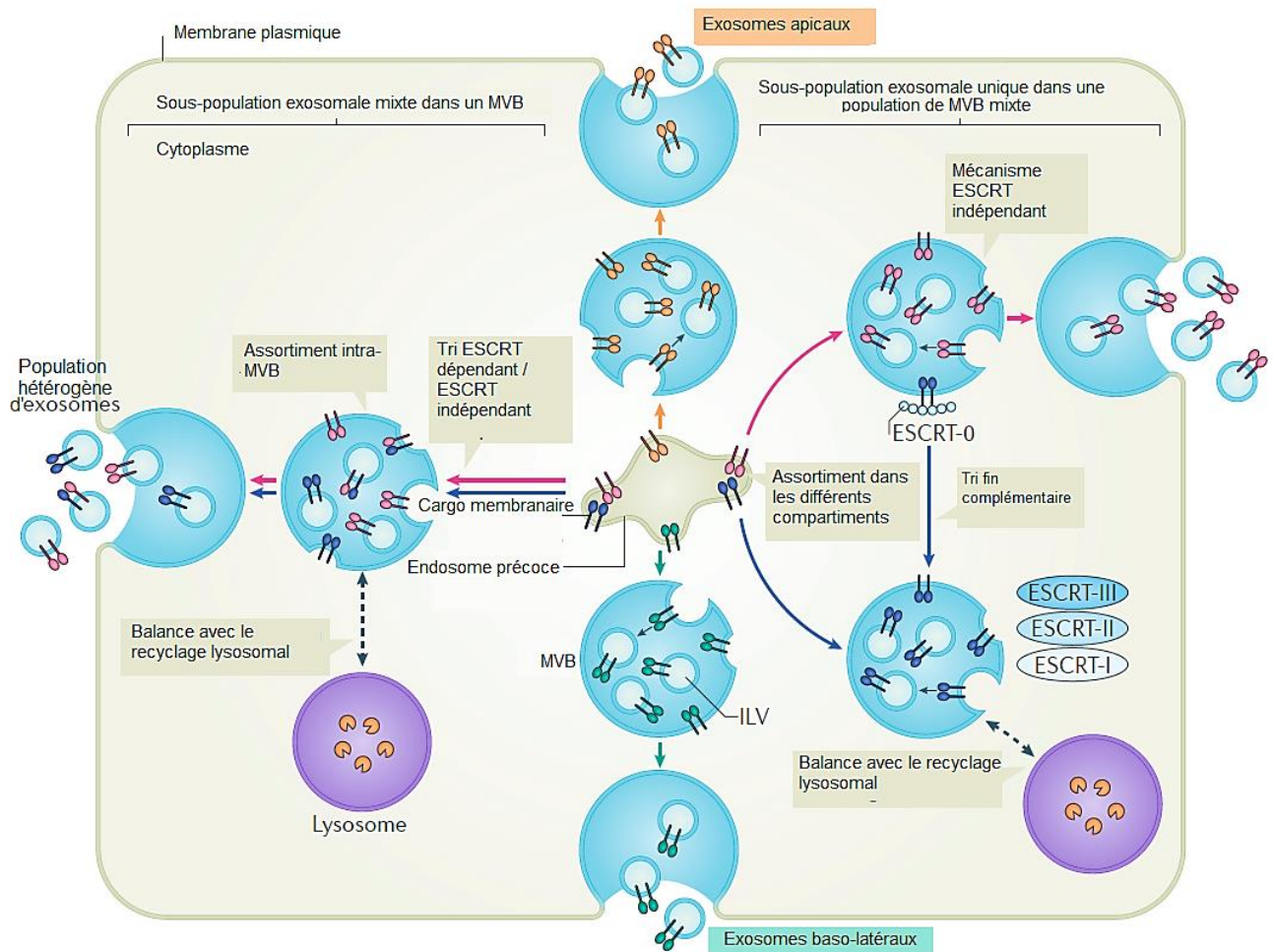
Groupe	Motif-EXO	ARNm	ARNmi	Autres ARNnc
hnRNP	hnRNPA2B1	GGAG	miR-654-5p ; miR-520e ; miR-520b ; miR-451 ; miR-671-5p ; miR-1226 ; miR-422a ; miR-193b ; miR-198 ; miR-601 ; miR-1224-5p ; miR-125b-1 ; miR-125a-3p ; miR-483-5p ; miR-583 ; miR-630 ; miR-513c ; miR-513b ; miR-513a-p ; miR-188-5p ; miR-887 ; miR-575 ; miR-765 ; miR-134 ; miR-877 ; miR-1225-5p ; miR-638 ; miR-135a ; miR-769-3p ; miR-339-3p ; miR-939	
		AGG/UAG	miR-17 ; miR-93	
		GGAG/UGCA	miR-198 ; miR-601	
		/	miR-503	
	SYNCRIP	GGCU	miR-6237 ; miR-409-3p ; miR-6337 ; miR-692 ; miR-144-5p ; miR-369-3p ; miR-379-5p ; miR-300-3p ; miR-410-3p ; miR-412-5p ; miR-127-5p ; miR-381-3p ; miR-5108 ; miR-144-3p ; miR-8095 ; miR-223-3p ; miR-6981-5p ; miR-122-5p ; miR-493-5p ; 127-3p ; miR-3470a ; miR-194-2-3p	
	hnRNPA1	GUUG	miR-198 ; miR-522 ; miR-320 ; miR-196a	
	GUCG	miR-582-5p		
	GACG	miR-1246		
3'UTR			miR-486-5p ; miR-143-3p ; miR-101-3p	
	CTGCC		miR-1289	
miRISC (Ago2)			miR-451 ; miR-150 ; miR-142-3p ; miR-100 ; miR-320a ; let-7a	
Protéines membranaires	Vps4A		miR-27b-3p ; miR-92a-3p ; miR-92a ; miR-150 ; miR-193a-3p	
	nSmase2		miR-320a ; miR-132-3p ; miR-210 ; miR-16 ; miR-146a	
Protéines de liaison à l'ARN	YB-1	ACCAGCCU	pré-ARNm	
		CAGUGAGC	SEPT14	
		UAAUCCCA		
				miR-223 ; miR-133
		Motif oligo-G		miR-144 ; miR-233 (Négative)
	NSUN2	CAGUGAGC	ARNm	
	MEX3C			miR-451a
	MVP			miR-193a
protéine La			miR-122	
MTR4				
Annexine 2				
Autres voies		3 GCCG, 2 UGAC, 2 UCCG, GGAC, GGCG, UGCC	séquence de liaison ARN 67-2	
		3 GCCG, 2 UGAC, 2 UGCC, GGAC, GGCG, CCCG, GGCC	séquence de liaison ARN 10	

Ago2 : Argonaute 2 protein ; hnRNP : heterogeneous nuclear ribonucleoprotein ; MEX3C : Mex-3 RNA binding family member C ; miRISC : micro-RNA-induced silencing complex ; MVP : Major vault protein ; nSMASE 2 : neutral sphingomyelinase 2 ; NSUN 2 : NOP2/Sun domain family member 2 ; SYNCRIP : Synaptotagmin-binding, cytoplasmic RNA-interacting protein ; Vps : Vacuolar sorting-associated protein ; YB-1 : Y-box binding protein 1

La biogenèse exosomale est donc dépendante du cargo, du type cellulaire et sous l'influence de nombreux signaux, physiologiques comme pathologiques.

Les données sont plutôt en faveur d'un modèle très complexe et varié, permettant la formation et la coexistence à un moment donné d'une population hétérogène de vésicules intraluminales à l'intérieur d'une population hétérogène de MVB (Colombo *et al.*, 2014). L'équilibre entre les différents processus de sélection est à l'origine de la multitude d'exosomes circulants (Buschow *et al.*, 2009) (Figure 6).

Figure 6 : Origine de la diversité des exosomes (d'après van Niel *et al.*, 2018)



ESCRT : endosomal sorting complexes required for transport ; ILV : Intraluminal vesicles ; MVB : Multivesicular bodies

4. Sécrétion

Après la phase de biogenèse, les MVB doivent encore être acheminés jusqu'à la membrane plasmique et fusionner avec elle pour libérer les exosomes.

A. Recyclage ou sécrétion

Certaines études s'intéressent à l'équilibre entre recyclage et sécrétion, notamment dans le cadre de certaines maladies neurodégénératives. Par inhibition de l'activité lysosomale, il serait possible de réduire les dépôts amyloïdes dans le cadre de la maladie d'Alzheimer et de limiter leur accumulation intracellulaire en favorisant la sécrétion exosomale (Eitan *et al.*, 2016). La surexpression de la tétraspanine 6 dans ce cadre entraîne un ralentissement de la dégradation lysosomale (Guix *et al.*, 2017).

On observe par exemple que la protéine TSG 101 peut subir une modification post traductionnelle. Cette modification consiste en un couplage du groupement codé par le gène *Interferon-stimulated 15* et d'une lysine de la protéine TSG101. Elle a pour effet de réduire la sécrétion exosomale au profit de sa dégradation (Villarroya-Beltri *et al.*, 2016).

Par ailleurs, si l'état ubiquitylé d'une protéine peut l'adresser au recyclage lysosomal, les mécanismes ubiquitine-indépendants (donc plutôt ESCRT-indépendants) sont plutôt à l'origine de MVB sécrétants (Buschow *et al.*, 2009; van Niel *et al.*, 2006). La régulation de la sécrétion exosomale semble s'effectuer sur la base de la machinerie impliquée : l'intervention du complexe syndécane-synténine-ALIX semble être spécifiquement dédiée à la formation de MVB sécrétants (Baietti *et al.*, 2012). Les mécanismes de régulation de l'équilibre entre recyclage et sécrétion restent difficiles à considérer dans leur ensemble ; toute modification de la machinerie lysosomale peut impacter la biogenèse exosomale.

B. Transport des corps multi-vésiculaires et protéines RAB

Les processus de transport intracellulaire impliquent généralement le cytosquelette (actine et microtubules), ainsi que les molécules motrices (myosines, dynéines et kinésines) et des activateurs associés (RAB GTPases) (Bonifacino et Glick, 2004; Cai *et al.*, 2007).

On a montré que la sécrétion exosomale, au moins dans le cadre de la présentation antigénique, se réalise de manière orientée dans les cellules vers la synapse immunologique (Buschow *et al.*, 2009; Mittelbrunn *et al.*, 2011), ainsi la sécrétion des MVB suit le réseau de microtubules selon leur orientation depuis le centrosome (Mittelbrunn *et al.*, 2015).

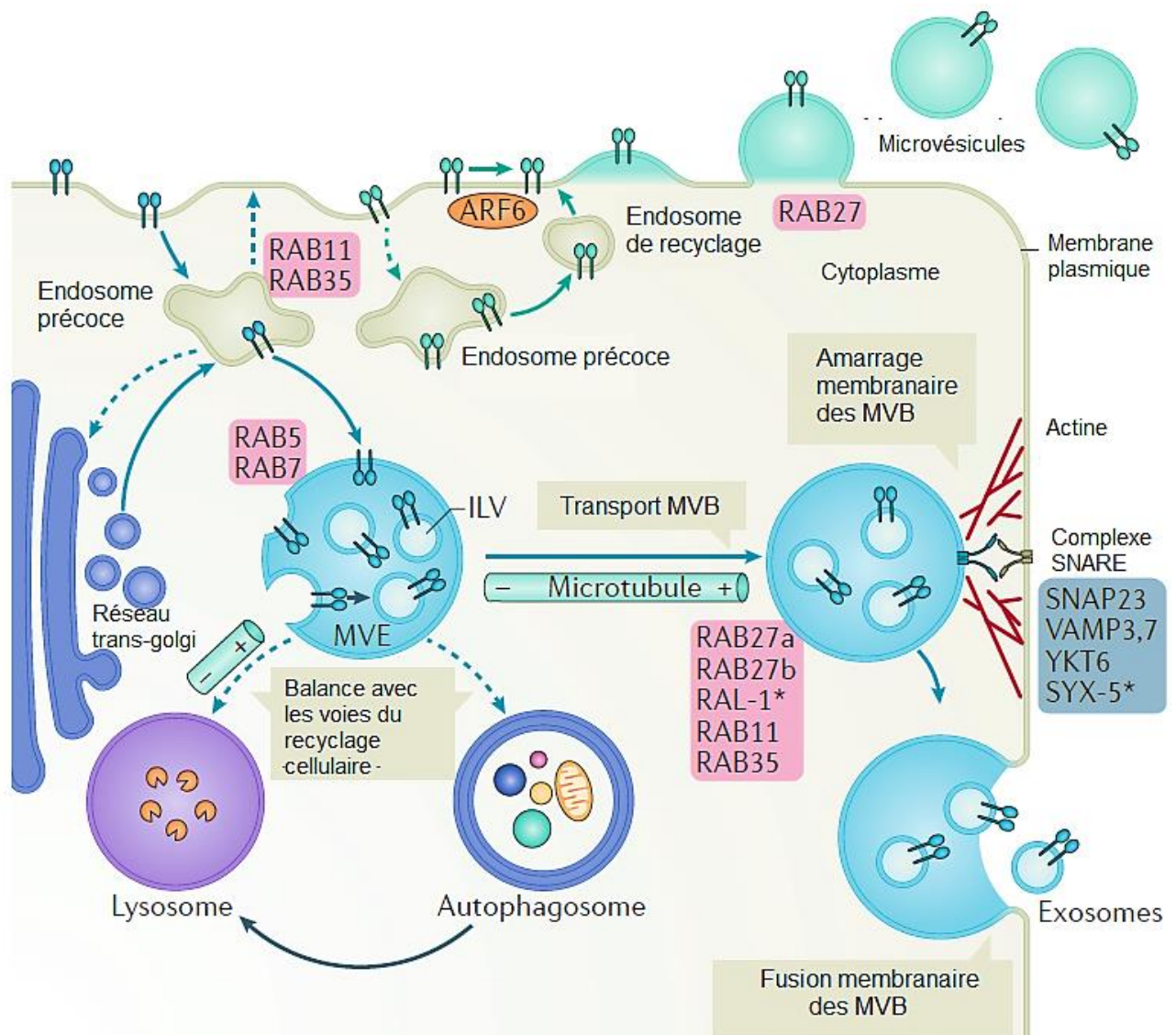
Des études ont visualisé l'action dans le trafic intracellulaire vésiculaire de plusieurs protéines RAB (Sönnichsen *et al.*, 2000). On a montré que RAB27A et RAB27B ainsi que leurs effecteurs sont essentiels dans la sécrétion exosomale (Ostrowski *et al.*, 2010). RAB27B régule la motilité des MVB vers la membrane et les deux isoformes jouent sur l'étape d'amarrage à la membrane. On sait que RAB27A implique un réarrangement du cytosquelette d'actine sous-membranaire (Sinha *et al.*, 2016). Toutefois les isoformes de RAB27 ne sont pas distribuées de manière ubiquitaire, ce qui implique que chaque type cellulaire adapte potentiellement la machinerie impliquée.

Une étude de Rocha (2009) a montré que l'adressage des MVB vers les lysosomes passe par un transport rétrograde sur les microtubules, transport initié par RAB7 qui permet le recrutement de dynéine. Pourtant RAB7 est aussi impliqué dans la sécrétion exosomale, puisque d'autres études rapportent une stimulation de l'excrétion des exosomes lorsque cette protéine est surexprimée (Baietti *et al.*, 2012). Cette dualité paradoxale repose sur le

statut ubiquitylé de RAB7, qui selon son état sera à l'origine d'un recrutement de la machinerie destinant les MVB au recyclage ou à la sécrétion (Song *et al.*, 2016).

La variabilité des molécules impliquées est importante, d'autres protéines RAB, comme RAB11 et RAB35 interviennent dans le transport des MVB (Hsu *et al.*, 2010; Savina *et al.*, 2005). L'inactivation des gènes codant pour ces protéines aboutit à l'apparition de phénotypes d'exosomes anormaux et à une réduction de leur sécrétion (Baietti *et al.*, 2012; Hsu *et al.*, 2010; Savina *et al.*, 2005). Les protéines RAB interviennent à de multiples niveaux comme on peut l'observer sur la **Figure 7**. Elles sont actrices du transport intracellulaire dès la formation des endosomes dans la cellule.

Figure 7 : Schéma récapitulatif des mécanismes impliqués dans le transport et la fusion membranaire des corps multi-vésiculaires (d'après van Niel *et al.*, 2018)



ARF6 : ADP ribosylation factor 6 ; ILV : Intraluminal vesicles ; MVB/MVE : Multivesicular bodies/endosomes ; RAB/RAL : Ras related protein ; SNAP : Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein ; SNARE : SNAP Receptor ; SYX-5 : Syntaxin-5 ; VAMP : Vesicle-associated membrane protein ;

C. Fusion membranaire et protéines SNARE

L'acheminement des MVB vers la membrane plasmique étant effectué, la fusion membranaire et la libération des exosomes font intervenir un autre complexe protéique, le complexe *Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor* ou SNARE. Cette famille de protéines est à l'origine des principaux mécanismes de trafic et de fusion membranaire au sein des cellules eucaryotes (Jahn et Scheller, 2006).

Les complexes sont généralement formés de 3 à 4 protéines regroupées en un complexe hélicoïdal sur la membrane plasmique, généralement une seule R-SNARE (protéine vésiculaire) et trois Q-SNARE (protéine de la membrane cible) (Pfeffer, 2007). Les R-SNARE compte notamment les synaptobrévines (famille des *vesicle associated membrane protein* VAMP), les Q-SNARE exosomales comptent notamment les syntaxines et les protéines SNAP. Cet assemblage hélicoïdal est associé à une autre famille de protéines, les synaptotagmines, qui modulent l'activation du signal de fusion membranaire.

Fader (2009) a démontré l'implication de deux R-SNARE du complexe (VAMP3, VAMP7) dans la fusion des MVB de certaines cellules (lignée leucémique K562). Par ailleurs, le calcium intervient dans la régulation de la sécrétion exosomale en activant le changement de conformation du complexe et sa fusion (Raposo *et al.*, 1997; Savina *et al.*, 2005). En effet, il a été montré que le complexe SNARE VAMP7/SNAP23/syntaxine-4/synaptotagmine VII est impliqué de manière fonctionnelle dans la fusion des lysosomes, par fixation du Ca^{2+} sur la synaptotagmine (Rao *et al.*, 2004). L'implication de ce complexe pour les MVB a été confirmée dans une étude sur des exosomes issus de lignées tumorales (Bebelmann *et al.*, 2018).

De nombreuses protéines SNARE sont impliquées, comme l'homologue de la synaptobrévine *Ykt6* (Gross *et al.*, 2012) ou encore la syntaxine-5 étudiée chez le ver *Caenorhabditis elegans* (Hyenne *et al.*, 2015).

Cette diversité est à nouveau le reflet d'une régulation complexe et d'une variabilité cellulaire.

5. Méthodes d'études

Comme cité au I.1, un consensus d'experts s'est formé afin d'établir des lignes directrices concernant l'étude des VE. Si l'une des missions de l'ISEV est d'établir des critères de différenciation, ainsi qu'une nomenclature, son objectif principal est d'établir des modalités d'études des VE et donc par extension des exosomes.

Parmi les méthodes considérées, l'ultracentrifugation est à l'heure actuelle le *gold standard* pour l'étude des exosomes, mais de nouvelles techniques font leur apparition (Zarovni *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2018). Il est important de noter que toutes les méthodes actuellement utilisées ne permettent pas d'obtenir de prélèvements complètement purifiés. Il est nécessaire de développer des techniques d'isolement suffisamment avancées pour pouvoir optimiser la purification des exosomes, de manière rapide, efficace, reproductible, applicable à la clinique (Raposo et Stoorvogel, 2013; Zaborowski *et al.*, 2015)

Le MISEV propose de suivre des recommandations afin de mettre en place des conditions expérimentales optimisées, et de standardiser la collecte des données. Il est fortement conseillé d'utiliser des méthodes combinées (Théry *et al.*, 2018).

A. Méthodes d'isolement

On peut retrouver des comparatifs entre les différentes techniques dans le **Tableau 5**. On observe notamment que parmi les nouvelles techniques, certaines semblent très prometteuses, comme l'utilisation des nano-filtres acoustiques, ou de certains kits commerciaux, qui présentent des rendements et des taux de purification intéressants. Un comparatif précis des différentes méthodes est complexe à réaliser du fait de la grande variabilité des milieux étudiés et des conditions expérimentales mises en œuvre.

Tableau 5 : Approche comparative des techniques d'isolement des exosomes (d'après Doyle et Wang, 2019)

Technique d'isolement	Rendement	Pureté	Volume échantillon	Temps de procédure
Ultracentrifugation différentielle (UC)	5-25%	Faible	100x quelques mL	8h
Centrifugation à gradient de densité	> UC	Faible	Jusqu'à 1mL	20h
Kits de précipitations	Pas de données	Faible	>100µL	1 nuit ≈ 10h
Kits de microfluidique par immuno-affinité Exo-Chip	Pas de données	Pas de données	<400µL	<2h
Immunoprécipitation	>99% des billes magnétiques	Plus élevée que UC	Jusqu'à 1mL	1 nuit ≈ 10h
Kits de microfluidique par immuno-affinité ExoSearch	42-97%	Plus élevée que UC	20µL	40 minutes
Nanofiltre acoustique	>80%	Elevée	50µL	<30 minutes

a. Ultracentrifugation

- *Différentielle*

L'isolement par centrifugation différentielle est la première méthode employée historiquement et reste le *gold standard* (Zarovni *et al.*, 2015).

La séparation des différents composants du milieu s'effectue par différence de densité, de taille et de forme, avec les particules les plus denses qui sédimentent en premier (Livshits *et al.*, 2015). On peut retrouver différents protocoles dans la littérature.

Le principe, comme son nom l'indique, est de réaliser plusieurs centrifugations successives à vitesse croissante (**Figure 8**). En augmentant le degré de centrifugation par paliers, on peut ainsi séparer les débris cellulaires et les plus grosses vésicules des plus petites.

Il est possible par ailleurs d'améliorer les rendements en augmentant la durée de centrifugation à vitesse élevée, avec le risque toutefois d'une possible dégradation des échantillons (Cvjetkovic *et al.*, 2014; Zeringer *et al.*, 2015).

L'avantage est que cette méthode est peu coûteuse et abordable techniquement, mais elle présente l'inconvénient d'être chronophage, peu spécifique, et nécessite des échantillons relativement importants (Zaborowski *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2018).

- *A gradients de densité*

A la différence de l'ultracentrifugation différentielle, cette méthode utilise une matrice avec un gradient de densité préétabli, comme du sucre ou de l'iodoxinol (Li *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018). Le prélèvement est placé en haut du tube avec sa matrice. Les éléments

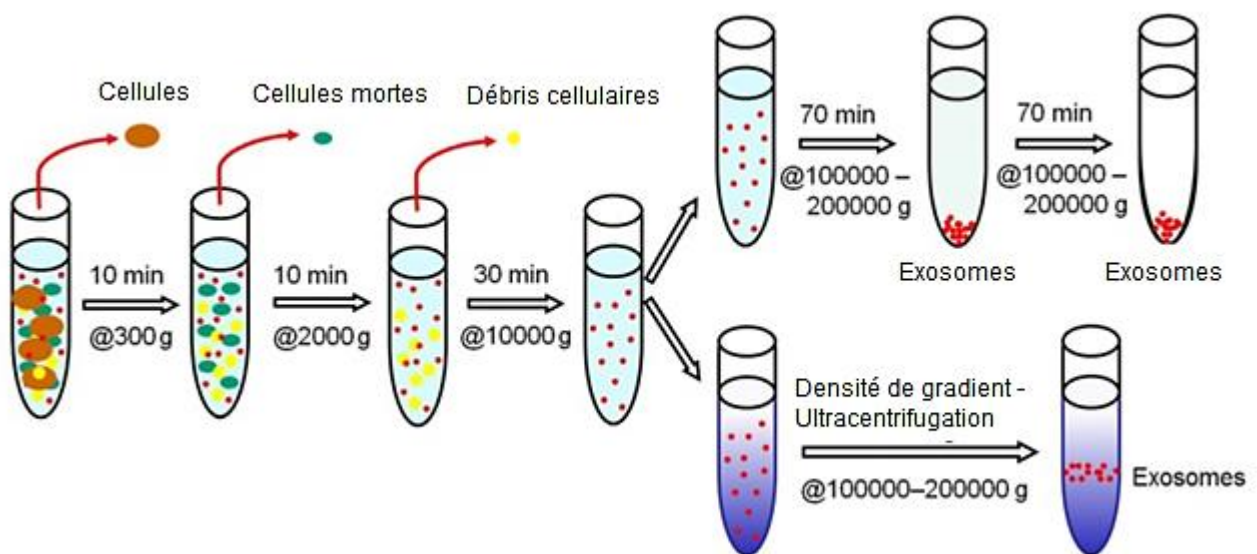
les plus denses se retrouveront plus bas dans le tube (**Figure 8**). Les exosomes sont ensuite collectés pour une fraction entre 1,1 et 1,2 g/ml de densité (Li *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018).

Cette méthode présente l'avantage d'être très efficace dans la séparation des VE par rapport aux agrégats protéiques et autres particules, et particulièrement pour séparer les VE des fluides biologiques. Elle souffre toutefois d'un faible rendement qui peut être amélioré en couplant ultracentrifugation différentielle et à densité de gradient, là encore au prix d'un temps de préparation plus long et d'un risque de dégradation des échantillons plus élevé (Simons et Raposo, 2009; Tauro *et al.*, 2012).

Deux méthodes sont décrites (Li *et al.*, 2017) :

- Une méthode dite zonale, pour laquelle les éléments les plus denses vont sédimenter le plus rapidement dans le tube, mais à travers des milieux de gradients de densité discontinus. Cette technique favorise notamment la séparation des éléments de densités similaires mais de tailles différentes.
- Une méthode dite isopycnique, où le prélèvement est mélangé à un ensemble de solutés avec des densités variables ; c'est une technique à gradient de densité continu. Les éléments se séparent par couches et ne sédimenteront pas jusqu'au fond du tube d'analyse.

Figure 8 : Exemple de protocole de centrifugation différentielle et à gradient de densité (d'après Li *et al.*, 2017)



b. Isolement par taille

- *Ultrafiltration*

Cette technique repose sur une séparation par taille grâce à une membrane, et un *cut-off* de poids moléculaire (Li *et al.*, 2017). Les particules les plus grosses sont filtrées par une membrane, créant ainsi deux compartiments. Le défaut de cette technique réside dans la proportion de particules qui va rester piégée dans le filtre et donc réduire le rendement de la collecte (Liga *et al.*, 2015). On peut utiliser des filtres successifs par taille décroissante, mais au détriment du rendement (Zhang *et al.*, 2018).

Cette technique est moins chronophage que l'ultracentrifugation et ne demande pas beaucoup de matériel, mais on s'expose encore au risque de lyse des vésicules et donc de contamination (Zeringer *et al.*, 2015). Des kits commerciaux décrits comme plus adaptés à la clinique existent, ils utilisent ce principe de filtrations successives, et permettent de conserver un filtrat entre 20 et 200 nm de diamètre (F. Liu *et al.*, 2017).

- *Filtration séquentielle*

La filtration séquentielle fonctionne comme le principe de filtration classique ci-dessus. Une première filtration à diamètre de 100 nm permet de filtrer les particules larges et rigides ; les exosomes et microvésicules, plus déformables, pourront tout de même traverser le filtre. La seconde étape de flux tangentielle, avec un *cut-off* de poids moléculaire de 500 kDa, permet de retirer les protéines solubles et autres contaminants (Heinemann *et al.*, 2014). Enfin une dernière étape de filtration est effectuée pour enrichir l'échantillon.

L'avantage de cette méthode consiste en l'automatisation du processus, et la production de matériel exosomal biologiquement actif et intact, ce qui permet une transposition pour des études cliniques (Heinemann *et al.*, 2014).

- *Chromatographie par exclusion de taille*

Le principe est le même que pour la séparation de protéines. L'échantillon traverse une colonne présentant une porosité suffisante pour les petites particules, qui seront ralenties, causant une séparation plus tardive dans la colonne. On y associe généralement une ultracentrifugation dans un premier temps (Gámez-Valero *et al.*, 2016).

C'est une technique qui préserve très bien la structure des vésicules et leur intégrité. Le problème réside dans sa durée d'exécution relativement longue, sa difficulté d'étalonnage et son faible débit (Gámez-Valero *et al.*, 2016). Certaines compagnies proposent toutefois des kits commerciaux reposant sur cette technique et qui présenteraient des bons résultats en termes de rapidité et d'efficacité (Vogel *et al.*, 2016).

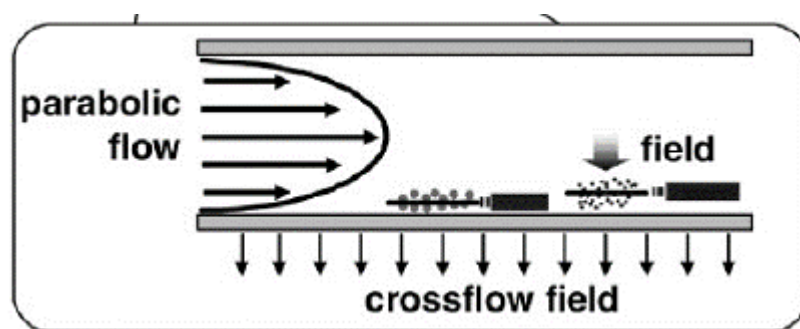
- *Dialyse par filtration hydrostatique*

Afin d'obtenir une alternative viable à l'ultracentrifugation, on utilise le principe de la dialyse. Cette technique utilise une faible pression hydrostatique afin de forcer le passage du solvant et des petits solutés (*Cut-off* de poids moléculaire à 1000 kDa) dans un tube à dialyse, afin de conserver les VE (Musante *et al.*, 2014).

- *Fractionnement par couplage flux-force*

Cette technique repose sur l'utilisation d'un champ perpendiculaire appliqué sur l'écoulement de l'échantillon dans une chambre linéaire (**Figure 9**). Les particules les plus grandes sont influencées plus fortement par le champ perpendiculaire à l'écoulement ; elles se retrouvent donc en périphérie du flux parabolique, et s'écoulent plus tardivement. On récolte ainsi d'abord les éléments les plus petits (Kang *et al.*, 2008). Différents sous-types de la technique existent et sont mis en application pour l'étude des VE. On y associe des techniques de caractérisation spécifiques en un système complètement intégré, qui permet ainsi d'avoir une analyse des particules bien plus rapide (Li *et al.*, 2017).

Figure 9 : Représentation schématique du fonctionnement de la technique de fractionnement par couplage flux-force (Li *et al.*, 2017)



Le flux parabolique est moins important à proximité des parois de la chambre.

Les particules les plus importantes sont plus sensibles au champ perpendiculaire, elles restent proches des parois et s'écoulent moins rapidement

c. Affinité immune

Les techniques reposant sur l'affinité immunitaire utilisent la fixation d'anticorps dirigés contre les antigènes exprimés sur les exosomes (Zhang *et al.*, 2018). Sur la base de l'identification d'un marqueur purement spécifique aux exosomes, il serait alors possible de les isoler des autres VE avec certitude (Zeringer *et al.*, 2015).

La limite de cette technique est liée à son avantage, à savoir qu'on ne peut que cibler des antigènes de surface et que le ciblage est réduit à l'anticorps utilisé (Li *et al.*, 2017). Le rendement associé est moindre, avec toutefois un meilleur taux de purification. On les utilise alors plutôt en couplage avec l'ultracentrifugation et l'ultrafiltration (Mathivanan *et al.*, 2010).

- *ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay*

Une microplaque recouverte d'un anticorps permet de fixer un antigène spécifique, et donc les potentielles vésicules associées.

La technique ELISA est utilisée pour séparer les exosomes des milieux biologiques comme l'urine ou le plasma, mais elle est surtout appliquée d'un point de vue clinique pour l'identification de certaines maladies infectieuses (Doyle et Wang, 2019). Sa transposition à une utilisation clinique pour l'isolement des exosomes reste sommaire.

- *Immunoprécipitation magnétique*

Le principe est le même que la technique ELISA, sauf que les anticorps choisis sont fixés sur des billes magnétiques, ce qui permet d'augmenter la surface de fixation et donc d'augmenter le rendement. Par ailleurs cette technique permet la prise en charge de volumes d'échantillons plus importants que la technique ELISA.

Elle présente plusieurs avantages par rapport aux techniques classiques ; elle donne en effet un meilleur taux de purification, est moins chronophage et permet de préserver l'activité exosomale (Zarovni *et al.*, 2015)

d. Précipitation

- *Précipitation induite par le polyéthylène glycol (PEG)*

Le PEG est un composé hydrophile, qui va entraîner la précipitation des particules de l'échantillon par fixation des molécules d'eau. Le précipité obtenu peut ensuite être traité par centrifugation pour mener les analyses en aval (Zeringer *et al.*, 2015).

Cette technique présente l'avantage d'être rapide, simple à mettre en place et ne nécessite que peu d'équipement (Zhang *et al.*, 2018), au détriment d'un grand manque de

sélectivité au niveau du précipité obtenu : le précipité est un mélange grossier de VE et d'agrégats protéiques (Zeringer *et al.*, 2015).

- *Précipitation induite par la lectine*

C'est une alternative à l'utilisation du PEG. La lectine est capable de fixer les composés glucidiques de surface des exosomes, causant ainsi une précipitation après une période d'incubation prolongée (Doyle et Wang, 2019). Les avantages et inconvénients restent les mêmes que la précipitation par PEG.

e. Microfluidique

La microfluidique permet de palier les problèmes de transposition des techniques classiques à la clinique. Il s'agit en effet de réduire à très petite échelle l'échantillon étudié en utilisant des canaux micrométriques et en appliquant des principes de mécanique des fluides. Il est possible d'isoler les exosomes sur des critères physiques et biochimiques de manière simultanée, avec des rendements élevés et de faibles volumes d'échantillons (10 échantillons de 100 µl) (Li *et al.*, 2017).

- *Filtration nanométrique acoustique*

Cette technique permet la séparation à très faible échelle des VE par taille. Une chambre composée de l'échantillon est exposée à des ultrasons, ce qui entraîne la migration des particules par taille et par densité (Lee *et al.*, 2015).

Cette méthode reste encore très récente, mais permet d'isoler les exosomes facilement, avec une ajustabilité importante et de faibles volumes.

- *Filtration microfluidique par affinité immune*

On transpose le principe de l'ELISA à échelle nanométrique. Il est possible de réduire grandement le volume et le temps de la procédure (10 échantillons de 100 µl en 60 minutes) sans prétraitement (He *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2016).

Des micropuces sont d'ores et déjà commercialisées, et utilisent par exemple des anticorps anti-CD63 comme marqueurs exosomaux (Zhao *et al.*, 2016). Les techniques de microfluidiques représentent un fort enjeu pour les techniques d'isolement, car elles ont un très bon équilibre avantage/inconvénients en termes de volumes, de temps, de coût, d'expertise et de traitement.

L'isolement des exosomes peut se réaliser en suivant différentes procédures, résumées au **Tableau 6**. Toutes ces techniques présentent à la fois avantages et inconvénients, en termes de coût, de facilité d'application, de portabilité, ou encore de spécificité. C'est l'utilisation des données d'analyse en adéquation avec l'objectif attendu (recherches fondamentales, applications en cliniques, essais cliniques, créations de bases de données) qui reste le meilleur indicateur de la technique à adopter.

Tableau 6 : Avantages et inconvénients des techniques d'isolement (d'après Zhang *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2017)

Technique	Principe	Avantages	Inconvénients
Ultracentrifugation	Séparation séquentielle par taille, densité et forme des particules et des solvants	Expertise technique faible, pas de pré-traitement nécessaire, peu onéreux	Chronophage ; Potentielle dégradation et contamination de l'échantillon ; faible purification de l'échantillon
Isolement par taille	Séparation par taille uniquement avec utilisation d'un cut-off de poids moléculaire	Ultrafiltration : Rapide, nécessite peu de matériel, bonne portabilité Filtration séquentielle : Préservation du matériel biologique	Ultrafiltration : Risque de lyse vésiculaire et de perte de rendement par agrégats sur la membrane
		Chromatographie : Taux de purification élevé, préservation de l'intégrité vésiculaire ; reproductibilité	Chromatographie : Chronophage, faible débit, et rendement moyen, nécessité d'étalonner
Précipitation	Modification de la solubilité des particules en utilisant des polymères	Facilité d'utilisation, peu d'équipement spécifique, volume d'échantillonnage variable, rapide, rendement élevé	Manque de sélectivité important et nécessite d'un pré/post-traitement - Faible purification
Immuno-affinité	Ciblage de marqueurs antigénique à la surface des exosomes	Très bon rendement d'isolement, bonne purification	Coût des réactifs, nécessité d'avoir un marqueur spécifique, faible capacité et faible débit - Potentiels artefacts et erreurs de lecture liés à l'immunogénicité tumorale
Microfluidique	Isolement à échelle micrométrique selon des propriétés multimodales	Rapide, peu coûteux, portative, automatisable	Défaut de standardisation et manque de bases de données - Nécessité d'une validation des procédures

B. Méthodes de caractérisation

La caractérisation des exosomes et autres VE se faisait auparavant sur la base de la concentration protéique (Zaborowski *et al.*, 2015). Toutefois, en considérant les risques de contamination des échantillons et la variabilité des types de VE, il est nécessaire de s'appuyer sur d'autres méthodes. On distingue deux types d'analyses : les études physiques et biochimiques. La complexité de la caractérisation des VE repose en partie sur la variabilité des profils protéomiques qui dépend des méthodes d'isolement et de la souche cellulaire étudiée (Yáñez-Mó *et al.*, 2015).

a. Analyse physique

Les techniques dites d'analyse physique s'appuient sur la taille ou la concentration des particules dans l'échantillon.

- *Détection d'impulsions résistives accordables ou « Tunable Resistive Pulse Sensing »*

Cette méthode repose sur l'utilisation d'une cellule divisée en deux chambres par une nano-membrane non conductrice (Maas *et al.*, 2014). On place l'échantillon dans une chambre tandis que dans l'autre se trouve une solution d'électrolytes.

Lors de l'application d'un potentiel électrique, les particules traversent la membrane, mais il existe une résistance liée au courant électrique. Or il est possible de déduire la taille des particules traversant la membrane en étudiant cette résistance, comparativement à des courbes de calibration. Sur une période donnée, on obtient aussi des informations concernant la concentration particulaire du milieu (Maas *et al.*, 2014).

- *Suivi individuel des particules par « Nanoparticle Tracking Analysis »*

Cette méthode s'appuie sur l'application d'une formule scientifique, l'équation de Stokes-Einstein, qui lie le coefficient de diffusion des particules et leur mouvement brownien dans une chambre pour déterminer la taille des particules. Ce mouvement est capté grâce à un laser et un microscope (Dragovic *et al.*, 2011). C'est un logiciel qui traite ensuite l'image pour déterminer les caractéristiques de l'échantillon en termes de taille et de concentration (Dragovic *et al.*, 2011).

Cette méthode permet le suivi de particules entre 10 et 1000 nm de diamètre (Doyle et Wang, 2019). L'inconvénient étant toutefois qu'il faut obtenir des échantillons de 0,5 ml, et qu'il manque à l'heure actuelle d'optimisation des données de collecte et des paramètres d'analyse (Filipe *et al.*, 2010; Palmieri *et al.*, 2014).

- *Diffusion de lumière dynamique ou « Dynamic Light Scattering »*

Le principe est assez similaire au suivi individuel de particules. On mesure cette fois les fluctuations de l'intensité lumineuse pour estimer la taille des particules (Filipe *et al.*, 2010; Palmieri *et al.*, 2014). L'avantage est que cette analyse plutôt facile d'application nécessite de faibles volumes (70 µl) et ne demande pas d'optimisation avancée de ses paramètres.

L'inconvénient c'est l'analyse de mélanges hétérogènes : en effet les plus petites particules sont difficiles à détecter ce qui produit un biais en faveur de particules plus grandes. On préférera donc le suivi individuel à la diffusion de lumière dynamique pour l'analyse d'un échantillon hétérogène (Palmieri *et al.*, 2014).

- *Microscopie électronique*

On utilise deux méthodes de microscopie en général pour l'étude des VE. La microscopie électronique à transmission ou la microscopie électronique à balayage. La différence entre les techniques repose sur la population d'électrons décomptée : la

transmission comptabilise les électrons transmis à travers l'échantillon alors que le balayage compte les électrons dispersés par l'échantillon (Doyle et Wang, 2019). La microscopie permettra ainsi d'obtenir un calque ou un négatif de l'échantillon.

Les deux techniques donnent des résultats similaires en termes de distribution de taille des particules, mais de légères disparités de morphologies (Wu *et al.*, 2015).

b. Analyse biochimique

- *Immunologie*

On applique le principe de détection immunitaire, avec reconnaissance de pics mono ou polyclonaux correspondant à un anticorps et son antigène. Dans le cas des exosomes, il s'agit de rechercher un marqueur spécifique connu ou des protéines d'intérêt. Trois techniques sont rapportées.

- La cytométrie de flux est une analyse couplant analyse physique et biochimique. Elle permet de réaliser des analyses quantitatives et de classer les exosomes sur la base de leur expression antigénique (Szatanek *et al.*, 2017). Le principe est de fixer des exosomes sur des billes et de les exposer à un anticorps couplé à un marqueur fluorescent.

Cette méthode présente des inconvénients, notamment la limite de taille de détection des particules mais aussi la nécessité d'avoir des particules uniques en suspension : Les agrégats diminuent fortement la précision de l'analyse (Szatanek *et al.*, 2017).

- Le principe du *Western Blotting* est transposable à l'étude des VE. Le *Western Blotting* étudie la composition protéique des vésicules avec une lyse préalable (Gallagher *et al.*, 2008). Les protéines sont ensuite séparées par une électrophorèse SDS PAGE et transférées sur une membrane spécifique. Cette membrane est ensuite exposée à une double reconnaissance antigène-anticorps avec marquage.

Elle fait partie des méthodes les plus utilisées car facile d'utilisation et accessible. L'inconvénient majeur réside dans le défaut de reproductibilité lié à la qualité de l'anticorps sélectionné.

- Enfin il est développé comme cité ci-dessus (I.5.a.e) des techniques de microfluidique qui allient à la fois isolement et analyse en réduisant l'échelle d'étude à celle de canaux micrométriques. Ces techniques utilisent une micro-puce pour fixer des antigènes ciblés afin de capturer les exosomes. Il existe des dispositifs qui permettent de les isoler dans un premier temps, et qui introduisent ensuite un tampon pour lyser les vésicules capturées (He *et al.*, 2014).

Ainsi les biomarqueurs d'intérêt, de surface comme intra-vésiculaires, peuvent ensuite être utilisés pour l'analyse. Cette technique permet d'élargir grandement le panel d'antigènes recherchés en permettant le ciblage de marqueurs à l'intérieur des vésicules.

- *Profilage par thermophorèse (Thermophoretic profiling)*

C'est une technique qui couple isolement et caractérisation. Elle s'appuie sur l'utilisation de la conjugaison avec des nucléotides aptamères (oligonucléotides synthétiques)(Liu *et al.*, 2019). Une incubation de l'échantillon avec la solution aptamérique est réalisée, puis une exposition à un laser à 1480 nm de longueur d'ondes. Les exosomes fixés s'accumulent alors au centre du point lumineux, ce qui permet des analyses de contenu protéique par fluorescence des aptamères conjugués (Liu *et al.*, 2019).

Cette méthode utilise très peu d'échantillon et ne nécessite pas de prétraitement. Elle est à la fois peu chronophage, fiable, reproductible et spécifique. Elle pourrait permettre une transposition efficace de l'étude en laboratoire des exosomes à l'application clinique.

- *Spectrométrie de masse : Analyse du protéome*

Les analyses de spectrométrie de masse permettent de détecter et d'identifier des molécules en étudiant le rapport masse/charge après ionisation dans une chambre. On obtient alors des spectres spécifiques à des molécules et à la méthode d'ionisation utilisée. Ces résultats sont ensuite comparés à une banque de données préexistantes et permettent d'obtenir des données quantitatives et qualitatives des molécules présentes dans l'échantillon étudié (Doyle et Wang, 2019). On applique deux approches dans le cadre de l'étude des exosomes.

L'approche globale du protéome permet la comparaison du spectre obtenu après l'analyse des ions les plus abondamment retrouvés dans l'échantillon ou de l'ensemble des ions sur un intervalle de masse donné. C'est une approche qui s'intéresse au relevé d'un maximum de protéines et à leur quantification dans l'échantillon (Doyle et Wang, 2019; Schey *et al.*, 2015).

L'avantage de ce procédé dans l'analyse des exosomes est qu'il permet notamment l'étude rapide d'une grande partie du protéome dans une population exosomale, ce qui est intéressant pour la recherche de biomarqueurs associés aux maladies, notamment cancéreuses.

L'approche ciblée du protéome s'attelle à l'analyse et la détection d'un ensemble défini de protéines dans l'échantillon (Schey *et al.*, 2015). On associe un certain nombre de signaux spécifiques sur le spectre de masse pour chaque protéine, ce qui permet d'obtenir des informations très précises sur l'ensemble des protéines ciblées.

Comparativement, l'approche ciblée est la technique de choix dans l'étude des exosomes car elle présente l'avantage de présenter une très bonne spécificité, et une grande multiplicité par rapport aux autres méthodes de caractérisation. Elle est d'autant plus indiquée que de plus en plus de marqueurs exosomaux sont rapportés dans la littérature (Schey *et al.*, 2015).

Deuxième partie : Applications fonctionnelles – diagnostiques - thérapeutiques

Les exosomes sont donc des vésicules au contenu moléculaire riche (protéines, acides nucléiques, lipides), qui peuvent transiter entre les cellules par sécrétion paracrine comme systémique. Ils représentent un enjeu capital dans la compréhension fine de la communication intercellulaire notamment du fait de leur capacité à transporter ARNm et ARNmi (Valadi *et al.*, 2007).

Ainsi, depuis deux décennies (voir **Figure 1**), la multiplication des études a permis de montrer qu'ils participent à de nombreux processus métaboliques comme la prolifération cellulaire, la réponse immunitaire, les fonctions neuronales ou cardiovasculaires, ou encore la lactation (Corrado *et al.*, 2013). Le cadre d'étude s'élargit de plus en plus et s'applique à de nombreux domaines médicaux.

1. Exosomes et physiologie

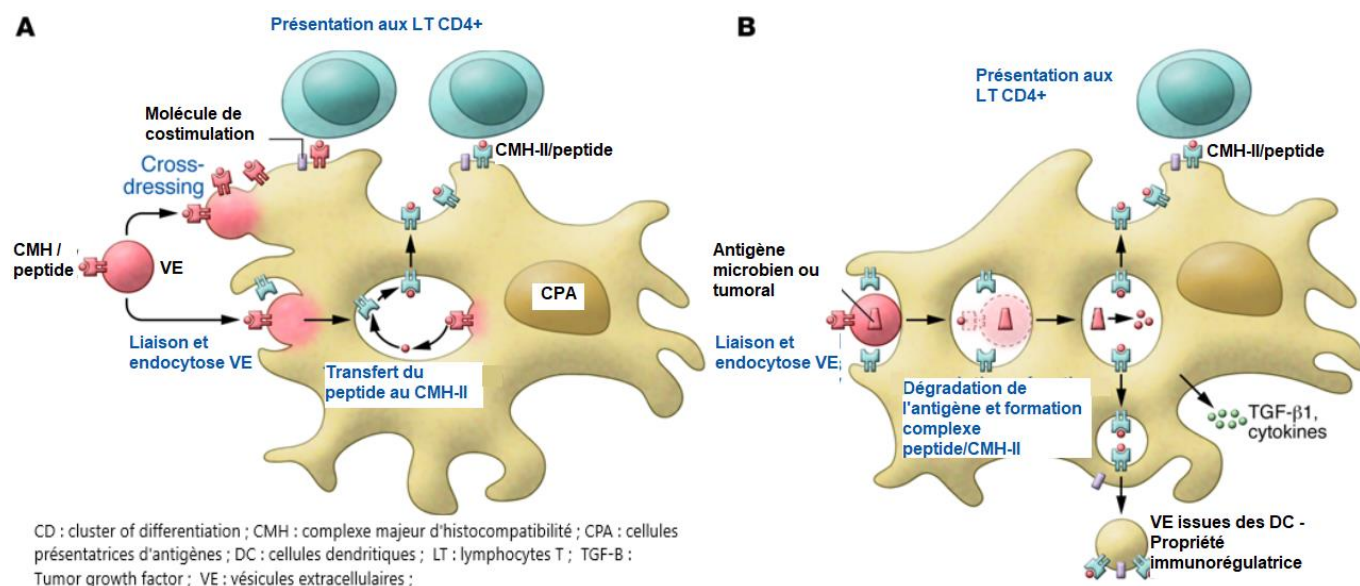
A. Immunité

Depuis 1996, il est rapporté que les exosomes sont impliqués dans le système immunitaire et présentent d'importantes fonctions, comme la présentation antigénique et la régulation de la réponse immunitaire (Raposo *et al.*, 1996). En effet les exosomes de lymphocytes B contiennent des CMH-I et II fonctionnels, et sont capables d'induire une réponse dépendante des lymphocytes T (Zitvogel *et al.*, 1998).

Par extension, on a montré que les VE dérivant des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) possèdent des marqueurs de surface en grande partie similaire aux cellules immunitaires : les CMH ou encore le marqueur de programmation de mort cellulaire PD-L1 (Robbins *et al.*, 2016). De plus on a observé que la libération d'exosomes est accrue après interaction entre CPA et lymphocytes T ce qui soutient l'implication des exosomes dans la réponse immunitaire (Buschow *et al.*, 2009; Nolte-'t Hoen *et al.*, 2009). A forte concentration, ils peuvent induire une réponse reproduisant la fonction présentatrice d'antigènes (Nolte-'t Hoen *et al.*, 2009).

La **Figure 10** décrit les différents mécanismes de présentation antigénique réalisés par l'intermédiaire des VE.

Figure 10 : Régulation immunitaire et vésicules extracellulaires (d'après Robbins *et al.*, 2016)



- Une présentation antigénique directe, le *cross dressing* : Les exosomes peuvent se lier à la membrane cellulaire des CPA qui fournit ainsi des molécules de costimulation. Le complexe CMH/peptide exosomal peut alors directement se fixer sur les récepteurs des lymphocytes T et entraîner l'activation des cellules de l'immunité (**Figure 10.A**)
- Une présentation indirecte par transfert de peptides : les exosomes peuvent être internalisés par la CPA. Le complexe CMH/peptide peut alors être dégradé ou recyclé par la CPA afin de réaliser la présentation antigénique aux lymphocytes T (**Figure 10.B**).

La présentation directe par les VE sans l'intermédiaire des CPA est possible. On a montré que des VE dérivant de CPA sont capables à haute concentration ou à forte charge peptidique d'accroître significativement l'activation de lymphocytes T (Hsu *et al.*, 2003; Qazi *et al.*, 2009). Toutefois leur capacité à stimuler directement les lymphocytes est 10 à 20 fois moins importante que la cellule parentale ce qui limite l'activation du système immunitaire de façon directe in vivo (Robbins et Morelli, 2014).

La libération exosomale semble dépendre de l'état mature ou immature des cellules dendritiques (DC) concernées (Segura *et al.*, 2007). Les exosomes dérivants de cellules immunitaires immatures présentent le même caractère « naïf » que les cellules parentales, et ne sont pas capables d'activer efficacement des lymphocytes T, probablement par défaut de molécules d'adhésion activatrices (ICAM-1, CD40, CD86)(Ludwig et Giebel, 2012; Robbins et Morelli, 2014).

Lors d'une infection, les DC en fixant les antigènes peuvent activer les lymphocytes T auxiliaires. Ce recrutement entraîne l'activation des lymphocytes B et ainsi une augmentation de la production et de la libération d'exosomes qui contiennent eux-mêmes des CMH. Ces exosomes peuvent ensuite stimuler le système CD4 régulateur en retour (Corrado *et al.*, 2013). Les exosomes peuvent agir dans l'équilibre inflammatoire sur les effecteurs T par induction d'une différenciation de lymphocytes T auxiliaires en lymphocytes T régulateurs (Corrado *et al.*, 2013).

On a montré par ailleurs que les exosomes peuvent être porteurs directement d'un peptide antigénique, microbien ou tumoral (Robbins *et al.*, 2016). Il résulte de ces situations différentes conséquences :

- L'antigène natif peut être absorbé par la CPA par endocytose et réutilisé pour réaliser une présentation antigénique aux lymphocytes CD8+ et ainsi induire des réponses antitumorales par exemple. On a montré que la vaccination chez des souris à l'aide d'exosomes tumoraux a permis d'induire une réponse antitumorale contre un ensemble de tumeurs portant un antigène similaire, réduisant ainsi le potentiel de la tumeur (Zitvogel *et al.*, 1998)
- La VE est porteuse de molécules immunomodulatrices, auquel cas, la métabolisation du peptide par la CPA peut aboutir à la formation de VE immunomodulatrices. Ces dernières peuvent entraîner une modification de la réponse immunitaire, bénéfique comme défavorable (**Figure 10.B**)

Concernant le domaine vétérinaire plus spécifiquement, on a montré chez des souris que l'utilisation de VE issues de macrophages infectés par *Mycobacterium bovis* favorise la résistance de la bactérie aux lymphocytes T. Au contraire les VE issues de DC exposées à *Toxoplasma gondii* sont capables de fournir une protection contre le parasite (Beauvillain *et al.*, 2007; Giri et Schorey, 2008). Les exosomes sont des acteurs du mécanisme de tolérance immunitaire (Zonneveld *et al.*, 2021) : ils peuvent à la fois agir en faveur ou en défaveur du système immunitaire.

Un des enjeux de la compréhension et de l'utilisation des exosomes en immunologie est de déterminer avec précision si l'utilisation d'une population exosomale constituerait un avantage ou un inconvénient pour la réponse immunitaire.

B. Reproduction

- Compétences reproductives

L'environnement nécessaire à la bonne maturation des ovocytes chez le chien nécessite une communication entre les cellules de l'appareil reproducteur. Lee et Saadeldin (2020) rapportent différentes propriétés des exosomes canins, dont la présence d'exosomes porteurs d'ARNmi dans le fluide de l'oviducte. Ces derniers pourraient contrôler la maturation des ovocytes en vue de la reproduction. On a montré que l'ajout d'exosomes prélevés dans l'oviducte augmente la mobilité des spermatozoïdes du sperme chez le chat, révélant l'effet positif des vésicules sur le potentiel reproducteur (Ferraz *et al.*, 2019).

Une équipe de chercheurs s'est intéressée à l'amélioration des propriétés des semences congelées pour la reproduction canine. Ils ont montré que la supplémentation post-décongélation des paillettes par des exosomes de cellules souches mésenchymateuses (MSC) de tissu adipeux accroît de manière significative la mobilité et la survie des spermatozoïdes. De plus, un prétraitement de la semence permettrait d'avoir un taux d'acrosomes intacts plus élevé, ainsi qu'une meilleure motilité et viabilité par rapport aux contrôles (Qamar *et al.*, 2019).

- Développement foetal

On a montré que les exosomes participaient activement à l'équilibre inflammatoire de l'interface foeto-maternelle au cours du développement embryonnaire (Kaminski *et al.*, 2019). L'inflammation est nécessaire localement à l'implantation du foetus et au modelage de la matrice tissulaire. Elle est ensuite réduite afin de permettre le développement embryonnaire, et redevient prédominante lors de la troisième phase du développement foetal (Fuhler, 2020).

Les exosomes dérivant des cellules de l'épithélium endométrial sont captés par le trophoblaste, ce qui permet d'augmenter son potentiel adhésif selon deux processus : par augmentation de l'expression de la *focal adhesion kinase* (Greening *et al.*, 2016) ; en induisant par l'intermédiaire d'ARNmi (miR-30d notamment) la surexpression de gènes d'adhésion embryonnaire (intégrines et cadhérines) (Vilella *et al.*, 2015).

La croissance trophoblastique dans les premiers stades d'implantation dépend en partie de l'inflammation locale : les exosomes dérivants du trophoblaste sont capables d'induire la différenciation des monocytes en macrophages, qui sécrètent des cytokines et chimiokines pour maintenir le contexte inflammatoire (Atay *et al.*, 2011). Il est capital toutefois que l'embryon soit protégé du système immunitaire de la mère. On a observé que les vésicules dérivées du placenta avaient un effet immunosuppresseur, la condition pro-inflammatoire du placenta n'impacte donc pas directement l'embryon.

Les exosomes trophoblastiques peuvent aussi induire la différenciation des lymphocytes T en T régulateurs, sous la médiation de *Heat shock protein 10kDa 1* (Czernek et Döchler, 2020). Par ailleurs, les cellules trophoblastiques et leurs exosomes expriment des équivalents particuliers de CMH humain : les molécules du complexe du *Human leukocyte antigen C* mais aussi moins classiquement les sous-types E, F et G. Cette combinaison particulière permet au trophoblaste d'échapper au système des lymphocytes T *Natural Killer* maternels (lymphocytes NK), contribuant à l'immunotolérance nécessaire au bon déroulement du développement foetal (Kaminski *et al.*, 2019).

Les exosomes agissent sur le maintien de l'équilibre du développement foetal en favorisant à la fois une action pro-inflammatoire et immunosuppressive.

- Lactation

On trouve des exosomes dans le lait de très nombreuses espèces, mais particulièrement dans le lait des animaux de rente et dans le lait humain, qui partagent jusqu'à 95% de leurs ARNmi (Cintio *et al.*, 2020; van Herwijnen *et al.*, 2018).

On a montré que les exosomes tenaient une place importante dans le transfert par le lait de certaines protéines et d'ARN, protégeant le bagage moléculaire de l'acidité gastrique et

permettant son absorption (Garcia *et al.*, 2013; Liao *et al.*, 2017). Les exosomes issus de la mère favorisent la viabilité des cellules intestinales, en accroissant leur prolifération et leur activité, et favorise les réactions immunomodulatrices (Chen *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2021).

Par exemple, certains ARN circulaires exosomaux (ARNcirc) retrouvés dans le colostrum jouent un rôle de promoteur vasculaire (favorise l'expression du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire VEGF) et induisent une prolifération et une migration des cellules épithéliales de l'intestin grêle. Les exosomes dérivés du lait maternel sont à l'origine d'une migration des cellules de l'épithélium gingival par remodelage du cytosquelette et de certaines kinases (Zonneveld *et al.*, 2021). On suppose d'autres effets de ces exosomes sur la régulation de certains récepteurs *toll-like*, et par inhibition sur des signaux apoptotiques (Zonneveld *et al.*, 2021).

Enfin Villatoro a montré la présence abondante d'exosomes dans le colostrum canin, pouvant interagir avec les MSC. Ils agissent par action antioxydante sur les fibroblastes, ce qui joue un rôle dans le développement du système respiratoire, protégeant le nouveau-né de nombreuses affections liées au stress oxydatif et aux espèces réactives de l'oxygène (Villatoro *et al.*, 2020).

C. Cellules souches et développement

Les MSC assurent un rôle dans la maintenance de l'homéostasie, en contribuant au renouvellement cellulaire selon les besoins de l'organisme (Goloviznina *et al.*, 2016). Leur distribution ubiquitaire assure une réponse aux modifications physiologiques ou pathologiques (R. C. Lai *et al.*, 2015).

Si le potentiel des MSC repose grandement sur leur capacité de différenciation, on a montré que les sécrétions associées, exosomales notamment, impactaient fortement leur rôle. Les exosomes interagissent de manière paracrine et endocrine (Maqsood *et al.*, 2020), leur endocytose étant facilitée dans les tissus endommagés par l'acidose du milieu.

Ces exosomes contiennent des facteurs de croissance (comme *Transforming growth factor* β : TGF- β ou encore *Hepatocyte growth factor* HGF) et des chimiokines anti-inflammatoires (IL-10, IL-1Ra), molécules immunomodulatrices parfois sécrétées en grande quantité par les MSC (Jimenez-Puerta *et al.*, 2020). Ces vésicules possèdent aussi un panel d'ARNmi (miR-21, 23a et 124) qui sont reconnus comme ayant une activité anti-inflammatoire et immunosuppressive (Salvioli *et al.*, 2006). Ainsi le sécrétome (l'ensemble des molécules sécrétées par une cellule) associé au MSC joue un rôle dans la réduction des effets apoptotiques et fibrosants, favorisant l'angiogenèse et la survie cellulaire (Tang *et al.*, 2021).

La capacité thérapeutique des exosomes a été testée dans différents modèles pathologiques, démontrant une capacité similaire voire supérieure aux MSC parentales, notamment dans la réduction de la taille des *infarcti* myocardiques (Lai *et al.*, 2010; L. Liu *et al.*, 2017), dans la cicatrisation cutanée (B. Zhang *et al.*, 2015), dans l'insuffisance rénale aigüe (van Koppen *et al.*, 2012), ou encore hépatique (Jiang *et al.*, 2018; Tan *et al.*, 2014).

D. Physiologie du système nerveux

Les exosomes dérivant de cellules cérébrales jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie du système nerveux central, et contribuent à la communication entre cellules nerveuses (Zhang et Yang, 2018).

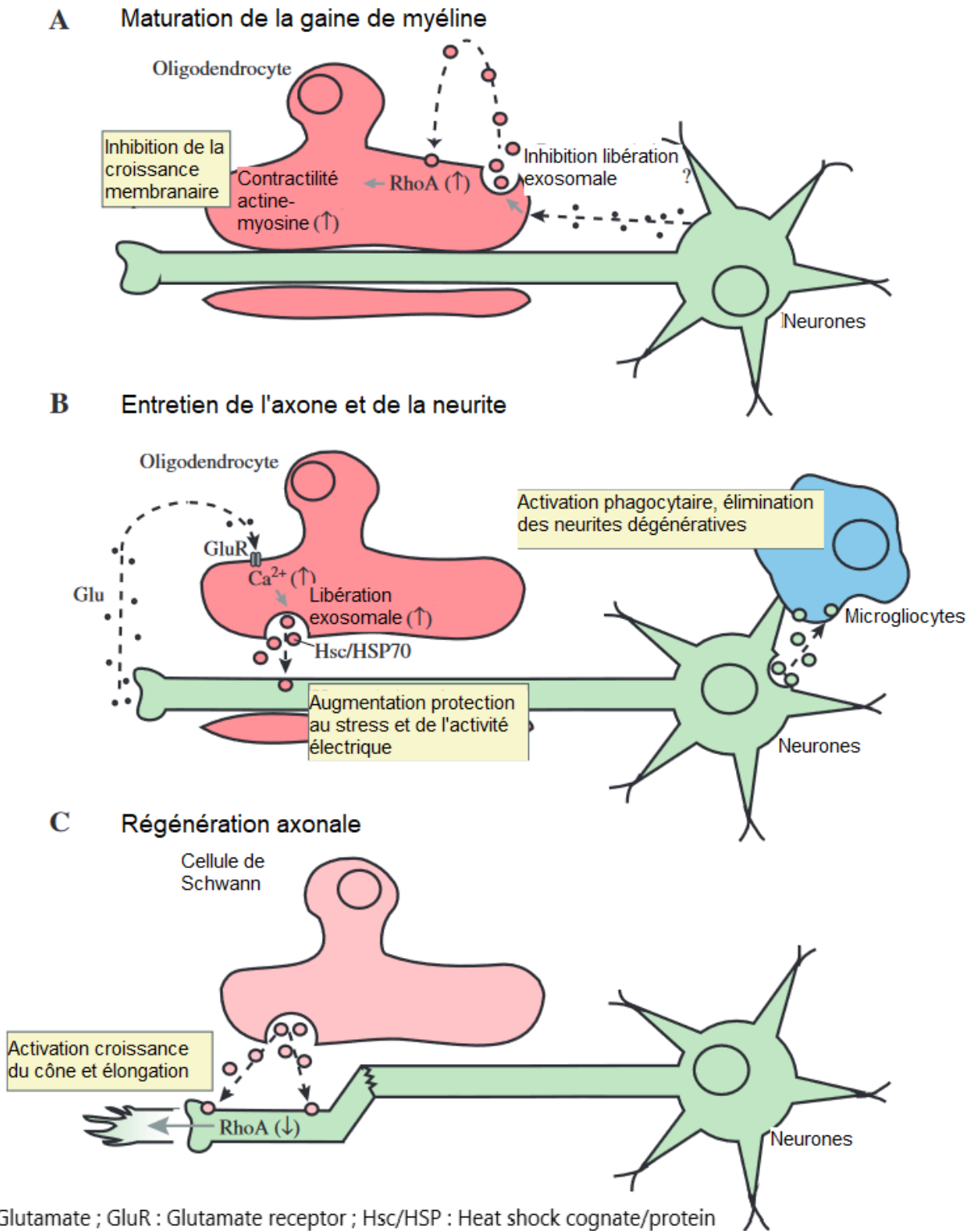
En effet, les exosomes oligodendrocytaires contiennent nombre de molécules telles que des protéines myéliniques, des lipides, des glycoprotéines, du cholestérol ou encore des protéines chaperonnes, qui peuvent agir directement sur la régulation de la genèse de la gaine de myéline, la dégradation et la maintenance des cellules nerveuses (Domingues *et al.*, 2020).

Les exosomes oligodendrocytaires sont capables de réguler par auto-inhibition la croissance de la surface membranaire par un processus faisant intervenir la contractilité actine-myosine et le système de signalisation RhoA (**Figure 11.A**) (Bakhti *et al.*, 2011). On a montré par ailleurs en coculture que l'inhibition de la libération exosomale était sous influence des neurones environnants.

On observe aussi que le glutamate des synapses neuronales est capable par action paracrine de fixer les récepteurs au glutamate oligodendrocytaires et d'entraîner la libération calcium dépendante d'exosomes porteurs de protéines chaperonnes (Frühbeis *et al.*, 2013) (**Figure 11.B**). Ils présentent un effet protecteur sur les neurones en situation de stress oxydatif ou de déficit énergétique, en transférant des protéines telles que la catalase ou la *superoxide dismutase* (Fröhlich *et al.*, 2014). De plus il semble que ce transfert exosomal améliore l'activité électrique spontanée des neurones cibles. Les exosomes neuronaux soutiennent par ailleurs l'activité phagocytaire des microglies et la dégradation des neurites dysfonctionnels.

On a mis en évidence un troisième rôle concernant les exosomes des cellules de Schwann. Ils pourraient être impliqués dans la régénération des dommages nerveux périphériques (**Figure 11.C**) (Yu *et al.*, 2021). En effet ils sont internalisés par les axones avoisinants, fournissant un support moléculaire pour la régénération axonale en cas de dommages nerveux (Yu *et al.*, 2021). Les exosomes des cellules de Schwann sont particulièrement concentrés à la terminaison du cône synaptique, avec en concordance une forte diminution de l'activité RhoA et donc une augmentation de la croissance axonale (Yuyama et Igarashi, 2016). La caractérisation protéomique de ces exosomes révèle de nombreuses molécules associées à la régénération axonale comme la carboxypeptidase E, la fibronectine ou encore la syntenine-1 (Domingues *et al.*, 2020).

Figure 11 : Exosomes et système nerveux (d'après Domingues *et al.*, 2020 et Yuyama et Igarashi, 2016)



Les exosomes du système nerveux central et périphérique tiennent une place importante dans la régulation de l'homéostasie des cellules nerveuses et de la gaine de myéline, il reste toutefois à élucider les mécanismes qui concernent la communication entre les cellules nerveuses, mais aussi avec le reste de l'organisme. D'autres travaux de thèse se sont intéressés de manière plus détaillée au rôle tenu par les exosomes dans la communication neuronale (Javalet, 2016).

Dans cet objectif, une étude de Gomez-Molina a prouvé l'existence d'une communication entre système nerveux central et circulation systémique par l'intermédiaire d'exosomes (Gómez-Molina *et al.*, 2019). Les mécanismes de transfert à travers la barrière hémato-encéphalique ne sont pas encore bien élucidés, mais feraient intervenir une internalisation par les cellules endothéliales macrovasculaires (Matsumoto *et al.*, 2017). La libération d'exosomes du système nerveux central dans la circulation systémique représente une cible de choix en termes de biomarqueur non-invasif des dysfonctions cérébrales.

E. Physiologie cardiovasculaire

La sphère cardiaque est difficile d'accès *in vivo*, mais on a montré à travers différentes études portant sur les VE de la circulation systémique que le fonctionnement du système cardiovasculaire reposait en partie sur la communication intercellulaire induite par les VE (Yu et Wang, 2019). Particulièrement, les cardiomyocytes qui représentent jusqu'à la moitié des cellules du cœur, libèrent de nombreux exosomes dans différentes situations (Wagner et Radisic, 2021).

Ils sont enrichis en protéines comme la famille des chaperons, ou encore de certains transporteurs à glucose. Ainsi les protéines dérivant des exosomes de cardiomyocytes sont impliquées dans de nombreuses fonctions cardiaques (**Tableau 7**). La chaperonne HSP70 favorise le fonctionnement du cœur, tout comme HSP20 qui favorise de plus l'angiogenèse (Yu et Wang, 2019). Les exosomes issus des cardiomyocytes participent à la régulation des transporteurs glucose nécessaires pour le bon fonctionnement des endothéliums associés, le cœur nécessitant des apports en O₂ et en glucose importants et stables (Garcia *et al.*, 2016). On retrouve aussi bon nombre d'acides nucléiques, ADN et ARN, induisant des modulations d'expression génique, qui peuvent être délétères (Waldenström *et al.*, 2012; Yu et Wang, 2019).

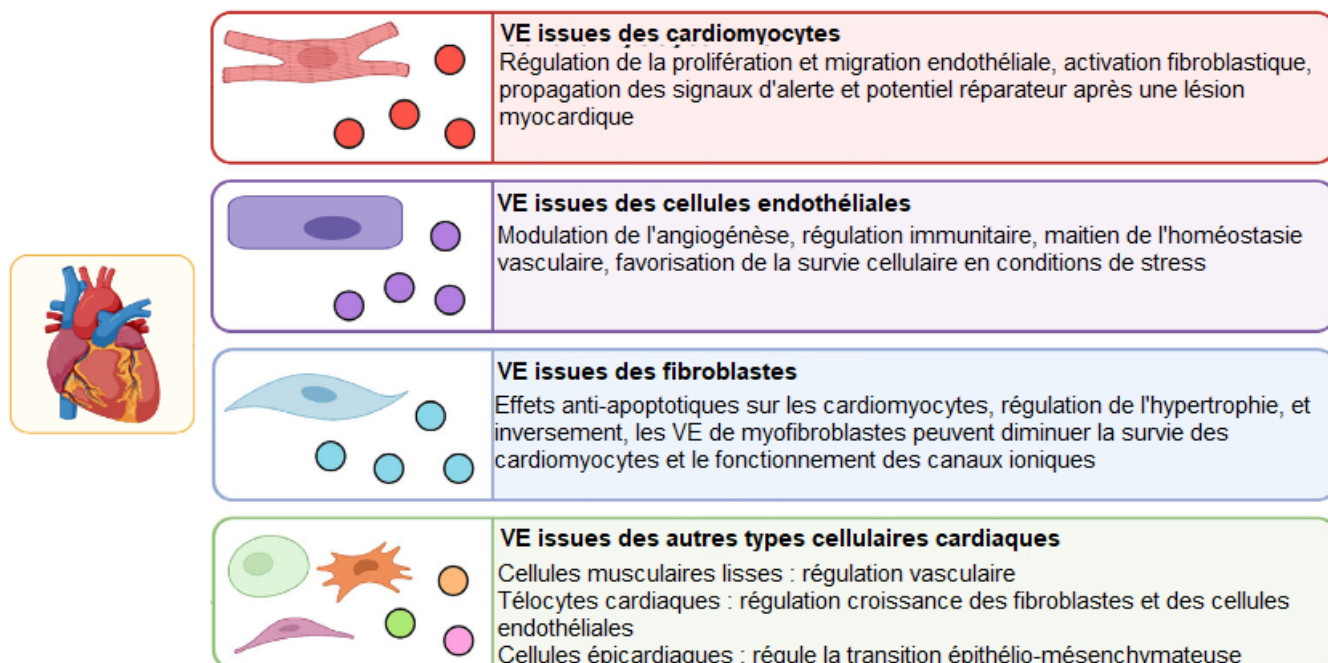
Tableau 7 : Effet de l'augmentation de l'expression des protéines et acides nucléiques exosomaux dérivés de cardiomyocytes sur la fonction cardiaque (d'après Wagner et Radisic, 2021; Yu et Wang, 2019)

Contenu exosomal	Fonction
Protéines	
HSP20	Favorise angiogenèse et améliore fonction cardiaque
HSP60	Favorise la réponse immunitaire
HSP70	Améliore la fonction cardiaque
TNF- α	Contribue au remodelage cardiaque
IL-6	Contribue au potentiel fibrosant
GLUT1	Régulation métabolisme
GLUT6	Régulation métabolisme
Acides nucléiques	
miR-320	Inhibition angiogénèse
miR-939-5p	Inhibition angiogénèse
miR-30a	Régulation autophagie
miR-29b	Inhibition fibrose et découplage des myocytes
miR-455	Inhibition fibrose et découplage des myocytes
miR-27a	Contribue au stress oxydatif
miR-222	Favorise angiogenèse
miR-34a	Contribue au stress oxydatif
miR-208a	Favorise la prolifération fibroblastique
miR-217	Favorise l'hypertrophie cardiaque
miR-27b	Favorise l'hypertrophie cardiaque
miR-133a	Réduit l'apoptose, prévient l'hypertrophie et la fibrose

GLUT : transporteurs du glucose ; HSP : Heat shock protein ; IL : Interleukine ; TNF : Tumor necrosis factor

Les VE des cardiomyocytes participent activement à la communication intercellulaire intracardiaque, mais il en est de même avec les autres types cellulaires que l'on retrouve dans le cœur : fibroblastes, cellules endothéliales ou encore cellules musculaires lisses. La **Figure 12** résume un ensemble de fonctions cardiaques auxquelles sont associées les différentes vésicules. On retrouve des fonctions de maintien de l'homéostasie, de régulation de la croissance cellulaire ou encore de régulation immunitaire.

Figure 12 : Exosomes et physiologie cardiaque (d'après Wagner et Radisic, 2021)



A l'heure actuelle, les études portant sur l'implication des VE des cellules cardiaques dans la physiologie du cœur sont encore loin d'être exhaustives, et par ailleurs, de nombreuses cellules non cardiaques libèrent aussi activement des VE dans la circulation systémique. L'ensemble de ces vésicules pourrait théoriquement avoir un impact sur la fonctionnalité cardiaque (Wagner et Radisic, 2021). On retrouve dans la littérature des recherches qui ont notamment mis en évidence une relation entre la survenue d'une dysfonction endothéliale et la présence d'un syndrome métabolique chez l'homme, ce qui est le reflet de la communication intercellulaire assurée par les exosomes dans la circulation systémique (Mallocci, 2017).

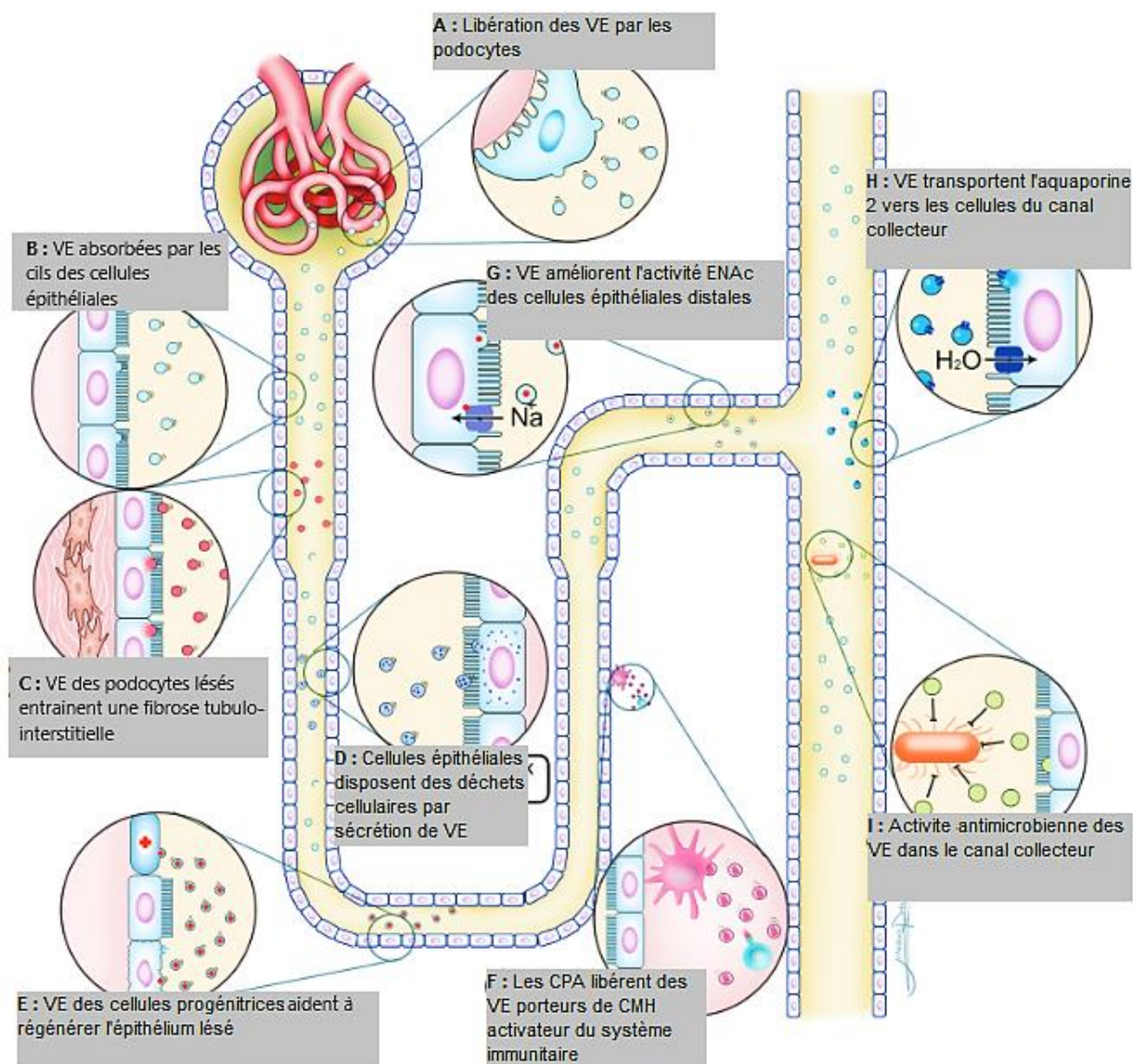
F. Physiologie rénale

La **Figure 13** décrit les différents niveaux d'intervention des VE à l'échelle du néphron et donc dans le fonctionnement physiologique du rein. Des VE sont libérées au niveau des podocytes dans le glomérule rénal, et peuvent dans un premier temps intervenir au niveau des cellules épithéliales ciliaires proximales (Hogan *et al.*, 2009). On a montré que dans le cas d'une hyperglycémie, les podocytes libèrent plus de VE dans les urines (Burger *et al.*, 2014). Ces VE peuvent agir aux niveaux des cellules épithéliales proximales et induire une fibrose tubulaire (**Figure 13.C**)(Munkonda *et al.*, 2018). Cette fibrose induite par les podocytes du glomérule contribue au développement des affections tubulo-interstitielles.

On a par ailleurs mis en évidence une relation entre la sécrétion de VE par les cellules épithéliales proximales transportant de la GAPDH et une régulation des canaux sodium du tube distal et des canaux collecteurs (**Figure 13.G**)(Jella *et al.*, 2016). Les VE sont donc impliquées dans la régulation de la réabsorption sodique rénale.

De plus les VE peuvent servir de vecteurs pour les aquaporines 2 entre les cellules du tube collecteur (**Figure 13.H**)(Street *et al.*, 2011). La réabsorption hydrique serait donc sous dépendance des VE également.

Figure 13 : Exosomes et physiologie rénale (adapté de Kwon, 2019)



CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité ; CPA : Cellules présentatrices d'antigènes ; ENaC : Canaux sodiques épithéliaux ; VE : Vésicules extracellulaires

- Régénération cellulaire

Les VE interviennent également dans les mécanismes de réparation cellulaire et de régénération de l'épithélium rénal en favorisant les interactions entre cellules épithéliales endommagées et cellules souches (**Figure 13.E**)(Chiabotto *et al.*, 2016). Les cellules tubulaires prolifèrent lors de lésions, ce qui contribue à la guérison du parenchyme (Smeets *et al.*, 2013). En effet ces dernières confèrent un effet protecteur contre l'ischémie rénale par la libération de VE (Zou *et al.*, 2018). Ce processus implique des petits ARN et du transfert mitochondrial entre cellules (Guescini *et al.*, 2010; Zou *et al.*, 2018).

- Homéostasie

Le vieillissement cellulaire induit une dégradation des organelles et une agrégation protéique, or les atteintes liées au vieillissement sont courantes pour le rein, comme la glomérulosclérose (Bolignano *et al.*, 2014). Le maintien de l'homéostasie passe notamment par l'élimination des déchets cellulaires (**Figure 13.D**). La sécrétion exosomale permet ainsi d'éliminer les protéines anormales ou encore des fragments ADN instables (Kwon, 2019). L'inhibition de la sécrétion exosomale est à l'origine d'une accumulation anormale cytoplasmique d'ADN, et l'apparition d'espèces réactives à l'oxygène.

- Immunité du tractus urinaire

Malgré une exposition forte aux germes, le tractus urinaire est généralement stérile. Une équipe a montré que les VE du tractus urinaire sont enrichies en protéines de l'immunité, comme des peptides antimicrobiens. On retrouve notamment la calprotectine et le lysozyme C qui peuvent entraîner une réponse antibactérienne (Hiemstra *et al.*, 2014)(**Figure 13.I**).

2. Exosomes et pathologie

Lorsque les processus physiologiques sont dysfonctionnels, on observe des modifications sur la distribution et la fonctionnalité des VE, dans le cadre d'affections diverses : néoplasies, atteintes neurodégénératives, cardiovasculaires, reproductives, infectieuses ou encore rénales (Shah *et al.*, 2018). Comprendre le rôle tenu par les exosomes dans différentes maladies permettrait de mettre en lumière certains éléments qui pourraient servir à suivre leur développement et de révéler des potentiels leviers thérapeutiques encore inexplorés.

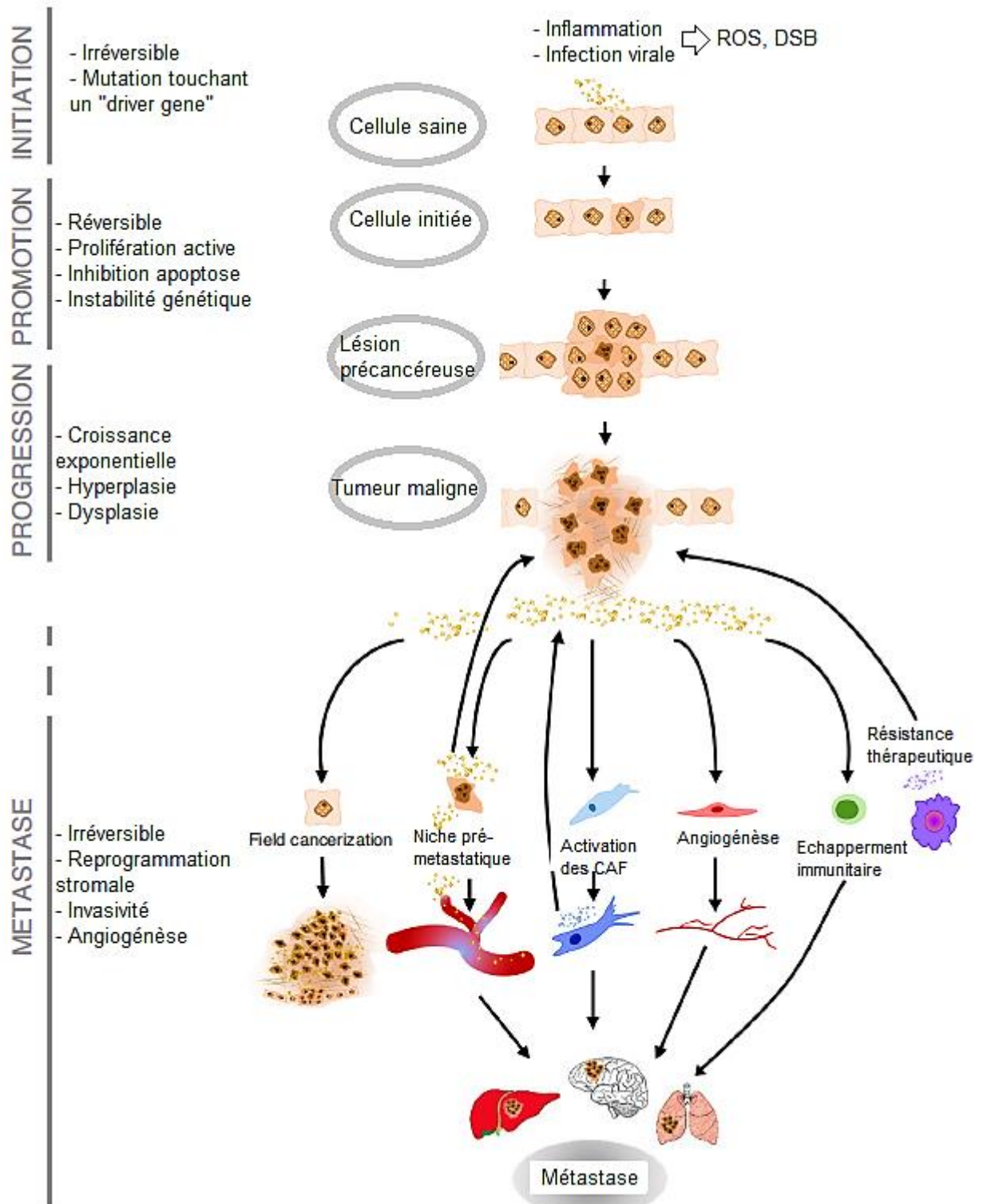
A. Néoplasies

Le rôle des VE en oncologie est un terrain en rapide expansion et représente un des axes majeurs de l'étude de ces vésicules au cours du développement tumoral.

On parle de progression tumorale pour décrire la transformation par étapes d'une tumeur bénigne vers une tumeur maligne et ses métastases (**Figure 14**). Une phase dite d'initiation correspond à l'apparition de la première lésion génétique non réversible. Par la suite, durant les phases de promotion et de progression, le pool (clone de cellules) tumoral va commencer à proliférer tout en développant des avantages en termes de croissance, d'échappement à l'apoptose, et des modifications phénotypiques. La métastase est la forme systémique de la maladie, dans laquelle la tumeur interagit avec l'environnement local et distant résultant en une croissance maligne secondaire (Alečković *et al.*, 2019).

La reprogrammation de l'environnement joue un rôle essentiel dans ce développement. Les déséquilibres immunitaires, les altérations fibroblastiques et les changements endothéliaux sont caractéristiques de l'installation de lésions malignes. L'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse et son inverse, la transition mésenchymo-épithéliale sont des exemples de plasticité cellulaire induites dans la progression cancéreuse et une part cruciale de la cascade métastatique. La transition épithélio-mésenchymateuse implique la capacité de cellules épithéliales à acquérir des traits de mésenchyme pour migrer, s'extravaser et survivre dans le flux sanguin pour s'implanter à distance. A l'inverse la transition mésenchymo-épithéliale permet aux métastases de former des foyers tumoraux secondaires à distance (Maia *et al.*, 2018). Ces communications complexes sont en partie sous médiation exosomale.

Figure 14 : Etapes du développement tumoral (d'après Stefanius *et al.*, 2021)



ROS = Reactive Oxygen Species ; DSB = Double Stranded Breaks ; CAF : Cancer-associated fibroblasts

- Conditions précancéreuses

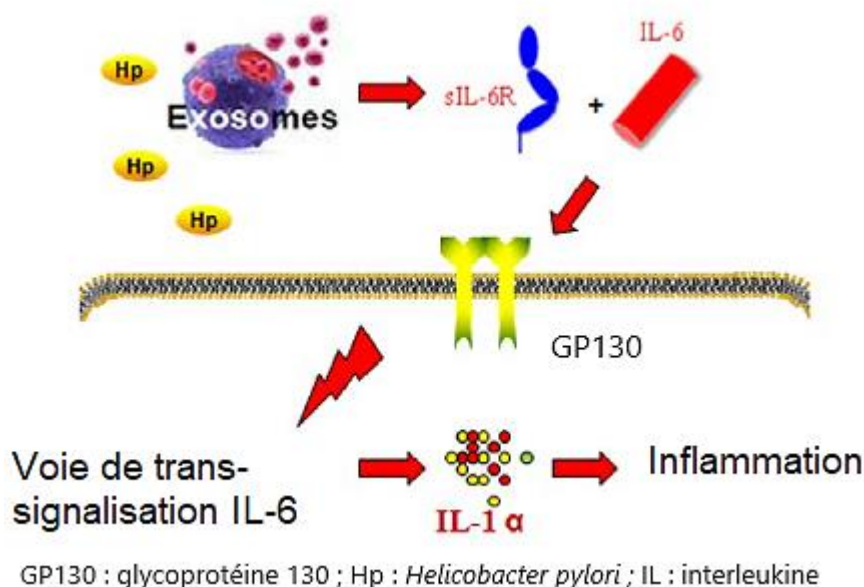
L'initiation tumorale survient quand une cellule acquiert une mutation clé sur un gène pilote de cancer (*cancer driver gene*), soit de manière héréditaire soit de manière sporadique. On considère que jusqu'à 10% des cancers se développent suite à une susceptibilité héréditaire, tandis que la majorité font suite à des événements de mutations sporadiques liés à l'exposition à un environnement carcinogène (Grivennikov *et al.*, 2010). L'inflammation est un processus qui sert normalement à la protection de l'organisme contre les atteintes extérieures. Toutefois, la dérégulation de la réponse inflammatoire est aussi à l'origine d'un environnement potentiellement carcinogène : inflammation aiguë comme chronique sont des facteurs initiateurs de la carcinogénèse et contribuent à l'acquisition de nombreuses caractéristiques de base du cancer (Piotrowski *et al.*, 2020).

On considère aussi que près de 20% des cancers humains sont associés à des conditions préexistantes d'inflammation chronique infectieuse ou auto-immune (Crusz et Balkwill, 2015). Si les cytokines sont les principaux médiateurs de l'inflammation, l'implication des exosomes est fortement rapportée dans ce processus immunitaire (Chan *et al.*, 2019).

Les maladies inflammatoires de l'intestin font partie des affections chroniques associées à une élévation du risque de cancers intestinaux (Butin-Israeli *et al.*, 2019; Chan *et al.*, 2019). Cette affection entraîne une infiltration importante de polynucléaires neutrophiles sécrétant des myéloperoxydases à l'origine d'une production d'espèces réactives de l'oxygène (Butin-Israeli *et al.*, 2019; Piotrowski *et al.*, 2020). Ce stress oxydatif est génotoxique et peut entraîner des cassures du double brin d'ADN. On a démontré dans des modèles murins que les VE libérées par ces neutrophiles transportent des ARNmi pro-inflammatoires (miR-23a et miR-155) ainsi que des myéloperoxydases, des précurseurs d'espèces réactives de l'oxygène. On a également mis en évidence qu'il existait une corrélation entre la production de VE, d'ARNmi pro-inflammatoires et le nombre d'altérations de l'ADN, *in vitro*, et *in vivo* (Butin-Israeli *et al.*, 2019). Ces anomalies génétiques sont favorables au développement d'une tumeur maligne.

Les infections chroniques à *Helicobacter pylori* sont reconnues comme un grand facteur de risque de développement de carcinome gastrique (Polakovicova *et al.*, 2018). Les exosomes issus de cellules gastriques infectées sont potentiellement porteurs du facteur de virulence CagA de *Helicobacter pylori*. On a montré de plus que les exosomes sériques de patients atteints d'infections à *Helicobacter pylori* favorisent l'expression des cytokines pro-inflammatoires (voie IL-6/IL-1 α) dans les cellules épithéliales gastriques. On observe sur la **Figure 15** une sécrétion du récepteur IL-6 soluble qui fixe l'IL-6 en circulation et active ainsi la voie IL-6/IL-1 α : l'inflammation chronique favorise le risque d'apparition de mutation (Y. Chen *et al.*, 2018).

Figure 15 : Implication des exosomes dans la favorisation de l'inflammation chronique par *Helicobacter pylori* (d'après Y. Chen *et al.*, 2018)



Une étude portant sur les exosomes dérivant de cholangiocytes rapporte que ces derniers sont à l'origine d'un transfert de l'ARNInc H19 dans les hépatocytes, ce qui est corrélé à une réduction de l'expression du *Small heterodimer partner* dans les hépatocytes, favorisant ainsi les atteintes hépatiques cholestatiques et la fibrose. Ces dernières peuvent favoriser le développement d'atteintes tumorales comme le cholangiocarcinome et le carcinome hépatocellulaire chez la souris et l'homme (X. Li *et al.*, 2018). Le suivi de l'ARNInc H19 exosomal sérique pourrait représenter un biomarqueur efficace des affections cholestatiques, affections que l'on retrouve couramment dans le domaine vétérinaire.

Ces différents exemples illustrent l'importance des exosomes et leur implication dans l'entretien de conditions inflammatoires chroniques, et donc dans l'initiation du développement tumoral.

- Communication paracrine et *field cancerization*

La communication intercellulaire est un facteur important de la progression tumorale. Ainsi différentes études ont montré que les exosomes dérivés de tumeurs (TDE) peuvent grandement améliorer le potentiel prolifératif, invasif et l'expression des marqueurs de transitions épithélio-mésenchymateuse chez les cellules métastatiques moins agressives (Qiao *et al.*, 2019; Steenbeek *et al.*, 2018).

Une étude s'intéressant au cancer pancréatique a montré que les TDE transportaient l'annexine A1, ce qui influençait le caractère métastatique de la tumeur, en entraînant sa différenciation épithélio-mésenchymateuse, et donc augmentant sa mobilité (Pessolano *et al.*, 2018). En effet, on a montré que les cellules avec une perte de fonction du gène de l'annexine A1 manquaient de potentiel métastatique, mais que ce dernier peut être rétabli par l'action d'exosomes issus de souches sauvages, en induisant la dédifférenciation des cellules. Une étude similaire sur le cancer du sein a montré que les exosomes de cellules fortement métastatiques sont à l'origine de l'augmentation du potentiel invasif et migratoire

des autres cellules tumorales, et que cet effet est dû à la présence de miR-7641 au sein des TDE (Shen *et al.*, 2021).

Les TDE sont donc capables d'influencer fortement le potentiel prolifératif des cellules malignes, mais la stimulation focale des tissus peut aussi concerner les cellules saines (Abdouh *et al.*, 2019; Dai *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2019).

Dans le cadre de la communication tumorale, le principe de *field cancerization* correspond à l'ensemble des changements morphologiques et/ou moléculaires de l'environnement tumoral, même sans modification histologique évidente. Le développement malin multifocal des tissus sains est intégré à ce principe.

Par exemple, l'ARNcirc-100284 des lignées hépatiques transformées peut induire la transformation maligne d'une lignée saine en accélérant le cycle cellulaire (Dai *et al.*, 2018). De manière comparable, les TDE des cellules de cancer pancréatique peuvent reproduire cet effet de transformation maligne (Servage *et al.*, 2020; Stefanius *et al.*, 2019).

L'absorption des TDE par les cellules saines est nécessaire à la transformation maligne, des études *in vivo* ayant montré que des cellules saines exposées aux TDE sont à l'origine de tumeurs sur des souris, validant ainsi le caractère tumorigène des TDE (Dai *et al.*, 2018 ; C.-H. Wu *et al.*, 2019 ; Abdouh *et al.*, 2019 ; Servage *et al.*, 2020).

Les TDE sont capables d'activer les voies de signalisation et d'induire des mutations des cellules saines de l'environnement de manière irréversible.

Ces études mettent en évidence le rôle des TDE dans la progression tumorale et leur capacité à créer des cellules malignes semblables à la tumeur primaire. Cette capacité est une voie de développement d'une hétérogénéité tumorale par l'intermédiaire de tumeurs satellites, ce qui renforce la possible résistance thérapeutique (Dagogo-Jack et Shaw, 2018). Les TDE pourraient ainsi contribuer aux récives tumorales aux marges chirurgicales.

- Fibroblastes associés au cancer (CAF)

La progression tumorale est associée au remaniement de la matrice extracellulaire et à la métastase du foyer primaire. Ce remaniement repose en partie sur l'activation des fibroblastes associés au cancer (CAF). Ces cellules mésenchymateuses sont à l'origine d'un remodelage de la matrice extracellulaire et des voies de signalisation des facteurs de croissance, ce qui induit une transition épithélio-mésenchymateuse (Ringuette Goulet *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2019).

Les TDE des cellules de cancer vésical sécrètent du facteur de croissance (TGF- β) à l'origine de l'activation des fibroblastes en CAF, ce qui a pour effet de favoriser la transition épithéliale, la croissance cellulaire et le potentiel invasif des cellules malignes vésicales moins agressives (Goulet *et al.*, 2019; Ringuette Goulet *et al.*, 2018).

De manière comparable, les TDE dans le cadre du cancer hépatique seraient à l'origine de la libération de miR-1247-3p, un ARNmi capable d'activer les CAF par régulation de la voie de signalisation intégrine/facteur nucléaire- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), ce qui favorise la métastase pulmonaire (Fang *et al.*, 2018).

De nombreuses études récentes relient CAF et transition épithélio-mésenchymateuse : cancer du poumon et TDE issus de CAF (You *et al.*, 2019), cancer du sein et ARNmi exosomal (181d-5p)(Wang *et al.*, 2020), cancers du tractus oral et TDE issus des CAF avec l'ARNmi 34a-5p (Y.-Y. Li *et al.*, 2018).

Tous ces exemples illustrent de quelle manière les CAF et leurs exosomes potentialisent la progression tumorale en favorisant la dédifférenciation des tissus et donc leurs métastase par action sur l'axe de transition épithélio-mésenchymateuse dans l'organe de la tumeur primaire.

- Angiogenèse

Le développement tumoral passe par une phase d'angiogenèse importante, afin de fournir les nutriments et l'oxygène nécessaires aux besoins importants des cellules tumorales.

L'étude de Pessolano sur les TDE pancréatiques marqués annexine A1+ a rapporté leur capacité à induire la tubulogenèse, un mécanisme indicateur de l'angiogenèse (Pessolano *et al.*, 2018). On a également montré que deux ARNmi (miR-130a et miR-155) issus du cancer gastrique favorisent l'angiogenèse en ciblant les cellules endothéliales (H. Yang *et al.*, 2018).

Paradoxalement, l'hypoxie intervient aussi couramment dans le développement tumoral. On a montré que la coculture de TDE obtenus en condition d'hypoxie avec des cellules cancéreuses ovariennes résultait en une augmentation du temps de survie associé à un efflux de cisplatine (molécule de chimiothérapie) dans les cellules tumorales. De plus cette étude a montré que l'inhibition de la libération des exosomes, entraînait une amélioration de l'efficacité du cisplatine avec augmentation de l'apoptose et diminution de la prolifération. L'utilisation ciblée de protéines inhibitrices du cycle exosomal pourrait permettre d'améliorer l'efficacité du traitement en limitant la signalisation induite par les VE (Dorayappan *et al.*, 2018)

- Echappement immunitaire et résistance

La capacité des tumeurs à échapper au système immunitaire est un levier majeur du potentiel métastatique. Les exosomes sont impliqués dans le déficit du système immunitaire inné comme adaptatif.

On a montré sur des lignées malignes de cancer du sein, de mélanome et de glioblastome que les exosomes favorisaient la croissance tumorale en se liant sur les lymphocytes T CD8+, inhibant leur fonction. De plus, on a montré que l'inhibition des sécrétions exosomales contribuait de manière significative au rétablissement de l'immunité antitumorale des lymphocytes T (G. Chen *et al.*, 2018; Ricklefs *et al.*, 2018, p. 1; Y. Yang *et al.*, 2018, p.).

Une autre étude mettait en évidence que les TDE de cancer pancréatique diminuaient significativement la production de deux cytokines, $TNF\alpha$ et $INF\gamma$ par les cellules NK, et réduisaient la cytotoxicité des NK à l'encontre des cellules cancéreuses (Zhao *et al.*, 2019).

Les TDE peuvent aussi favoriser la résistance thérapeutique par l'action des ARN exosomaux. Différents exemples illustrent cette action.

- On a montré que les TDE amélioraient la résistance au témozolomide, un traitement antitumoral du gliome, par transfert d'un ARNcirc, et par interaction directe avec un ARNmi (Ding *et al.*, 2020). Sur un modèle de souris atteinte d'adénocarcinome pancréatique, Binenbaum a montré que les exosomes de macrophages transféraient le miR-365 dans les cellules tumorales, diminuant ainsi l'activation de la gemcitabine et son effet thérapeutique (Binenbaum *et al.*, 2018).
 - Enfin, concernant un cas plus spécifique de médecine vétérinaire, Troyer montrait en 2017 que les TDE d'ostéosarcome, possédaient un potentiel protumorigène dans les cellules T circulantes obtenus sur des chiens sains. En particulier ces exosomes induisaient un effet immunosuppresseur sur CD4/8+, en réduisant leur prolifération, mais aussi en favorisant la production de LT régulateurs (Troyer *et al.*, 2017).
- Métastase

Les sections ci-dessus décrivent comment les exosomes contribuent à la progression tumorale et au potentiel métastatique. Les études illustrent que les exosomes servent de véhicules pour promouvoir la migration et l'invasion tissulaire, favoriser la transition épithélio-mésenchymateuse, l'angiogenèse et fournir une immunosuppression de l'environnement. L'hypoxie induite et l'augmentation des sécrétions exosomales associées améliorent le potentiel métastatique (Meng *et al.*, 2019).

En plus de ces rôles, on a montré que les exosomes jouaient un rôle important à distance de la tumeur primaire en favorisant le développement de niches pré-métastatiques. Des études ont souligné le rôle de plusieurs molécules exosomales, dont les intégrines dans le déterminisme du tropisme d'organes des métastases (Hoshino *et al.*, 2015; Peinado *et al.*, 2012)

Le **Tableau 8** reprend un ensemble de cas concernant les exosomes issus des cellules malignes ou de l'environnement modifié autour de la tumeur primaire. Ces exosomes représentent des acteurs majeurs du développement tumoral en agissant sur les leviers de l'inflammation, de la communication intercellulaire, de l'angiogenèse ou encore de la résistance thérapeutique et immunitaire dans le cadre de différentes atteintes malignes. Il reste toutefois encore de nombreuses données à éclaircir concernant les mécanismes impliqués afin de pouvoir envisager de nouvelles possibilités en termes thérapeutiques.

Tableau 8 : Fonctions exosomale et développement tumoral (d'après Stefanius *et al.*, 2021)

Processus	Pathologie/Cellule parentale	Facteur exosomal	Effet
Conditions précancéreuses	IBD, PMN	MPO	ROS, DSB
		miR-23a	DSB
	Fibrose hépatique, HSC	GLUT1, PKM2	Activation des HSC et favorisation de la fibrose
	Atteinte cholestatique hépatique, cholangiocytes	ARNInc H19	Diminution de SHP dans les hépatocytes et favorisation des atteintes cholestatiques
	Hépatite C chronique, hépatocytes	miR-192	Activation des HSC et favorisation de la fibrose
Progression et métastase Field cancerization	Infection à <i>Helicobacter pylori</i> , cellules épithéliales gastriques	IL-1 α par voie IL-6/sIL-6R	Inflammation chronique
	Cellules hépatiques transformées	ARNcirc-100284	Transformation de cellules hépatiques saines (L-02)
	Cellules pancréatiques	N/A	Transformation de cellules 3T3
	Cellules tumorales vésicales	Activation de UPR	Transformation de cellules SV-HUC
Communication paracrine intertumorale	Cellules agressives mélanome B16F10	ARN et protéines	Accroissement du potentiel invasif lignée moins métastatique B16F1
	Cellules tumorales pulmonaires haut potentiel métastatique 95D	HGF	Induction de la EMT d'une lignée faiblement métastatique 95C
	Cellules tumorales pancréatiques, MIA PaCa-2	ANXA1	Induction de la EMT et récupération du potentiel métastatique de la lignée ANXA1 KO MIA PaCa-2
	Cellules tumorales ovariennes (hypoxie)	STAT3/Rab	Progression, chimiorésistance de cellules cancéreuses ovariennes
	Cellules HCC	miR-93	Favorisation de la prolifération du HCC
Communication paracrine et fibroblastes associés au cancer	Cellules tumorales vésicales	TGF β	Activation des fibroblastes en CAF
	Cellules HCC hautement métastatiques	miR-1247-3p	Activation des fibroblastes en CAF
	CAF	Snail1	Favorisation de la EMT dans les cellules tumorales pulmonaires
	CAF	miR-181d-5p	Favorisation de la EMT, prolifération et inhibition de l'apoptose de cellules tumorales mammaires
	CAF	miR-34a-5p	Favorisation de la EMT de cellules tumorales du tractus oral
Communication paracrine et angiogénèse	CAF	TGF β 1	Favorisation de la souche tumorale dans le cancer colorectal
	Cellules tumorales pancréatiques, MIA PaCa-2	ANXA1	Induction de la tubulogénèse dans les HUVEC
	Cellules tumorales gastriques, SGC7901	miR-130a et miR-155	Induction de l'angiogénèse dans les HUVEC
	Cellules carcinome à cellules squameuses hypoxiques	N/A	Favorisation de la prolifération, migration, invasivité et tubulogénèse dans les HUVEC
Communication paracrine et échappement immunitaire	Cellules carcinome squameux	EPHB2	Favorisation de l'angiogénèse dans les HUVEC
	Cellules tumorales mammaires	PD-L1	Inhibition de la réponse T CD8
	Cellules métastatiques mélanome	PD-L1	Inhibition de la réponse T CD8
	Cellules glioblastome	PD-L1	Inhibition de la réponse T CD8 et CD4
	Cellules tumorales pancréatiques	Facteurs de régulation immunitaires	Dysfonction des cellules NK et de la cytotoxicité envers les cellules souches tumorales
	Gliome	ARNcirc NF IX	Amélioration de la résistance au temozolomide
	Cancer colorectal, RKO/R	p-STAT3	Résistance au 5-fluorouracil dans les cellules sensibles RKO/P
Macrophages associés aux tumeurs	miR-365	Réduction de l'activation de la gemcitabine dans les cellules du PDAC	

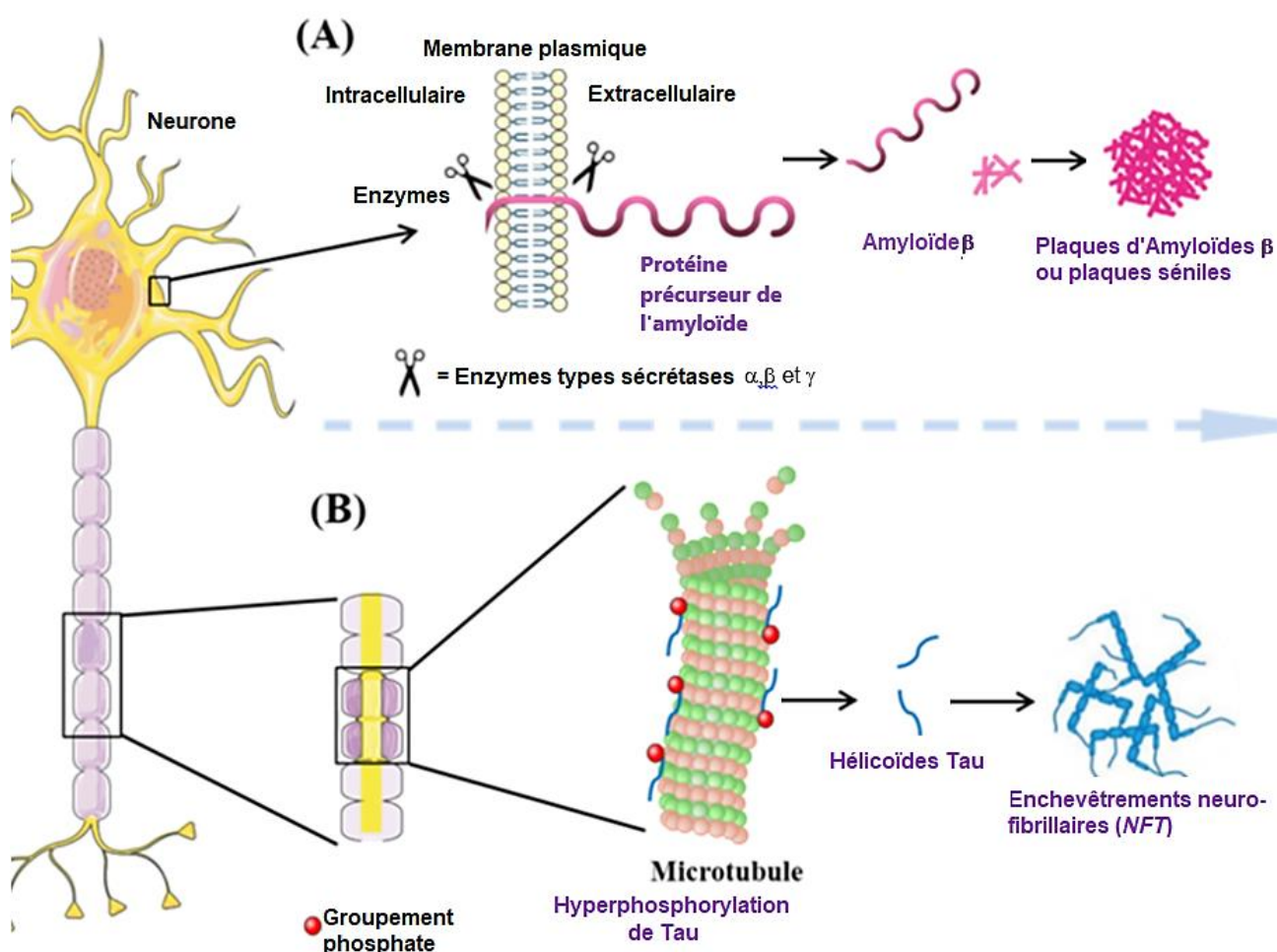
ANXA1 : Annexine 1 ; CAF : Cancer associated fibroblast ; CRC : Cancer colorectal ; DSB : Cassures double brin d'ADN ; EMT : Transition épithélio-mésenchymateuse ; EPHB2 : Ephrin type-B receptor 2 ; GLUT : Transporteur glucose ; HCC : Carcinome hépatocellulaire ; HCV : Virus hépatite C ; HGF : Hepatocyte growth factor ; HSC : Cellules stellaires hépatiques ; HUVEC : Souche de cellules de la veine du cordon ombilical ; IBD : Maladies inflammatoires de l'intestin ; IL : Interleukine ; MET : Transition mésoenchymo-épithéliale ; MPO : Myéloperoxydase ; NK – Natural killer cells ; PDAC : Adénocarcinome pancréatique ; PD-L1 : Programmed death ligand PKM : Pyruvate kinase musculaire ; PMN : Polynucléaire neutrophils ; pSTAT : Phospho signal transducer and activator of transcription 3 ; ROS : Espèces réactives en oxygène ; SHP : Small heterodimer partner ; SV-HUC : Souche de cellules urothéliales humaines ; TGF : Tumor growth factor ; UPR – Unfolded protein response

B. Affections neurologiques

Les études concernant les atteintes du système nerveux central sont peu nombreuses en médecine vétérinaire mais elles se multiplient concernant les atteintes neurodégénératives en médecine humaine, notamment pour la maladie d'Alzheimer ou encore Parkinson (Rastogi *et al.*, 2021).

Dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, l'expression clinique est associée à deux éléments biologiques (**Figure 16**) : d'une part la formation de plaques de β -amyloïde ($A\beta$), un peptide qui provient du clivage de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) par les β et γ -sécrétases (**Figure 16.A**) ; d'autre part, la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires provenant de modification de la protéine Tau associée aux microtubules (**Figure 16.B**) (Sheppard et Coleman, 2020).

Figure 16 : Marqueurs pathologiques de la maladie d'Alzheimer (d'après Rastogi *et al.*, 2021)



Des études rapportent que les exosomes transportent des APP et différents produits issus de leur clivage, dont les $A\beta$. Ils pourraient donc agir comme véhicules du transfert inter-neuronal de ces protéines (Sardar Sinha *et al.*, 2018). Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, on a observé une perte de fonction du système lysosomal et une diminution des fonctions de recyclage cellulaire avec modification de la protéine Apo E4. En conséquence, la libération d'exosomes porteurs de protéines anormales était augmentée et la maladie diffusait plus rapidement (Rastogi *et al.*, 2021).

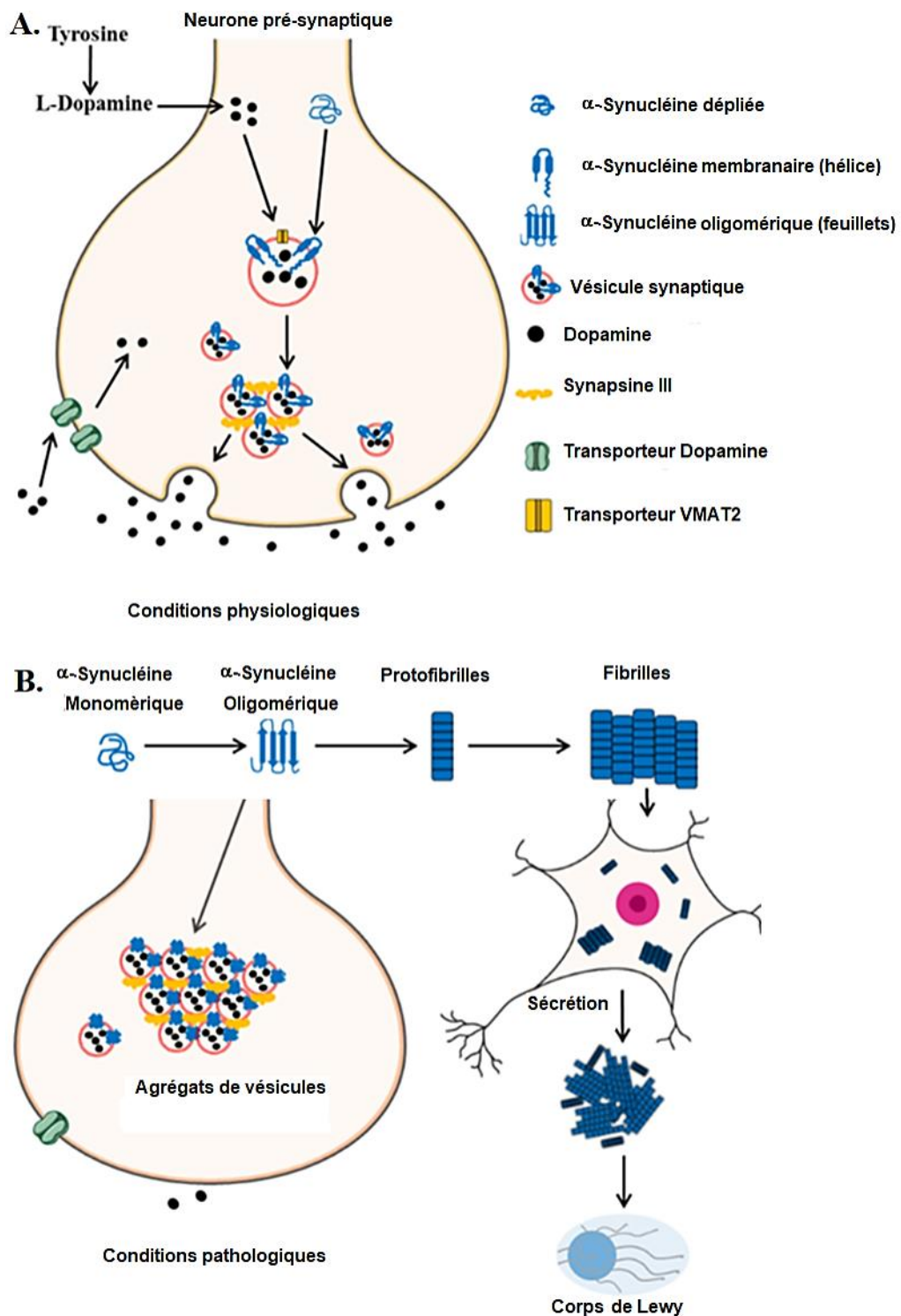
Concernant la protéine Tau, la plupart des protéines retrouvées dans les fluides extracellulaires contiennent une protéine Tau tronquée qui ne s'agglutine pas avec les microtubules (Kanmert *et al.*, 2015). Les protéines Tau agglutinantes sont sécrétées dans les exosomes ou les neurones. La forme complète responsable de la maladie ne se retrouve qu'en faible proportion dans les exosomes, toutefois plus importante que dans les fluides biologiques. Les exosomes pourraient être des vecteurs majoritaires de dissémination interneuronale de cette protéine (Guix *et al.*, 2018).

Parallèlement, des études ont montré un intérêt croissant dans l'implication de certains ARNnc exosomaux et leur fonction régulatrice des gènes impliqués dans la maladie d'Alzheimer. Par exemple, les ARNmi 20a, 106a, 106b et 17-5p entraînerait une sous-expression du gène *APP* et donc une moindre production de la protéine associée (Hébert *et al.*, 2009) ; l'expression diminuée des miR-29a et 29b-1 chez les patients atteints serait corrélée à une plus forte expression du gène *BACE1*, qui encode la β -sécrétase, productrice de $A\beta$ (Faghihi *et al.*, 2008; Hébert *et al.*, 2009). D'autres ARNnc ont été identifiés chez les malades (Absalon *et al.*, 2013; Jayadev *et al.*, 2013).

La maladie de Parkinson est la seconde maladie neurodégénérative la plus courante avec Alzheimer. Elle est associée à une perte de neurones dopaminergiques dans la *substantia nigra* (J. Ma *et al.*, 2019). Ce processus est caractérisé entre autres par une agrégation de protéines α -synucléines (α -syn), et la présence de corps de Lewy (**Figure 17**). Cette protéine α -syn est nécessaire à la libération des neurotransmetteurs ; elle joue un rôle dans le trafic intercellulaire, en facilitant l'association avec les complexes SNARE (Alvarez-Erviti *et al.*, 2010). Elle est normalement recyclée dans le système autophagique lysosomal. Toutefois des mutations du gène *PARK-LRRK2* entraînent un défaut de la machinerie lysosomale et de la même manière que pour la maladie d'Alzheimer, une redirection des MVB contenant α -syn vers la membrane (Paisán-Ruiz *et al.*, 2013). La machinerie exosomale sert alors d'auxiliaire au mécanisme de dissémination de la maladie.

Certains ARNnc sont impliqués dans le réseau pathogénique de la maladie de Parkinson. Par exemple l'augmentation de miR-126 conduit à de la neurotoxicité (W. Kim *et al.*, 2016) et celle de miR-161 régule négativement l'agrégation α -syn (Zhang et Cheng, 2014). De plus une diminution de l'expression de miR-133b et miR-153 a été associée à l'expression de la maladie. En temps normal miR-133b participe à l'induction de la croissance axonale, et inhibe l'expression de α -syn (Niu *et al.*, 2016). Quant à miR-153, il réduit l'activation de p38 et donc les signaux apoptotiques (Fragkouli et Doxakis, 2014).

Figure 17 : Marqueurs pathologiques de la maladie de Parkinson (d'après Rastogi *et al.*, 2021)



Les exosomes sont fortement impliqués dans les maladies neurodégénératives. De fait nombre de ces maladies reposent sur l'accumulation de composants délétères au sein du système nerveux central, composants qui devraient physiologiquement être recyclés par les voies lysosomale et protéasomale. La biogenèse exosomale étant située au carrefour de ces voies métaboliques, les exosomes représentent alors un enjeu majeur dans la compréhension et la gestion de ces maladies.

On rapporte l'implication des exosomes dans d'autres affections neurologiques, comme la maladie d'Huntington, la sclérose latérale amyotrophique, les accidents vasculaires cérébraux, l'épilepsie ou encore les atteintes traumatiques crâniennes et de la moelle épinière (Rastogi *et al.*, 2021; Xiao *et al.*, 2021).

On a montré sur un modèle murin de *status epilepticus*, une modification des voies ESCRT dépendante et ESCRT indépendante. Une augmentation de la production exosomale est visible deux semaines après le *status epilepticus* (Batool *et al.*, 2019). On observe également une modification des profils en ARNm. Dans une étude d'épilepsie chronique chez le rat, on met en évidence une diminution de miR-346 et miR-331-3p, ces deux ARN modulant les mécanismes GABA et mTOR dépendants, qui agissent notamment dans la transmission synaptique et le maintien de l'homéostasie (Gitaí *et al.*, 2020).

C. Affections cardiovasculaires

On sait qu'il existe une médiation exosomale entre les différentes cellules du cœur et que l'on retrouve des exosomes d'origine cardiaque dans la circulation systémique (Beltrami *et al.*, 2017; Emanuelli *et al.*, 2016; Pironti *et al.*, 2015). On observe ainsi une modification du nombre et du contenu des exosomes circulants dans le cadre de différentes atteintes cardiovasculaires, telle que la fibrose, l'athérosclérose, l'insuffisance cardiaque, les infarctus ou encore les hypertrophies (Henning, 2021)

Pour reprendre quelques exemples, en cas de fibrose cardiaque les mécanismes de remodelage sont liés aux voies TGF β , NF- κ β ainsi que les voies Wnt. Or ces molécules sont en partie véhiculées par les exosomes. Par exemple, les exosomes porteurs de deux protéines, Wnt3a et Wnt5a, agissent sur la fibrose cardiaque : la voie Wnt3a est à l'origine d'une activation de la réponse dépendante de la β -caténine impliquée dans la fibrose ; Wnt5a induit l'activation de la voie profibrosante IL-6 (Działo *et al.*, 2019). On a de plus mis en évidence chez des souris que la sous-expression de la voie β -caténine est à l'origine d'une diminution des effets profibrosants (Xiang *et al.*, 2017). Les exosomes porteurs des molécules liées au remodelage cardiaque comme Wnt sont donc des potentiels acteurs de la progression de la fibrose.

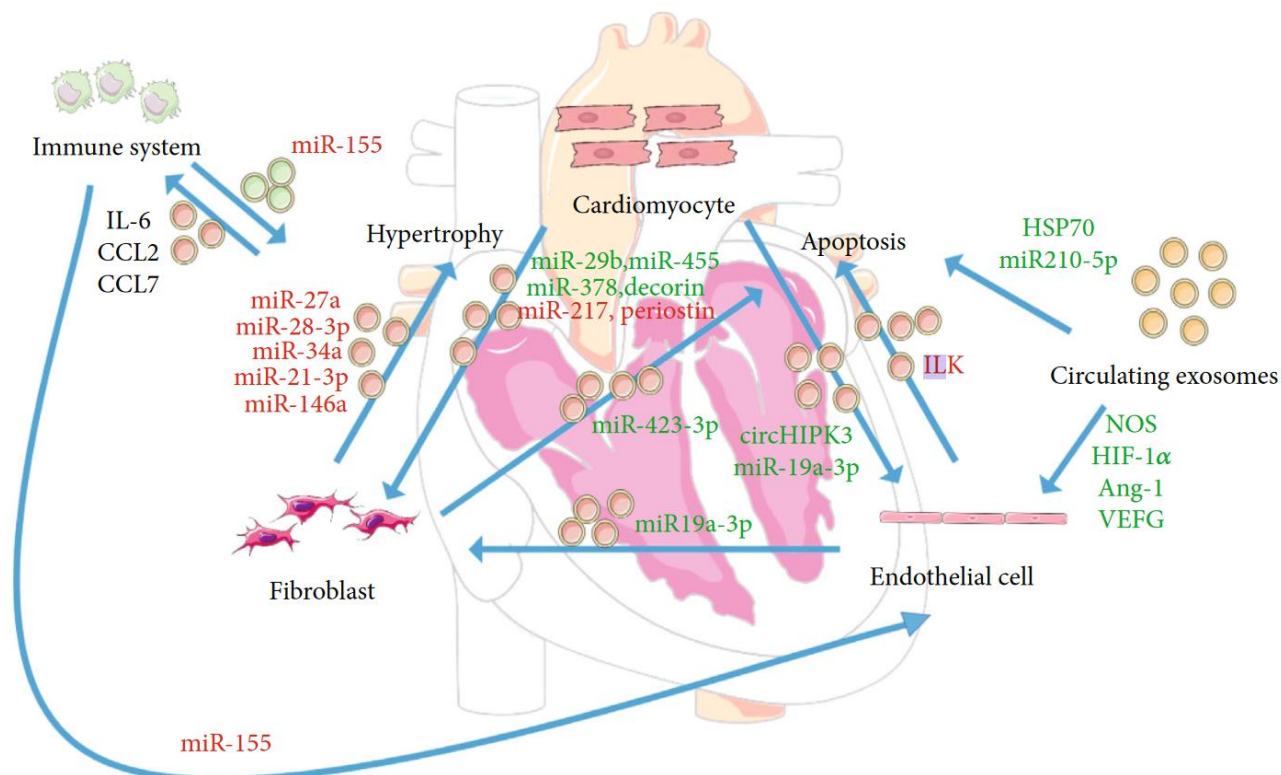
En cas d'athérosclérose, on pense que les exosomes participent aux processus de régulation de l'intégrité de l'intima, notamment par le biais de certains ARNm. On rapporte que miR-712 et miR-205 sont à l'origine d'une régulation de métalloprotéinases, entraînant ainsi inflammation, hyperperméabilité vasculaire, et migration des cellules musculaires lisses dans ces zones d'hyperperméabilité (Kumar *et al.*, 2014). D'autres ARNm interviennent en tant que facteurs athérogènes, miR-23b diminue la prolifération endothéliale, miR-92a et 205 favorisent l'inflammation, miR-155 diminue la synthèse d'oxyde nitrique et miR-221/222 favorisent la calcification vasculaire (Henning, 2021).

Dans le cadre de l'hypertrophie cardiaque, un sujet qui touche aussi le monde vétérinaire, des études suggèrent que l'angiotensine II stimule la libération d'exosomes par les fibroblastes cardiaques. Ces derniers agissant sur les cardiomyocytes, augmenteraient l'hypertrophie cardiaque par altération de l'expression génique (Lyu *et al.*, 2015). Dans l'étude de Yu, les exosomes issus des cardiomyocytes hypertrophiés produisaient l'IL-6 et l'IL-8 et favorisaient l'inflammation localement (Yu *et al.*, 2020). L'analyse transcriptomique permettait de mettre en évidence une différence de 7 ARNm dans le contenu exosomal des

cardiomyocytes hypertrophiés, dont miR-155 qui intervient dans la régulation de différentes voies kinases et dans l'initiation de l'inflammation par les macrophages.

Le cargo exosomal joue un rôle critique dans la régulation de nombreuses maladies cardiovasculaires grâce au transport de molécules de signalisation. On retrouve dans la **Figure 18** un grand nombre de protéines et d'ARNmi véhiculés par les exosomes au sein du système cardiovasculaire, ayant des effets bénéfiques ou neutres (vert) et ceux exerçant un contrôle délétère quant au développement de ces maladies (rouge).

Figure 18 : Implication des exosomes dans les affections cardiovasculaires (Guo *et al.*, 2020)



Ang-1 : Angiopoïétine 1 ; CCL : chemokine ligand ; HIF : Hypoxia-inducible factor 1-alpha ; HIPK : Homeodomain-interacting protein kinase ; HSP : Heat shock protein ; IL : Interleukine ; ILK : Integrin-linked kinase ; NOS : Oxyde nitrique synthase ; VEGF : Vascular endothelial growth factor

Les exosomes de par leur distribution ubiquitaire, et leur potentiel vectoriel systémique sont des acteurs importants de la pathogénie des affections cardiaques. Ils servent souvent de messagers moléculaires dans le cadre de ces affections et sont à l'origine de certaines modifications phénotypiques secondaires des cellules atteintes.

La diversité des rôles joués par les exosomes dans la régulation des dysfonctions cardiaques est bien trop large pour être exhaustivement étudiée dans notre thèse. On retrouve toutefois dans la littérature des publications visant à compiler ces données (Guo *et al.*, 2020; Henning, 2021; Jadli *et al.*, 2021; Q. Liu *et al.*, 2021) et (**Tableau 9**).

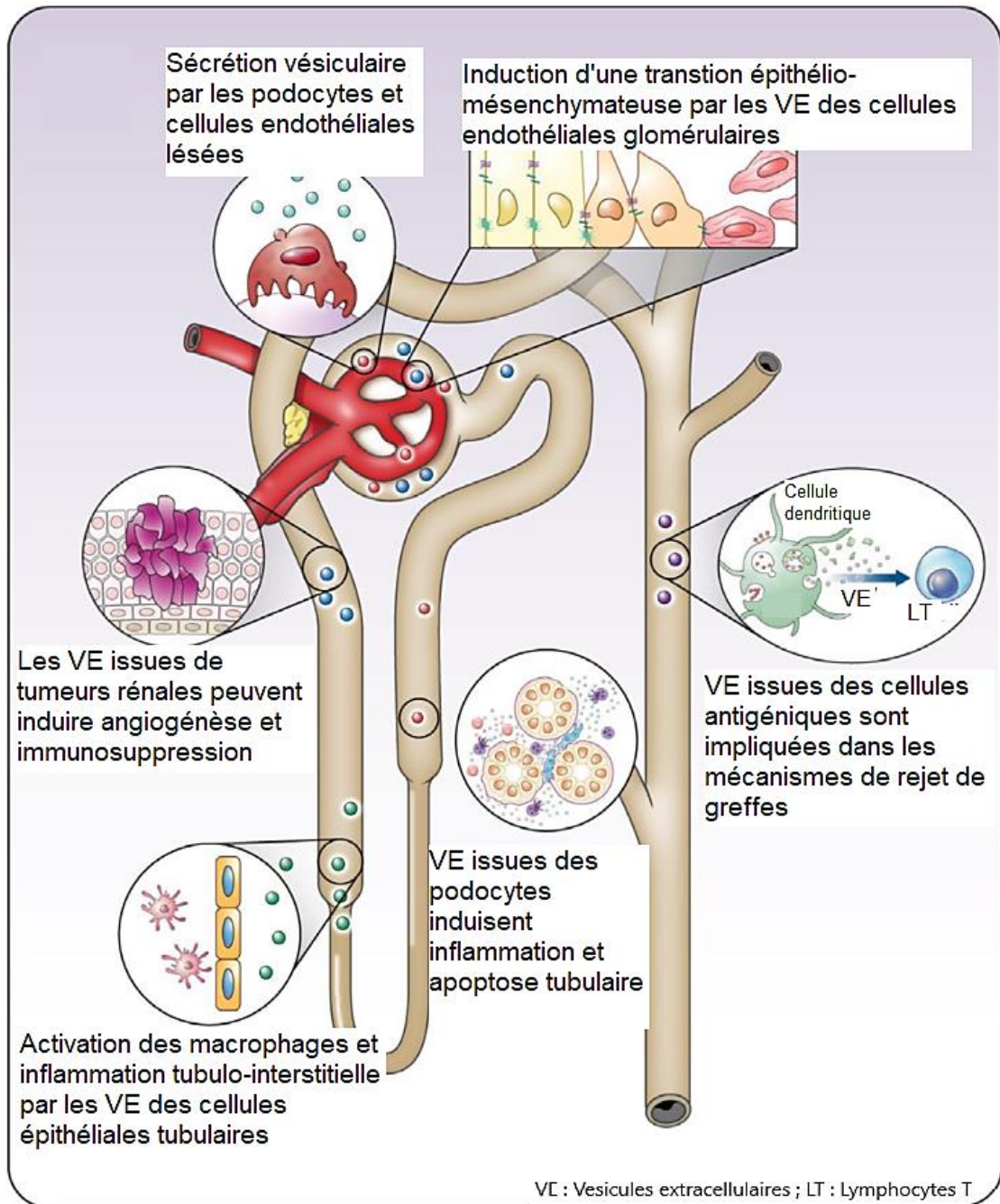
Tableau 9 : Protéines et ARNmi exosomaux impliqués dans les maladies cardiovasculaires (d'après Q. Liu *et al.*, 2021, liste non exhaustive)

Pathologies cardiovasculaires	Cargo exosomal
Fibrose cardiaque	WNT5a, TNF- α , let7-c, miR-19a, miR-21, miR-22, miR-132, miR-144, miR-146a, miR-181b, miR-210, miR-221, miR-294, ARNlnc NONMMUT022555
Pathologies ischémiques	ARNlnc SRA1 ,ARNlnc Mhrt, circ 000,203, circActa2 KLF5, miR-9–5p, miR-20b, miR-92a-3p, miR-128, miR-146a, miR-155, miR-155–5p, miR-221, miR-222, miR-223, miR301a-5p, miR-3129–5p, miR-320, miR-320d, miR-339, ARNlnc GAS5
Lésions d'ischémie/reperfusion	HSP70, miR-21, miR-126,
Insuffisance cardiaque	miR-34a, miR-192, miR-194, miR-92b, miR-146a
Infarctus du myocarde	miR-133a, miR-146a, miR-155, miRNA-214
Hypertrophie cardiaque	HSP20, miR-21, miR-200a

D. Affections rénales

Les exosomes et vésicules extracellulaires interviennent sur les mécanismes régulateurs de la physiologie rénale et au même titre que pour les autres appareils de l'organisme contribuent à la propagation et à l'extension des maladies rénales. Les exosomes sont impliqués à plusieurs niveaux dans les maladies rénales, comme indiqué sur la **Figure 19** : du glomérule jusqu'au tube collecteur, ils agissent en grande partie sur la modulation immunitaire et donc les mécanismes inflammatoires.

Figure 19 : Implication des exosomes dans les affections rénales (d'après S. A. Lee *et al.*, 2021)



- Atteintes glomérulaires

Dans les atteintes glomérulaires, les dommages tubulaires et la fibrose sont les principaux mécanismes s'inscrivant dans le développement terminal de la maladie. On a montré que les VE dérivant des podocytes lésés sont porteurs d'ARNmi et peuvent induire l'apoptose de l'épithélium tubulaire (Jeon *et al.*, 2020). On a ainsi mis en évidence une surexpression de 63 ARNmi dans ces podocytes, et parmi ces ARN, miR-424 et 149, vectorisés par les VE, sont à l'origine de l'apoptose tubulaire. Les ARNmi exosomaux contribuent ainsi au développement des lésions tubulaires dans les atteintes glomérulaires.

Par ailleurs, on a vu que physiologiquement, une exposition trop forte au glucose induit une augmentation de la production vésiculaire au niveau des podocytes (Munkonda *et al.*, 2018). Ainsi, dans les contextes de néphropathies diabétiques, ou globalement d'hyperglycémie, on a montré sur un modèle murin que l'hyperglycémie induit une production de VE par les podocytes, ce qui a pour conséquence d'induire une fibrose tubulaire par phosphorylation (Burger *et al.*, 2014; Munkonda *et al.*, 2018). Dans ce même cadre, on a montré que l'exposition au glucose des cellules épithéliales glomérulaires est à l'origine d'une sécrétion exosomale accrue, sécrétion participant à la différenciation mésenchymateuse des podocytes et donc la dysfonction du filtre glomérulaire (Wu *et al.*, 2017).

- Inflammation tubulo-interstitielle

L'inflammation tubulo-interstitielle est une composante commune des affections aiguës comme chroniques. On a mis en évidence une augmentation significative de la production de miR-19b-3p dans les exosomes dérivant des cellules tubulaires épithéliales dans un modèle d'insuffisance rénale aiguë. Cet ARNmi est à l'origine d'une activation des macrophages et favorise l'inflammation des tubules (Lv *et al.*, 2020). De manière comparable le transfert exosomal de l'ARNm codant la chimiokine CCL2 favorise directement l'inflammation tubulo-interstitielle.

- Lithiases rénales

Les VE seraient par ailleurs impliqués dans les affections lithiasiques. On a mis en évidence que la sécrétion exosomale dans les tubules rénaux est modifiée par la concentration en oxalate dans le milieu. Réciproquement, les exosomes macrophagiques peuvent induire l'activation et la migration des cellules immunitaires par exposition aux oxalates de calcium, en augmentant notamment la production d'IL-8 (Singhto *et al.*, 2018; Singhto et Thongboonkerd, 2018). De plus ces exosomes présentent une capacité accrue à fixer les oxalates en circulation, et pourraient ainsi favoriser l'invasion de l'interstitium rénal et les dépôts lithiasiques. L'étude approfondie des exosomes dans le développement de ces phénomènes lithiasiques représente un enjeu important pour le monde vétérinaire également.

- Fibrose rénale

Enfin on a mis en évidence que les VE jouent un rôle important dans le mécanisme de fibrose, sur de nombreux organes, dont le rein. La fibrose est la modification pathologique terminale des atteintes glomérulaires et tubulaires. Ainsi différents ARNmi favorisent ce processus biologique, les miR-21 et miR-192 impactent la fibrose tubulaire, tandis que le miR-34a favorise la fibrose glomérulaire (S. A. Lee *et al.*, 2021).

On observe que les modifications de l'environnement rénal sont à l'origine d'une modification de la production d'exosomes par les cellules du néphron. Le bagage exosomal altéré entraîne des modifications phénotypiques du parenchyme rénal, en favorisant inflammation et fibrose des cellules du tractus urinaire.

Les exosomes sont alors impliqués dans de nombreuses maladies du système urinaire : lupus, glomérulosclérose, insuffisance rénale aigüe (sepsis ou ischémique), néphropathies diabétiques, insuffisance rénale chronique ou encore polykystose rénale (Thongboonkerd, 2019).

E. Maladies infectieuses

Les exosomes participent activement aux mécanismes de défense immunitaire. On les retrouve ainsi impliqués dans les processus infectieux selon différentes modalités. Ils peuvent intervenir comme vecteurs moléculaires pour les agents infectieux, soit directement par sécrétion vésiculaire par les agents eux-mêmes ou indirectement par le biais des cellules infectées (Hosseini *et al.*, 2013; Schorey et Harding, 2016).

L'implication des vésicules dans ces contextes d'infections virales a été assez intensivement étudiée, notamment du fait de points communs entre virus et exosomes. En effet, le complexe ESCRT est impliqué dans la biogenèse de ces deux types de particules. Le contenu exosomal se retrouve souvent modifié lors d'infections (Urbanelli *et al.*, 2019). Les exosomes peuvent donc faciliter la réplication virale et sa transmission en transportant le code génétique viral et les protéines associées au virus (Urbanelli *et al.*, 2019).

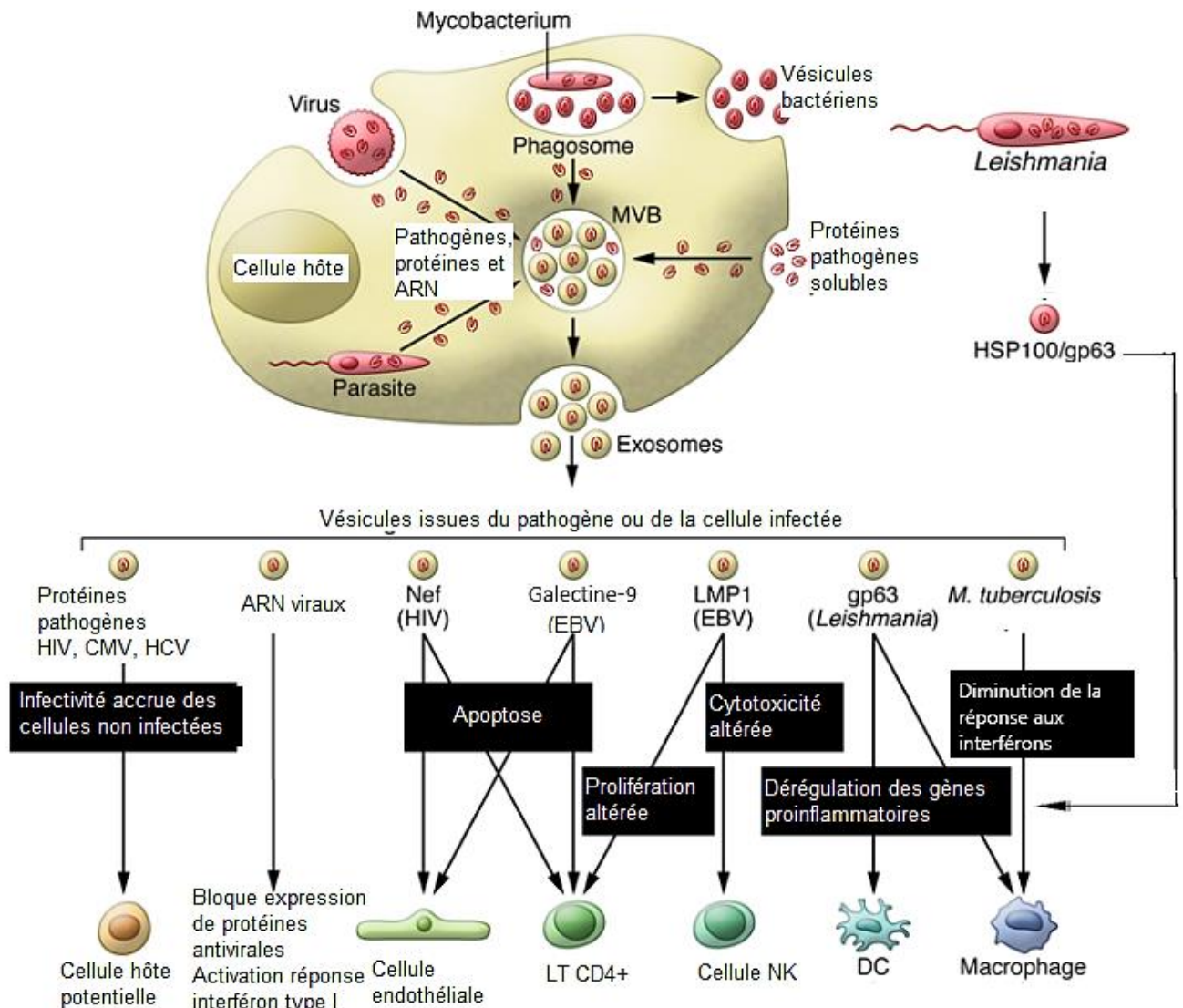
Les exosomes sont impliqués dans les mécanismes de modulations de l'immunité au bénéfice ou au détriment de l'organisme. Sur la **Figure 20**, on peut observer différents processus impliquant des molécules issues de pathogènes et véhiculées par la voie exosomale ou la voie vésiculaire. On observe par exemple les protéines *Negative Regulatory Factor* (Nef) pour le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) et la galectine-9 pour le virus Epstein-Barr, toutes deux à l'origine d'une apoptose des lymphocytes T CD4+. Concernant le HIV, on a montré que les tétraspanines CD63 et CD81 exosomales, participent au bourgeonnement et à la dissémination virale (Hosseini *et al.*, 2013). Aussi en addition à la protéine Nef, la protéine Gag, elle-aussi transportée par les exosomes infectés, est à l'origine d'une apoptose de lymphocytes *in vitro* (Caobi *et al.*, 2020). D'autres exemples sont rapportés dans la littérature, comme la rage (J. Wang *et al.*, 2019), Zika (Zhou *et al.*, 2019) ou encore le virus de l'hépatite C (Ramakrishnaiah *et al.*, 2013 et Figure 21).

On a par ailleurs mis en évidence l'implication des exosomes dans les processus d'infections parasitaires, comme pour *Leishmania donovani* chez la souris. Dans les cas de leishmaniose viscérale, on retrouve une modification du profil sérique en lipoprotéines et cholestérol. En effet un taux élevé de cholestérol sérique est associé à une plus forte résistance à l'infection. Or on a montré la capacité des exosomes issus de *Leishmania* à modifier l'activité de miR-122 dans les cellules hépatiques (Ghosh *et al.*, 2013). Les exosomes du parasite sont porteurs de l'enzyme gp63, qui cible *Dicer1*, empêchant ainsi la formation de miR-122 et réduisant le métabolisme du cholestérol.

Les exosomes sont ainsi décrits dans de nombreux mécanismes agissant sur l'apoptose des cellules immunitaires, la régulation de la réponse inflammatoire, la réduction de

l'efficacité des cellules immunitaires ou même dans la susceptibilité infectieuse des cellules de l'organisme.

Figure 20 : Modulation de la réponse immunitaire par les vésicules extracellulaires (d'après Schorey et Harding, 2016)



CMV : *Cytomegalovirus* ; EBV : Virus Epstein-Barr avec LMP, protéine latente de membrane du virus ; gp : glycoprotéine ; HCV : Virus hépatite C ; HIV : Virus de l'immunodéficience humaine ; HSP : *Heat shock protein* ; LT : Lymphocytes T ; NK : *Natural killer cells* ;

3. Exosomes et biomarqueurs

L'une des limites des techniques de dépistage repose sur la non-accessibilité des tissus et organes endommagés. Des biomarqueurs circulants sont utilisés dans la détection de nombreuses maladies, toutefois ces marqueurs usuels présentent parfois l'inconvénient de ne pas rapporter de manière suffisamment précoce les dysfonctions organiques.

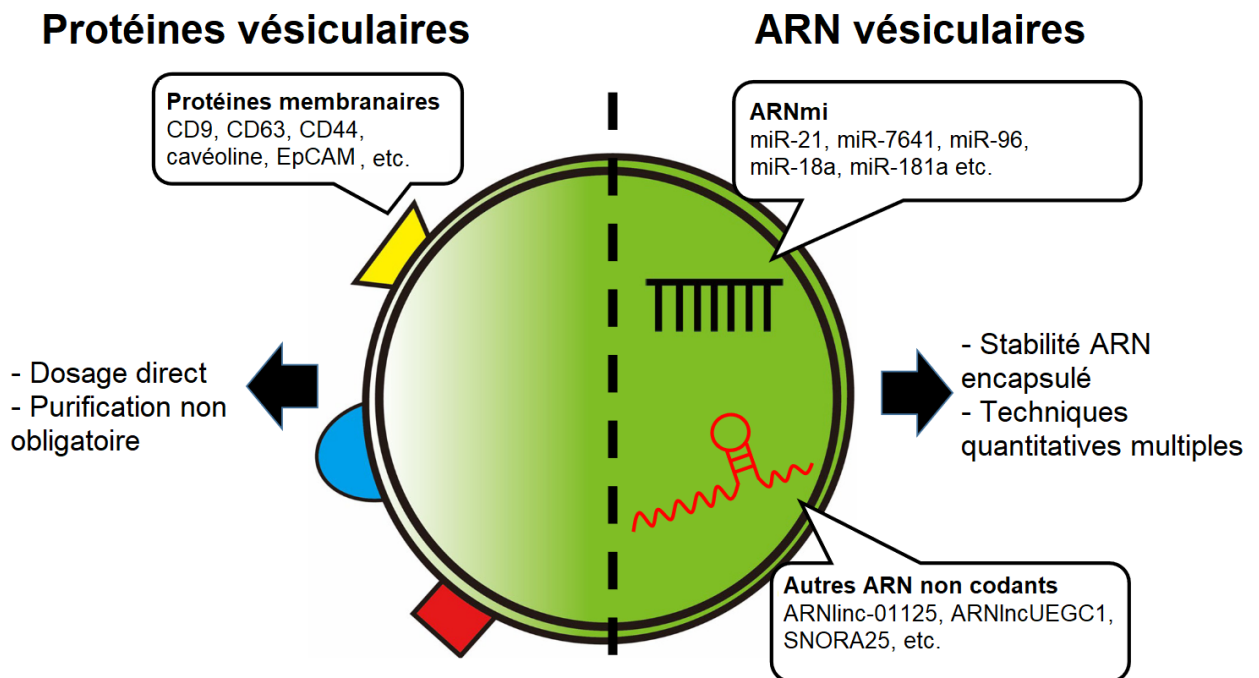
Les exosomes semblent être le reflet de l'expression clinique de nombreuses maladies, mais aussi des cellules qui en sont affectées. Les protéines et les ARN transportés se retrouvent dans la circulation systémique et peuvent alors être utilisés à des fins diagnostiques. Dans la littérature, de nombreuses études s'intéressent déjà aux exosomes circulants en tant que biomarqueurs qui s'inscrivent dans la notion de « biopsie liquide » (Revenfeld *et al.*, 2014). Ce concept de « biopsie liquide » regroupe l'ensemble des examens sanguins qui permettent d'étudier des affections sans avoir recours à des examens plus invasifs.

A. Biomarqueurs néoplasiques

Les exosomes et VE sont étudiés dans de nombreux cas de cancers : les cancers pulmonaires (Rabinowits *et al.*, 2009), prostatiques (Li *et al.*, 2020), colorectaux (Ogata-Kawata *et al.*, 2014) ou encore ovariens (Taylor et Gercel-Taylor, 2008). Contrairement aux fragments d'ADN ou d'ARN circulants, les exosomes présentent l'avantage d'avoir un bagage encapsulé et mieux protégé des potentielles altérations par le milieu (**Figure 21**).

Ainsi l'étude plus spécifique du cargo moléculaire en plus des examens habituels permettrait d'améliorer les informations obtenues sur les tumeurs. Parmi les composants du bagage exosomal, les recherches s'intéressent au dosage et au suivi des protéines et ARN, présentant comme avantages respectifs d'être accessibles et stables sous forme encapsulée.

Figure 21 : Biomarqueurs issus du cargo exosomal (modifié de Urabe *et al.*, 2020)



- Modèle diagnostique unique

Le miR-21 est décrit comme marqueur de différentes atteintes malignes. En effet selon Tanaka et son équipe (2013), l'expression de miR-21 est augmentée dans le sérum de patients atteints de carcinome œsophagien, mais elle est encore plus modifiée dans le cargo exosomal. Le dosage de cet ARN dans ce contexte permet par ailleurs de distinguer les stades plus avancés de la maladie.

On observe de pareilles modifications dans le cadre du carcinome hépatocellulaire. En effet le taux de miR-21 exosomal est significativement plus élevé chez les patients avec une atteinte maligne comparativement à des patients sains ou atteints d'une maladie inflammatoire comme l'hépatite B (Wang *et al.*, 2014).

Ainsi le miR-21 représente un candidat au fort potentiel pour la détection précoce des tumeurs malignes. Une méta-analyse de 26 études a mis en évidence que le dosage du miR-21 exosomal permettait d'obtenir de bonnes données de sensibilité/spécificité de détection dans plusieurs cas de cancer, dont les cancers gastriques, pancréatiques, digestifs ou encore pulmonaires (**Tableau 10**).

Tableau 10 : Performance diagnostique de miR-21 exosomal (d'après F. Liu *et al.*, 2021)

Type de cancer	Sensibilité (IC à 95%)	Spécificité (IC à 95%)
Digestif	0,77 (0,68 ; 0,84)	0,78 (0,71 ; 0,84)
Pancréatique	0,85 (0,71 ; 0,93)	0,84 (0,69 ; 0,92)
Adénocarcinome pancréatique	0,76 (0,68 ; 0,84)	0,74 (0,61 ; 0,85)
Gastrique	0,65 (0,53 ; 0,75)	0,77 (0,65 ; 0,87)
Mammaire	0,76 (0,58 ; 0,89)	0,85 (0,69 ; 0,95)
NSCLC	0,70 (0,64 ; 0,77)	0,78 (0,64 ; 0,88)
Autres	0,71 (0,65 ; 0,78)	0,87 (0,79 ; 0,92)
Global	0,76 (0,70 ; 0,81)	0,82 (0,77 ; 0,87)

NSCLC : Non small cell lung cancer

L'ARNmi exosomal représente ainsi un bon marqueur pour le suivi des atteintes tumorales, mais l'utilisation d'un ARNmi unique n'apporte pas nécessairement toutes les données désirées. Par ailleurs, certaines études s'appuient uniquement sur la culture *in vitro* de lignées tumorales. Pour pouvoir transposer ces résultats à un contexte clinique, la multiplication ou le croisement de différents marqueurs autoriserait une meilleure détermination des paramètres de suivi. Par exemple, la combinaison d'une analyse cytologique au dosage de miR-21 dans le cadre de l'adénocarcinome pancréatique permet d'obtenir une sensibilité de 93%, plus forte que le dosage de l'ARNmi seul (F. Liu *et al.*, 2021).

- Biomarqueurs plasmatiques

Cette partie s'appuie sur l'étude de différents ARNmi dans le cadre du cancer du poumon, mais on retrouve des observations comparables dans d'autres atteintes.

Concernant le cancer des poumons, un modèle diagnostique basé sur deux ARNmi (miR-1268b et 6075) a été proposé et rapporte des hauts niveaux de spécificité et sensibilité (jusqu'à 99%), indépendamment du type histologique ou du stade du cancer. On a montré par ailleurs que les taux d'ARNmi diminuent après résection chirurgicale, quand elle est possible, suggérant une implication de ces exosomes dans le développement de la maladie (Asakura *et al.*, 2020a).

L'étude des ARNmi permettrait par ailleurs de détecter rapidement les sous-types de malignité, et d'identifier les cellules tumorales susceptibles de présenter des résistances thérapeutiques. Zheng et son équipe ont mis en évidence que deux ARNmi (miR-1246 et miR-96) étaient significativement augmentés dans les cas de cancer du poumon non à petites cellules. De plus le taux de miR-96 était significativement plus élevé chez les patients présentant un cancer radio-résistant mais était aussi corrélé à l'importance de l'invasion vasculaire et à des taux de survie plus faibles (Zheng *et al.*, 2021).

Ces différentes informations mises en association, on peut observer que l'étude de pool d'ARNmi exosomaux et/ou totaux révèle un potentiel suffisant pour diagnostiquer des affections malignes, en fournissant par ailleurs des informations capitales quant au type tumoral et aux possibilités thérapeutiques pour lutter contre cette atteinte. Toutefois on peut observer certaines limites quant au croisement de ces études. Plusieurs ARN différents apportent des informations significatives en termes de diagnostic, de pronostic, de pathogénie ou encore de thérapeutique, mais le recoupement de ces informations nécessite une concordance des conditions pré-analytiques en amont, et une adaptation pour le dosage en clinique en aval.

- Biomarqueurs urinaires

On retrouve par ailleurs dans la littérature l'utilisation d'exosomes urinaires pour la détection de tumeurs malignes.

Ainsi dans le cadre du cancer prostatique, on a mis en évidence que trois ARNmi (miR-21, miR-375 et let-7c) étaient significativement augmentés dans les exosomes urinaires chez les individus malades. Par ailleurs la combinaison de miR-21 et miR-375 permettait d'obtenir de bonnes valeurs prédictives quant à la détection du cancer (Foj *et al.*, 2017).

Comparativement l'étude de Zhuo Li sur les ARNmi exosomaux urinaires a révélé une expression modifiée de quatre ARNmi (miR-375, miR-451a, miR-486-3p et miR-486-5p). Cette combinaison permettait d'obtenir une sensibilité de 91% et une spécificité de 89% pour la détection de cancers prostatiques. Cette étude souligne par ailleurs la possible utilisation de miR-375 en combinaison avec miR-451a pour distinguer cancer prostatique et hyperplasie bénigne. Enfin miR-375 permettrait de faire la distinction entre cancer prostatique localisé, et sa forme métastasée (Li *et al.*, 2021).

Les auteurs soulèvent toutefois des disparités de résultats concernant les dosages de miR-375 ; selon les études, miR-375 serait sous exprimé, ou surexprimé. Cette anomalie pourrait être liée à des différences de méthodes d'analyses, une non concordance entre les cohortes, ou encore due au caractère fluctuant de miR-375, qui pourrait à la fois intervenir comme oncogène ou comme oncosuppresseur.

Pour étudier le pronostic associé au cancer prostatique, une autre étude a mis en évidence la surexpression de trois ARNm chez les patients présentant une récurrence biochimique, c'est-à-dire une rechute. Parmi ces derniers, miR-532-5p est le marqueur significativement associé à une récurrence du cancer (Kim *et al.*, 2021). Il pourrait donc servir de marqueur pronostique négatif du cancer prostatique après résection chirurgicale.

- Combinaison de marqueurs et oncologie comparative

Dans le cadre du cancer du sein, le miR-7641 a été identifié dans les processus de progression tumorale et d'apparition métastatique par communication intercellulaire. Il est particulièrement élevé chez les patients atteints de cancer du sein avec métastases comparativement aux patients sans métastases. De plus, il apparaît que cet ARNm permet de distinguer les populations d'individus présentant des métastases à distance, alors que dans cette même étude des marqueurs usuels (l'antigène carcinoembryonnaire et l'antigène tumoral 15-3) ne le permettaient pas. L'utilisation de miR-7641 comme marqueur prédictif non invasif du cancer du sein semble prometteuse (Shen *et al.*, 2021).

Des méthodes récentes permettent par ailleurs de doser certaines protéines de surfaces (CD44, CD9 et EpCAM) et de faire la distinction entre plusieurs sous-types tumoraux *in vitro* (Y. Wang *et al.*, 2021). La particularité de cette étude repose sur le fait que la méthode par spectrométrie de masse permettrait de distinguer deux souches de cellules cancéreuses en dosant les protéines de surface exosomale : d'une part la lignée MCF-7, correspondant aux cancers exprimant des récepteurs hormonaux œstrogénique et progestéronique ; d'autre part la lignée MDA-MB-231, ne possédant pas ces récepteurs. Les cellules parentales présentent des profils protéiques similaires pour ces trois marqueurs alors que leurs exosomes présentent des profils différents.

Dans le cadre de l'étude des biomarqueurs de cancer, il est intéressant de rechercher des modèles de maladies spontanées chez l'animal, suffisamment proches des maladies rencontrées chez l'humain.

En 2018, l'étude d'une lignée cellulaire de cancer mammaire canin a permis de mettre en évidence des différences de profils ARN entre exosomes de cellules tumorales et cellules saines. Les profils diffèrent pour plus de 300 ARNm avec des surexpressions et des sous-expressions diverses. Plus particulièrement cette étude soutient l'utilisation potentielle comme biomarqueurs de trois ARNm présentant des variations plus importantes (miR-18a, miR-19a et miR-181a) (Fish *et al.*, 2018). Par ailleurs, ces derniers sont aussi impliqués dans la pathogénie du cancer, notamment en intervenant sur l'expression du récepteur œstrogénique ESR1 α .

Ces recherches s'intéressent aussi à l'étude du cargo des exosomes comparativement aux ARNm libres : des disparités existent entre ces deux pools.

Pour exemple, on a montré que les taux de miR-214 et miR-126 libres représentaient des marqueurs potentiels de cancer mammaire canin et qu'ils étaient tous deux augmentés dans ce cas (Heishima *et al.*, 2017). Paradoxalement, l'étude de Fish met en évidence au sein des exosomes une augmentation de miR-126 mais une diminution de miR-214. Cette divergence reposerait sur une sécrétion de cet ARNm par d'autres lignées malignes, ou d'une hétérogénéité des profils ARN entre cellules tumorales, exosomes et pool circulant.

Ces observations mettent ainsi en évidence le fort potentiel d'utilisation de l'ARN exosomal comme biomarqueur de cancers avec toutefois comme bémol, la nécessité de déterminer les mécanismes impliqués dans les disparités entre cellules tumorales, exosomes et pool d'ARN circulant.

- Biomarqueurs en oncologie vétérinaire

Concernant le domaine vétérinaire, on retrouve peu d'études spécifiquement dédiées à la pathologie animale.

Dans le cadre de l'ostéosarcome canin, une étude protéomique concerne un ensemble de 170 protéines. Elle a révélé que la comparaison du taux de dix protéines exosomales parmi les 170 présélectionnées permettaient de différencier le sérum de chiens atteints d'ostéosarcome de celui de chiens atteints de fractures non néoplasiques ou encore de chiens sains, avec une précision de 85%.

Par ailleurs, il est possible de distinguer les différents stades d'évolution de la maladie. Le dosage exosomal de la protéine serpine D1 et du complément C6-CMH-III permet d'obtenir une précision de 77% pour la détection des différents stades de la maladie, à savoir post-diagnostic, post-amputation, et au moment du diagnostic de métastase. Les observations sont très intéressantes, mais l'étude manque grandement de puissance statistique pour aboutir à des résultats fiables. La répétition de cette analyse à plus grande échelle est nécessaire pour pouvoir s'appuyer sur ces premiers résultats (Brady *et al.*, 2018).

Une étude portant sur des lignées cellulaires de tumeurs lymphoïdes canines montre que malgré une forte ressemblance des profils en ARN et protéines dans les différentes lignées de lymphomes, des disparités sont présentes, et permettraient de faire la différence entre tumeurs sensibles ou non à la vincristine, une autre molécule de chimiothérapie (miR-151 ,8908a-3p 486 et la protéine CD82)(Asada *et al.*, 2019). Par ailleurs, l'observation de la présence de ces marqueurs différents entre exosomes de tumeurs sensibles et de tumeurs résistantes peut être le reflet de molécules impliquées dans la résistance thérapeutique et l'échappement immunitaire, et donc servir de matériel à la compréhension des mécanismes impliqués.

Enfin, l'équipe de Husna a étudié l'utilisation potentielle d'ARNmi exosomaux pour la détection du mélanome oral chez le chien, une affection assez représentée parmi les cancers de la cavité buccale. Ils ont mis en évidence que deux ARNmi (miR-143 et miR-221) étaient significativement augmentés dans les exosomes plasmatiques de chiens atteints de mélanome métastatique (Husna *et al.*, 2021).

On retrouve l'ensemble des données ci-dessus dans le **Tableau 11**. Ces études regroupent des modèles de néoplasies humaines, qui représentent le plus gros pool de recherche, ainsi que certaines études dédiées spécifiquement à l'étude de néoplasies vétérinaires.

Tableau 11 : Biomarqueurs exosomaux en oncologie

Type de cancer	Molécule étudiée	Référence
Hépatique	miR-21	Wang et al. 2014
Pulmonaire	miR-1268b, miR-6075	Asakura et al. 2020
	miR-1246, miR-96	Zheng et al. 2021
	ARNlinc01125	Xian et al. 2021
Prostatique	miR-375, miR-21, let-7c	Foj et al. 2017
	miR-375, miR-451a, miR-486-3p, miR-486-5p	Li et al. 2021
	miR-26a-5p, 532-5p, 99b-3p	Kim et al. 2021
Mammaire	miR-7641	Shen et al. 2021
	miR-1246, miR-206, miR-24, miR-373	Jang et al. 2021
	CD44, CD9, EpCAM	Wang et al. 2021
	miR-18a, miR-19a, miR-181a, miR-126, miR-214	Fish et al. 2018
Ostéosarcome	10 protéines, dont serpine D1 et C6-CMH-III	Brady et al. 2018
	miR-151, miR-8908a-3p, miR-468 et protéine	
Lymphomes	CD82	Asada et al. 2019
Mélanome oral	miR-143, miR-221	Husna et al. 2021
Carcinome oesophagien	miR-21	Tanaka et al. 2013
Multiple (pancréatique, gastrique, mammaire, pulmonaire, digestif)	miR-21	Liu et al. 2021

En gras sont indiquées les études de pathologies vétérinaires

Pour résumer, toutes ces études permettent de mettre en évidence l'utilisation potentielle des exosomes en oncologie, pour la détection, le pronostic, ou encore le suivi de nombreuses atteintes tumorales. L'avantage majeur de l'utilisation des exosomes repose sur la possibilité de réaliser des examens bien moins invasifs et contraignants que certaines procédures utilisées pour les atteintes tumorales (biopsies, imagerie avec contraste).

Par ailleurs le dosage du cargo exosomal permet d'obtenir des marqueurs précoces des affections ou de leur évolution, parfois antérieurement aux marqueurs plasmatiques utilisés couramment (Antigène carcinoembryonnaire, antigène tumoral 15-3, antigène spécifique prostatique).

La grande limite de l'utilisation des exosomes repose sur la reproductibilité et la standardisation des méthodes mises en œuvre ainsi que le manque encore important de données concernant les mécanismes impliqués. Par ailleurs parmi les recherches, une grande partie d'entre elles s'appliquent à l'étude du cargo exosomal sur des souches de lignées tumorales, et donc à l'obtention de résultats *in vitro*. La transposition des résultats à une application clinique nécessitera de vérifier ces observations dans un contexte où une multitude d'exosomes circulent conjointement, avec des échantillons plus importants.

B. Biomarqueurs neurologiques

Comme pour les atteintes tumorales, l'enjeu de la détection des maladies neurologiques et neurodégénératives est d'obtenir des marqueurs suffisamment précoces pour pouvoir mettre en place des moyens thérapeutiques visant à ralentir leur progression.

- Suivi de la maladie d'Alzheimer

On rapporte d'ores et déjà de très nombreuses itérations de l'utilisation des exosomes comme potentiels marqueurs de la maladie d'Alzheimer. Ainsi de nombreux ARNnc (*BACE1-AS*, *51A*, *17A*, *NDM29*, *BC200*, miR-135a, miR-34b, miR-125b et miR-130b) et protéines exosomales (GAP43, neurogranine, SNAP25 and synaptotagmine 1) sont rapportés comme potentiels biomarqueurs (Barbagallo *et al.*, 2020; Mosquera-Heredia *et al.*, 2021).

Par ailleurs, les protéines supposées impliquées dans la maladie d'Alzheimer, à savoir l'A β et la protéine Tau sont en partie véhiculées par les exosomes (voir I.2.b ci-dessus). On a ainsi montré que le suivi exosomal du niveau de A β et de protéine Tau phosphorylée permettrait de diagnostiquer la maladie d'Alzheimer (Jia *et al.*, 2019).

Parmi toutes ces études certaines rapportent que l'utilisation des protéines exosomales (GAP43, neurogranine, SNAP25 and synaptotagmine 1) permettrait d'obtenir un diagnostic prédictif bien en amont de l'apparition des signes de déficience cognitive. Ces protéines font toutes partie intégrante du fonctionnement de système nerveux, en intervenant dans la croissance cellulaire, la réparation axonale ou la transmission synaptique. En analysant les exosomes de prélèvements antérieurs de patients atteints entre 2016 et 2018, on a montré que les dosages protéiques sanguins étaient corrélés au dosage du liquide cébrospinal, et que ces dosages permettaient de prévoir l'apparition d'un déficit cognitif 5 à 7 ans avant l'apparition des signes cliniques (Jia *et al.*, 2021). Cette observation fait écho à une autre étude préalable qui mettait aussi en évidence une dysfonction lysosomale et des modifications de protéines exosomales jusqu'à 10 ans avant l'apparition de signes cliniques (Goetzl *et al.*, 2015).

Une étude s'appuie sur une méthode originale de diagnostic en dosant les exosomes salivaires. Cette étude met en évidence une augmentation significative de la concentration en exosomes pour les patients atteints de la maladie d'Alzheimer ou de déficience cognitive légère. Par ailleurs, au sein de ces exosomes, les taux d'oligomères d'A β , et protéine Tau étaient significativement augmentés chez les patients malades par rapport au groupe contrôle. On observe par ailleurs une corrélation négative entre ces taux mesurés et les scores cliniques des patients de l'étude, révélant ainsi une dégradation de la maladie lorsque les taux d'exosomes augmentent (Rani *et al.*, 2021). L'étude du cargo des exosomes salivaires pourrait représenter une méthode non invasive de la détection précoce de la maladie mais aussi de son suivi longitudinal.

- Suivi de la maladie de Parkinson

Concernant la maladie de Parkinson, des marqueurs exosomaux ont aussi été proposés. De manière comparable à la maladie d'Alzheimer, le taux exosomal des molécules impliquées dans la pathogénie représente un biomarqueur potentiel.

Le suivi de l' α -syn et de la clustérine permettrait la différenciation entre patients atteints de Parkinson et patients atteints d'autres maladies présentant les mêmes troubles phénotypiques (Jiang *et al.*, 2021). De manière comparable l'étude de Agliardi soutient aussi une augmentation de l' α -syn exosomale, en association avec une diminution de deux protéines de fusion vésiculaire, chez les patients atteints de la maladie de Parkinson (Agliardi *et al.*, 2021).

En rapport avec les profils ARN des exosomes issus des neurones, on a mis en évidence une modification de l'expression de tout un groupe d'ARNmi (let7d, 15b, 24, 142-3p, 181c, 222). L'expression de ces ARNmi était augmentée chez les patients atteints de la maladie de Parkinson, par rapport au groupe contrôle. Par ailleurs, il y avait une disparité de l'expression de miR-23a et miR-181c entre maladie de Parkinson et syndrome parkinsonien atypiques (Barbagallo *et al.*, 2020).

En outre, le dosage de certains ARNmi exosomaux salivaires a aussi été exploré concernant la maladie de Parkinson. Deux études rapportent notamment que le taux exosomal d'oligomères α -syn, et de deux ARNmi (153 et 223) sont des marqueurs potentiels de la maladie de Parkinson dans la salive (Cao *et al.*, 2019; Cressatti *et al.*, 2020)

Toutes ces découvertes reposent sur la capacité des exosomes neuronaux à dépasser la barrière hémato-encéphalique, dont l'accès est peu aisé (Zhuang *et al.*, 2011). Le diagnostic actuel des maladies neurodégénératives repose en grande partie sur des observations cliniques. Aussi, l'établissement de signatures ARN exosomales spécifiques représente une avancée importante pour le diagnostic de ces maladies (Barbagallo *et al.*, 2020). Il reste toutefois nécessaire de mettre en place des études supplémentaires pour explorer le potentiel exosomal quant au suivi longitudinal des maladies neurodégénératives.

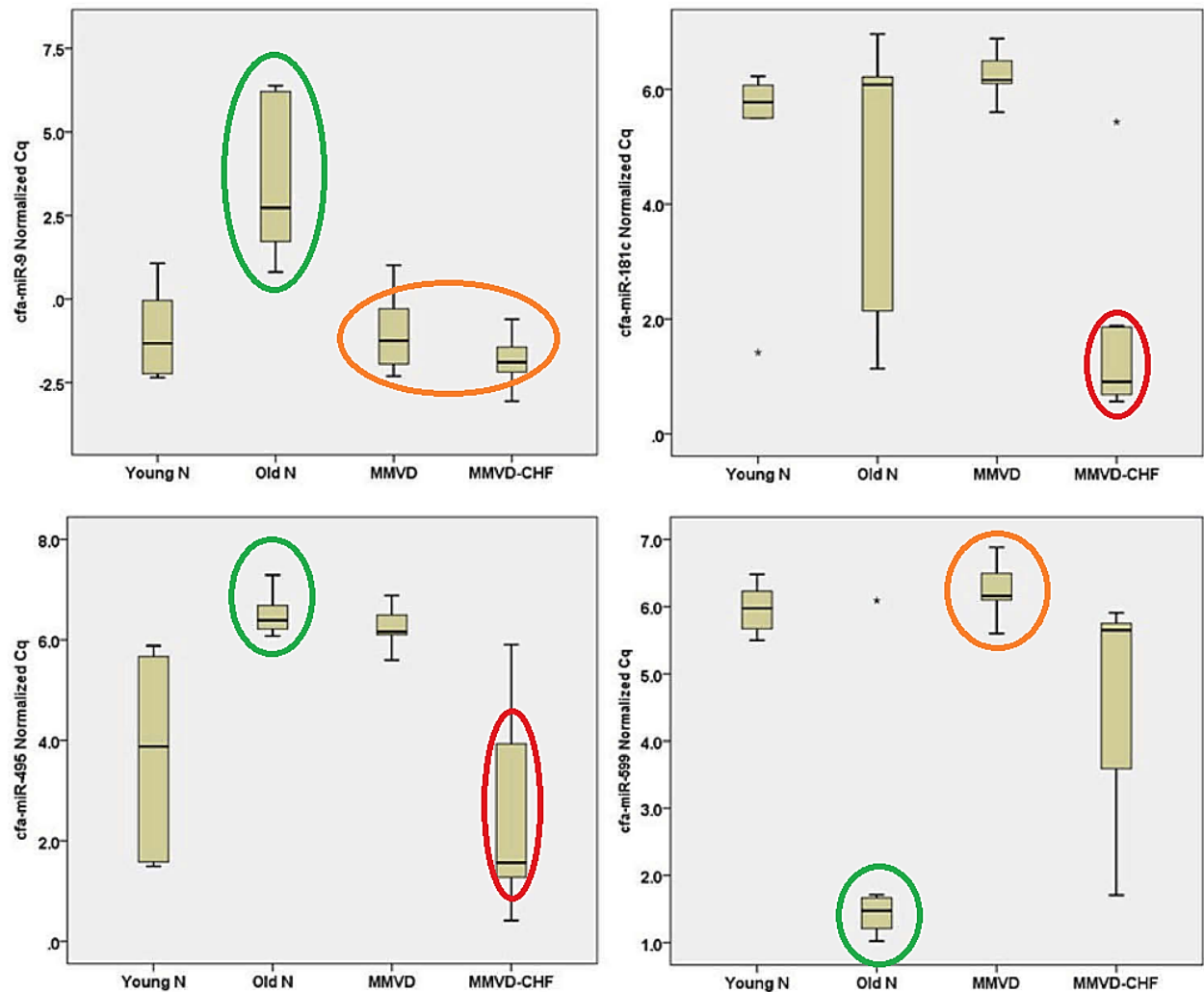
- Myélopathie dégénérative du chien

Concernant les affections animales, on utilise un modèle de myélopathie dégénérative canine pour l'étude de la maladie de Charcot. On a montré dans le cadre de la forme canine, que le suivi plasmatique de deux protéines exosomales associées à la maladie (TDP-43 et SOD1) pourrait être utilisé pour investiguer l'atteinte. En effet cette maladie repose notamment sur l'accumulation de la protéine TDP-43 et sur la dérégulation du gène *SOD1*. Or dans cette étude, les mesures des protéines exosomales étaient significativement augmentées dans le plasma, comme dans les prélèvements de moelle épinière (Pfeiffer *et al.*, 2021).

C. Biomarqueurs cardiovasculaires

En médecine vétérinaire, on trouve une étude concernant les maladies valvulaires dégénératives à différents stades évolutifs. Ainsi Yang met en évidence une modification du profil ARN entre chiens atteints de maladie valvulaire avec, et sans insuffisance cardiaque, et les chiens sains (**Figure 22**). Il souligne l'augmentation significative de deux ARNmi (miR-181c et miR-495) dans le cadre d'une insuffisance cardiaque (en rouge). Par ailleurs l'examen du niveau de miR-9 et miR-599 permet de différencier les chiens malades, avec ou sans insuffisance cardiaque, des chiens non malades (en orange)(V. K. Yang *et al.*, 2017). Un constat secondaire mais intéressant repose sur la mise en évidence d'une variation des profils entre chiens âgés et jeunes chiens (miR-9, 495 et 599, en vert). La dérégulation des ARNmi en amont de l'apparition des maladies est potentiellement liée à leur action dans le développement pathologique.

Figure 22 : Expression d'un pool de quatre ARNmi dans un contexte de maladie valvulaire dégénérative chez le chien (V. K. Yang *et al.*, 2017)



La valeur en ordonnée normalisée au Cq est inversement proportionnelle à l'expression des ARN : valeur faible = ARNmi fortement représenté ; valeur élevée = ARNmi faiblement représenté

Young N : jeune chien adulte sain, Old N : Chien adulte âgé non malade ; MMVD : Chien atteint de maladie valvulaire dégénérative sans insuffisance cardiaque ; MMVD-CHF : Chien adulte présentant une maladie valvulaire et une insuffisance cardiaque

Chez le chien, une seconde étude s'est appliquée au suivi de la toxicité induite par la doxorubicine sur les cardiomyocytes. La doxorubicine est une molécule de chimiothérapie, couramment utilisé en oncologie, mais possédant comme inconvénient majeur de présenter une toxicité cardiaque en dose cumulée. Dans cette étude le protocole inclut 5 doses consécutives de doxorubicine séparées de deux semaines, avec des suivis de la troponine cardiaque et des suivis échographiques, avec en plus un dernier contrôle à 1 mois post-traitement.

On observe que l'expression de quatre ARNmi (miR-107, 146a, 181d et 502) est modifiée après traitement à la doxorubicine. Ces ARNmi seraient impliqués dans les mécanismes de protection contre l'inflammation et de régulation de la fonction cardiaque, mais leurs rôles respectifs ne sont pas encore établis avec certitude.

Toutefois il est intéressant de noter que les modifications significatives échocardiographiques et du niveau de troponine ne sont visibles qu'un mois après la fin du traitement alors qu'on observe une surexpression du miR-502 exosomal dès la troisième dose de doxorubicine. Le suivi ARN pourrait servir de marqueur précoce de la dysfonction cardiaque dans ce contexte thérapeutique.

Ils ont par ailleurs observé une corrélation entre l'augmentation de miR-181d et une diminution de la fraction d'éjection systolique du ventricule gauche (Beaumier *et al.*, 2020). Cet ARN serait impliqué dans la diminution des mécanismes de réparation du cœur. L'augmentation du niveau de miR-181d pourrait être suivie de manière longitudinale en parallèle des modifications échographiques.

Concernant les maladies cardiovasculaires en médecine humaine, la littérature est bien plus fournie. On retrouve des biomarqueurs exosomaux décrits dans différentes atteintes, les maladies coronariennes, les insuffisances cardiaques, les infarcti myocardiques, les atteintes vasculaires cérébrales ou encore d'autres myocardiopathies (Zarà *et al.*, 2020).

Enfin, un constat original concerne plusieurs études qui ont mis en évidence une modification des composants du cargo exosomal urinaire lors d'atteintes de la sphère cardiaque (Agudiez *et al.*, 2020; Cheng *et al.*, 2012). Une étude sur un modèle d'infarctus du myocarde chez le rat révèle une augmentation sérique de miR-1 suite à un infarctus. Cet ARNmi est supposément impliqué dans plusieurs mécanismes de développement de l'infarctus aigu du myocarde. De manière intéressante, l'ARNmi est en partie éliminé par voie urinaire, et le dosage de cet ARNmi dans les urines est significativement augmenté chez les patients présentant un infarctus. Ainsi le taux exosomal de miR-1 urinaire est corrélé au taux exosomal sérique et pourrait représenter un nouveau marqueur de l'atteinte cardiaque (Cheng *et al.*, 2012).

D. Biomarqueurs urinaires

Physiologiquement les cellules du tractus libèrent des VE dans l'urine, faisant du profil vésiculaire un outil valide pour suivre la bonne santé de l'appareil urinaire (van Balkom *et al.*, 2011; Weber *et al.*, 2010).

Ichii *et al.* (2014) ont étudié le profil en ARN de l'urine dans le cortex et la médulla chez le chien et le chat. Ils ont mis en évidence des disparités d'expression principalement en ARNmi dans les différentes zones du rein. En médecine vétérinaire, des marqueurs courants du suivi de la fonction rénale sont l'urée et la créatinine. Toutefois ces suivis biochimiques ne permettent pas de faire de discrimination dans l'atteinte rénale, et leurs augmentations interviennent généralement lorsque l'atteinte rénale est déjà avancée. Aussi en s'appuyant sur l'observation d'une variabilité des pools d'ARNmi, chez le chien et le chat, cette équipe a mené deux études sur l'analyse des séquences ARN lors d'affections chroniques du rein.

Chez le chien, un panel d'ARNmi a été choisi, sur la base d'études préalables sur la souris et du séquençage de l'étude. Il est rapporté qu'une diminution significative de trois ARNmi (miR-26a et de miR-10a et miR-10b) ainsi qu'une augmentation significative de miR-21a dans les exosomes urinaires est associée à l'existence d'une maladie rénale chronique. Cette atteinte chronique est objectivée par une augmentation de l'urée et de la créatinine sérique, ainsi qu'une diminution de la créatinine urinaire.

De plus, le suivi du taux de miR-26a est négativement corrélé à la gravité de l'atteinte. Le miR-26a serait impliqué dans la formation du cytosquelette et dans la différenciation des

podocytes chez la souris. Une dégradation du parenchyme glomérulaire serait donc à l'origine d'une diminution de sa production.

Au sein du tissu rénal l'ensemble des ARNmi étudiés sont négativement corrélé à la dégradation de la fonction rénale et à l'aggravation des lésions histologiques. On peut toutefois noter que la diminution de miR26a et miR10a/b est plutôt associée à l'atteinte glomérulaire, tandis que miR21a et miR-10b sont plutôt associés à une atteinte tubulo-interstitielle.

Les profils ARN exosomaux ou tissulaires permettraient donc de mettre en évidence des atteintes fonctionnelles et des lésions histologiques du rein. Les deux ARNmi, miR-26a et miR-21a sont les deux marqueurs les plus significatifs d'une atteinte glomérulaire et tubulo-interstitielle respectivement (Ichii *et al.*, 2017).

Pour l'espèce féline, on a obtenu des résultats comparables. On met en évidence une diminution significative dans les exosomes urinaires de trois ARNmi (let-7b, miR-22 et miR-26a) chez les chats atteints d'affections rénales débutantes. L'analyse du taux de miR-21a normalisé par rapport à la clairance rénale révèle qu'il est significativement augmenté chez les chats atteints d'une affection chronique. Par ailleurs on observe une corrélation significative entre les ratios miR-181a/let-7b et miR-21a/let-7b et la progression de la dysfonction métabolique, objectivée ici encore par une dégradation des paramètres biochimiques (Ichii *et al.*, 2018).

Les ARNmi urinaires dérivant des exosomes représentent donc un nouvel outil diagnostique potentiel des atteintes rénales, ici mises en évidence chez le chien et le chat, la modification des profils exosomaux pouvant être le reflet d'une dysfonction de la fonction rénale. Une des limites de l'étude des exosomes urinaires repose sur la détermination de l'origine cellulaire du dosage effectué. Des données supplémentaires sur les profils exomaux des cellules de l'uretère et de la vessie seront nécessaires pour faire le distinguo entre les différentes informations recueillies (Ichii *et al.*, 2018).

E. Autres biomarqueurs

Les biomarqueurs exosomaux ne se limitent pas aux affections ci-dessus. D'autres études s'intéressent notamment aux dosages du cargo exosomal dans le cadre de maladies inflammatoires (Chan *et al.*, 2019), infectieuses (Mosquera-Heredia *et al.*, 2021; Schorey et Harding, 2016) ou métaboliques (Castaño *et al.*, 2019) affectant des organes comme l'œil (Liu *et al.*, 2020), le foie (Zhou *et al.*, 2022), ou encore la peau (Khan *et al.*, 2020).

Concernant le domaine vétérinaire, l'utilisation des profils exosomaux pour la conduite d'élevages bovins a été explorée. L'étude des profils de vaches a révélé des variations au moment de la reproduction et dans les périodes à haut risque métabolique (Almughlliq *et al.*, 2019 ; Turner *et al.*, 2021). Cependant les données restent descriptives, mais ont l'avantage de proposer un échantillon accessible, le lait (Turner *et al.*, 2021).

Dans ce contexte, l'équipe d'Almughlliq a menée trois études parallèles portant sur les infections utérines et le risque de dysfonction métabolique. Ils ont mis en évidence sur un modèle d'infection utérine à *Trueperella pyogenes*, une diminution de la production de prostaglandines PGF2 α par les cellules endométriales, cette diminution étant reliée aux exosomes circulants (Almughlliq *et al.*, 2017). Le protéome exosomal présente par ailleurs une variation sur un total de 21 protéines, avec 8 protéines spécifiques de la bactérie que l'on ne retrouve pas chez les vaches non infectées (Almughlliq *et al.*, 2018). L'étude

spécifique de ces protéines et leur dosage permettraient d'aboutir à un marqueur précoce des infections utérines, modèle transposable à d'autres infections comme *Escherichia coli*.

Enfin on a observé que les exosomes issus de vaches à hauts risques métaboliques sont à l'origine d'une diminution significative de l'expression d'un ensemble de protéines inflammatoires dans les cellules endométriales. Trois autres protéines liées au risque infectieux et à la maturité de l'utérus sont exprimées différemment en cas de haut risque métabolique (serpine A3-7, domaine en hélice 88A et chaînes inhibine/activine). Le dosage des exosomes transportant ces protéines représente donc un biomarqueur potentiel de la santé de la vache et de son statut métabolique (Almughlliq *et al.*, 2019).

Dans l'idée d'explorer les dysfonctions chez la vache, on a mis en évidence des modifications du profil ARN des exosomes du lait de vaches atteintes de mammites. Deux études ont révélé une augmentation de l'expression du niveau de miR-21 sérique (Lai *et al.*, 2021) et d'un ensemble d'ARNmi (miR-21, miR-146a, miR-155, miR-222, et miR-383) dans le lait de vaches affectées (Lai *et al.*, 2017). L'association de ces marqueurs ARN au niveau du lait et du sérum pourrait servir respectivement au suivi de l'inflammation au niveau local et au suivi de son aggravation à l'échelle systémique.

Dans le prolongement de ces études sur les mammites, deux équipes se sont intéressées à l'infection par une bactérie spécifique *Staphylococcus aureus* qui représente un enjeu important dans la lutte contre les infections mammaires, du fait de la difficulté de sa prise en charge thérapeutique. Ils ont mis en évidence la modification dans le lait de 37 ARNmi impliqués dans le développement de la maladie. Le dosage plus spécifique de certains d'entre eux est un enjeu intéressant à la fois pour le développement d'une méthode diagnostique précoce, mais aussi pour des raisons sanitaires : l'ingestion de lait contenant des exosomes enrichis avec ces ARNmi pourrait avoir un impact sur le développement de maladies chez le consommateur (S. Ma *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2015)

On retrouve un ensemble de biomarqueurs potentiels de maladies inflammatoires ou infectieuses utilisables en médecine vétérinaire, succinctement décrits dans le **Tableau 12**.

Tableau 12 : Biomarqueurs exosomaux en médecine vétérinaire

Affection	Pathogène	Molécules	Interprétation	Animal	Référence
Infections utérines	<i>Trueperella pyogenes</i>	PGF2	Exosomes sériques de vaches infectées sont à l'origine d'une diminution de la production de PGF2, dans les cellules endométriales	Vache	Almughlliq et al., 2017
Infections utérines	<i>Trueperella pyogenes</i>	107 protéines bovines / 13 protéines de <i>Trueperella pyogenes</i>	17 protéines bovines et 8 protéines de <i>Trueperella pyogenes</i> présentes uniquement dans les exosomes de vaches infectées	Vache	Almughlliq et al., 2018
Risque métabolique	-	Protéome / icosanoïdes	Diminution significative de l'expression de PGE2, PGF2 α , PGD2, PGFM et TXB2 chez les vaches à haut risque métabolique ; Présence de protéines spécifiques serpine A3-7, domaine en hélice 88A et chaîne inhibine/activine impliquées dans le déficit immunitaire et reproductif	Vache	Almughlliq et al., 2019
Mammites	<i>Staphylococcus aureus</i>	ARNmi	Modification d'un ensemble d'ARNmi dont miR-378, miR-185, miR-142-5p et miR-223 dans les exosomes du lait chez les vaches atteintes d'infection à staphylocoques	Vache	Ma et al., 2019 ; Sun et al., 2015
Mammites	-	ARNmi	Augmentation miR-21 sérique et miR-21, miR-146a, miR-155, miR222, et miR-383 dans le lait de vaches atteintes de mammites diagnostiquées par un California Mastitis Test positif	Vache	Lai et al., 2017 ; Lai et al., 2021
Artérite virale équine	<i>Arteriviridae</i>	ARNmi	Sur-expression dans les exosomes du tractus reproducteur de miR-128 qui diminue l'expression de CXCL16, à l'origine d'une persistance de l'infection virale	Cheval	Carossino et al., 2018
Tuberculose/Paratuberculose	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Lipoprotéine bactérienne LpqH	Lipoprotéine LpqH issues des VE permettrait de faire la différence entre animaux atteints de tuberculose, de paratuberculose et vaccinés	Vache	Palacios et al., 2019
Leucose bovine enzootique	Virus de la leucémie bovine - <i>Retroviridae</i>	Protéines gp51 et p24	Exosomes porteurs des protéines virales gp51 et p24 dans le lait de vaches infectées - potentielle voie de contamination virale	Vache	Yamada et al., 2013
Gingivo-stomatite féline	Calivirus félin	Protéines	Production d'exosomes accrue dans les cellules mésenchymateuses de tissu adipeux avec modification du profil protéique sur 30 protéines, et 8 protéines exclusivement retrouvées chez les chats atteints de maladie chronique	Chat	Villatoro et al., 2017
Dermatite atopique canine	-	Chimiokines	Augmentation de l'expression exosomale des chimiokines CCL17, CCL22 et CCL28 associée à la sévérité des signes cliniques	Chien	Santoro et al., 2020

CCL,CXCL : chimiokines à motifs CC ou CXC ; PGF2 α , PGE2, PGD2, PGFM : Prostaglandines et métabolites ; TXB2 : Thromboxane B2, dérivé des prostaglandines ;

4. Exosome et thérapie

Les études des biomarqueurs exosomaux ont permis de soulever différents leviers thérapeutiques. Si d'autres vésicules artificielles comme les liposomes sont utilisées depuis 40 ans (van der Meel *et al.*, 2014), les exosomes présentent des avantages importants en tant que transporteurs naturels de biomolécules, capable de se soustraire plus efficacement au système immunitaire. La matrice de surface peut être modifiée pour inclure des ligands spécifiques et donc entreprendre des thérapies ciblées (Li *et al.*, 2015).

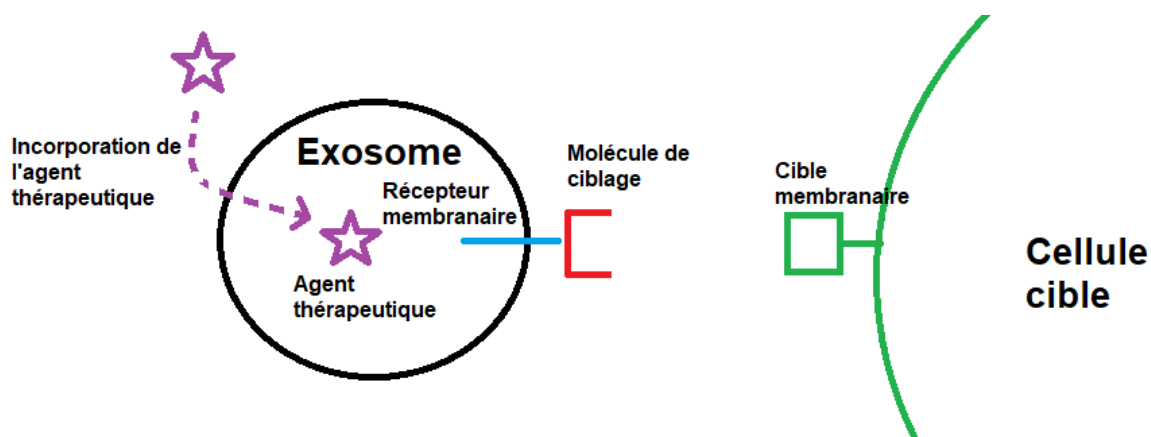
On distingue alors deux populations d'exosomes, les exosomes naturels, qui seront utilisés directement après leur isolement, et les exosomes artificiellement modifiés (Song *et al.*, 2021).

A. Modalités d'usage thérapeutique

La manipulation des exosomes pour un usage thérapeutique nécessite de définir un schéma protocolaire :

On définit une cellule cible, et une cible membranaire associée (protéine, peptide, glycoprotéine). On recherche ensuite une molécule de ciblage membranaire qui puisse s'associer avec une bonne affinité. On doit réaliser la fixation de cette molécule de ciblage membranaire à un récepteur membranaire qui sert d'ancrage (protéine/lipide). Enfin, pour obtenir un effet thérapeutique il faut pouvoir enrichir l'exosome avec un agent moléculaire donné (**Figure 23**).

Figure 23 : Modèle de thérapie exosomale



On décrit deux approches : une approche dite pré-isolement qui repose sur la modification des cellules parentales et un enrichissement d'origine endogène ; une approche post-isolement, qui repose sur l'enrichissement des exosomes par modification physico-chimiques et un apport d'origine exogène. Ces stratégies visent à charger des molécules spécifiques dans les exosomes ou à modifier les molécules de signalisation membranaires (Jafari *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2021).

L'enrichissement en agent thérapeutique peut se faire de manière passive, par co-incubation des cellules parentales ou des exosomes avec l'agent thérapeutique (Zhang *et al.*, 2020). On peut obtenir un chargement efficace des agents hydrophobes à forte concentration (Haney *et al.*, 2015). Les méthodes passives restent toutefois généralement moins efficaces que les méthodes actives de chargement (détaillées ci-dessous).

La combinaison de différentes techniques d'ingénierie de manière concomitantes permet à la fois d'enrichir le cargo exosomal et ses cibles cellulaires.

a. Approche pré-isolement ou indirecte

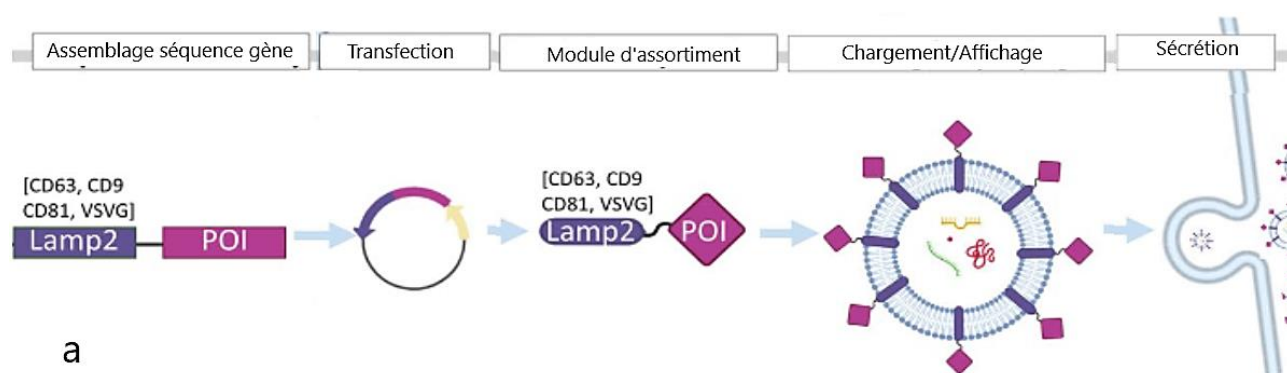
Cette approche repose sur l'édition génomique, c'est-à-dire la modification de l'expression génique de la cellule parentale, afin d'incorporer des molécules spécifiques lors de la biogenèse exosomale (Jafari *et al.*, 2020). Elle est limitée aux motifs qui sont génétiquement encodables (Liang *et al.*, 2021).

- Manipulation de l'affichage membranaire

La manipulation génomique repose sur la transfection : un plasmide sert à implanter dans la cellule le code génétique d'une protéine ou d'un peptide spécifique. La fusion d'un peptide signal avec des marqueurs membranaires communs sert à déterminer un ciblage plus spécifique.

Par exemple, on rapporte l'utilisation de la protéine LAMP2b avec une protéine d'intérêt (**Figure 24**). Cette protéine membranaire est effectivement présente de manière abondante et peut fixer des éléments sur sa partie N-terminale.

Figure 24 : Modèle d'ingénierie génomique pour l'affichage membranaire (modifié de Jafari *et al.*, 2020)



LAMP2b : Lysosome associated membrane protein ; POI = Protein of interest ; VSVG : Vesicular stomatitis virus glycoprotein

Dans cette optique, on a fusionné la glycoprotéine virale du virus de la rage (RVG) avec LAMP2b. L'expression du complexe LAMP2b-RVG dans des cellules dendritiques permet d'obtenir des exosomes porteurs en surface de ce complexe. Or RVG est une protéine de ciblage spécifique des neurones, plus spécifiquement des récepteurs à acétylcholine. Lors d'une administration systémique *in vivo* de ces exosomes chez la souris, ces derniers s'accumulent dans les neurones (Alvarez-Erviti *et al.*, 2011). Cette méthode permettant de traverser la barrière hémato-encéphalique constitue un avantage majeur de la thérapie exosomale. Le chargement d'un ARN interférant dans ces exosomes a permis de diminuer l'expression du gène *BACE1* impliqué dans la maladie d'Alzheimer.

De manière comparable la combinaison du peptide iRGD à LAMP2b a permis la délivrance thérapeutique de doxorubicine dans les cellules de cancer du sein (Tian *et al.*, 2014). En effet ce peptide permet de cibler les tumeurs exprimant les intégrines α_v .

Ainsi la protéine LAMP2b est utilisée avec plusieurs peptides de ciblage comme RVG, iRGD, le peptide d'affinité chondrocytaire ou encore le peptide E7 qui permettent de cibler respectivement les neurones, les tumeurs mammaires, les chondrocytes (Liang *et al.*, 2020) ou encore les cellules mésenchymateuses synoviales (Xu *et al.*, 2021).

On retrouve par ailleurs des exosomes modifiés avec la glycoprotéine du virus de la stomatite vésiculeuse (VSVG). Cette protéine est impliquée dans la formation de l'enveloppe virale, mais la similarité des mécanismes de formation entre virus et exosomes permet son utilisation dans ce cadre. Cette protéine contient trois domaines (ectoplasmique, transmembranaire et cytoplasmique) qui peuvent être modifiés. L'ajout d'une protéine rapporteuse sur son domaine cytoplasmique permettrait de réaliser le suivi des exosomes, et l'ajout de peptides de ciblage spécifiques sur son domaine ectoplasmique pourrait améliorer le ciblage membranaire (Meyer *et al.*, 2017; Taylor *et al.*, 2007; Y. Yang *et al.*, 2017)

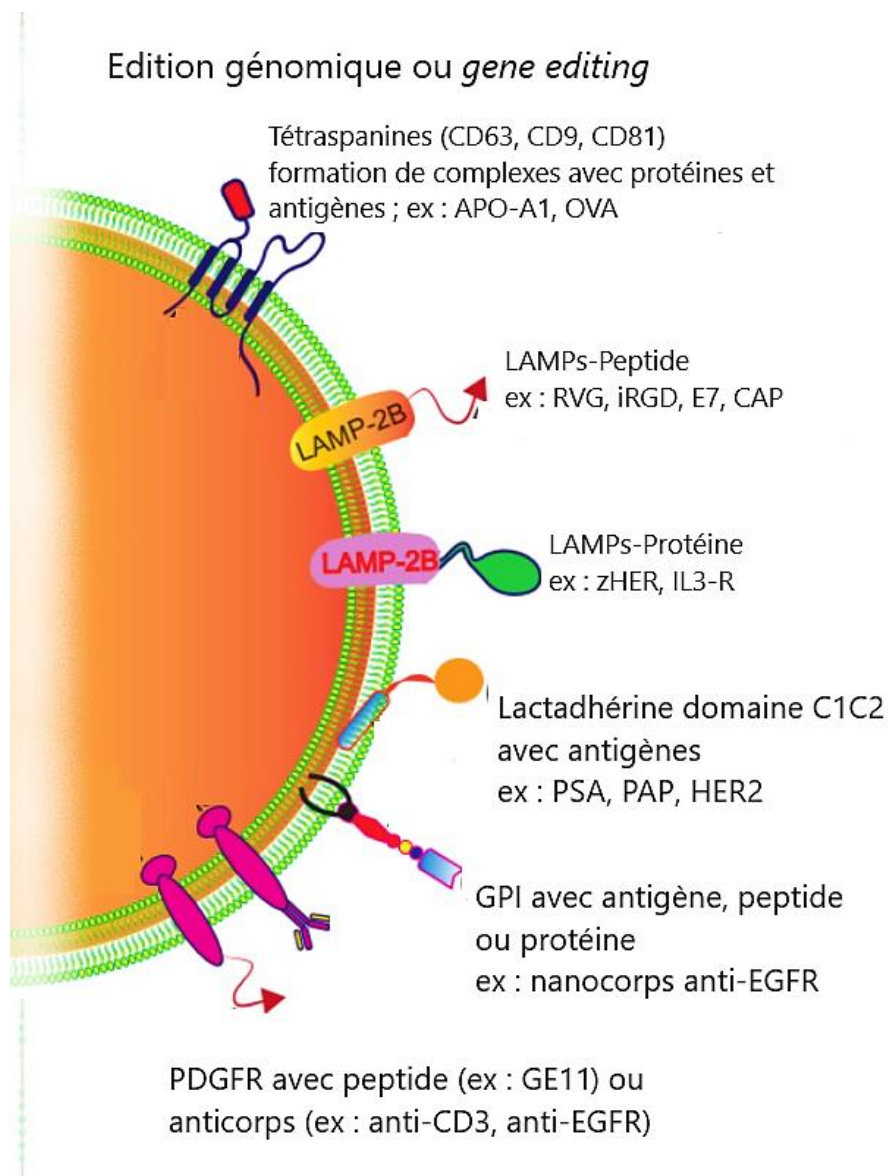
Une utilisation intéressante du récepteur *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR) est rapportée. Certaines cellules tumorales portent en surface le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) en quantité importante. Les lymphocytes T quant à eux sont porteurs du marqueur CD3. Aussi une double association par transfection de PDGFR avec des anticorps anti-CD3 et anti-EGFR est décrite. Ces exosomes présentent à la fois une forte affinité pour les cellules EGFR+ mais aussi pour les cellules CD3+. Cette reconnaissance bispécifique permet la détection des cellules tumorales par le système immunitaire et leur phagocytose (Cheng *et al.*, 2018)

Les tétraspanines possèdent deux boucles extracellulaires qui peuvent aussi servir de motifs de fixations. L'apolipoprotéine A-1 a été utilisée avec la tétraspanine CD63 pour cibler le récepteur membranaire *scavenger receptor class B-1* sur les cellules de carcinome hépatocellulaire, permettant la délivrance d'un ARNm inhibant la croissance tumorale (Liang *et al.*, 2018). Une autre étude s'appuie sur la fusion d'un antigène ovalbumine avec la tétraspanine CD63 pour améliorer le potentiel immunogène de vaccins ADN. L'application de ce modèle aux tumeurs permettrait de solliciter la réponse des lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (Kanuma *et al.*, 2017).

La lactadhérine C1C2 peut aussi servir de transporteur d'antigènes tumoraux spécifiques prostatiques, comme l'antigène prostatique spécifique (PSA) ou la phosphatase acide prostatique (PAP), et aussi mammaire, comme le récepteur de croissance épidermique humain (HER2) (Rountree *et al.*, 2011). Enfin on peut utiliser une glycoprotéine d'ancrage, le glycophosphatidylinositol, pour fixer anticorps et peptides rapporteurs (Kooijmans *et al.*, 2016; C. P. Lai *et al.*, 2015).

L'ensemble de ces méthodes est résumé sur la **Figure 25**. Elles permettent de modifier l'affichage de surface, et donc d'augmenter la spécificité de ciblage des exosomes, mais aussi de mettre en place des molécules rapporteuses pour le suivi par imagerie de la biodistribution exosomale (Choi *et al.*, 2021; Liang *et al.*, 2021). On peut en effet imaginer la fusion de toute molécule d'intérêt comme un marqueur fluorescent/radio-visible, et non pas uniquement des agents thérapeutiques.

Figure 25 : Bioingénierie de surface exosomale par édition génomique (d'après Liang *et al.*, 2021)



APO-A1 : Apolipoprotéine A1 ; CAP : Chondrocyte affinity peptide ; EGFR ; Epidermal growth factor receptor ; GPI : Glycophosphatidylinositol ; HER2 : Human epidermal growth factor receptor ; LAMP : Lysosome associated membrane protein ; OVA : Antigène ovalbumine ; PDGFR : platelet-derived growth factor receptor ; PSA, PAP : Prostate specific antigen/Prostatic acid phosphatase ; RVG : Rabies virus glycoprotein ; zHER : ligand d'affinité de HER2 ;

- **Chargement de protéines**

Le chargement d'agents thérapeutiques est une étape commune de la production d'exosomes à visée curative. Ce chargement passe par des modules qui se lient à une protéine ou un ARN d'intérêt et les dirigent vers les exosomes pendant la biogenèse (Jafari *et al.*, 2020)(**Figure 26**)

Une des méthodes utilise le mimétisme des processus naturels d'assortiment exosomal. En effet on utilise une balise d'ubiquitine modifiée que l'on va faire fusionner avec une protéine d'intérêt.

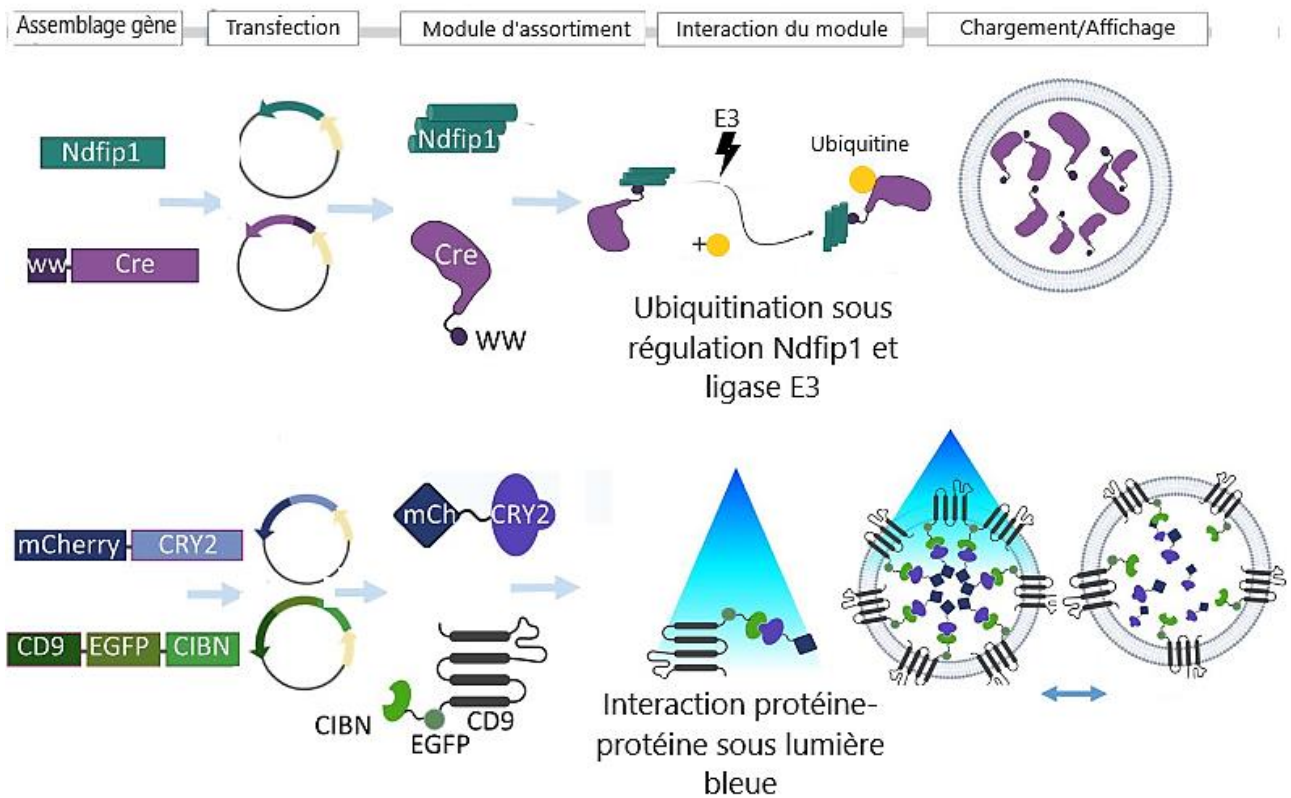
Par exemple il est possible d'entraîner une fusion de cette balise avec des protéines bactériennes de *Mycobacterium tuberculosis*, des marqueurs fluorescents ou encore des antigènes tumoraux. Or l'ubiquitination d'une protéine intervenant dans son adressage vers les exosomes, ces protéines se retrouvent donc dans la lumière des vésicules (Cheng et Schorey, 2016).

Une autre méthode repose sur une balise Tryptophane-Tryptophane (WW) qui se fixe spécifiquement au domaine leucine de la *Nedd4 family interacting protein 1* (Ndfip1). Cette méthode utilise aussi l'ubiquitination. En effet la fusion d'une protéine d'intérêt avec une balise WW et l'expression simultanée de Ndfip1 entraîne une reconnaissance Protéine-WW-Ndfip1. Or Ndfip1 est impliquée dans l'activation d'une ligase de l'ubiquitine, ce qui résulte dans l'ubiquitination de la protéine d'intérêt et son incorporation (Sterzenbach *et al.*, 2017).

On décrit l'utilisation d'un mutant non fonctionnel de la protéine Nef du HIV-1. Cette protéine est associée à des rafts lipidiques de la membrane plasmique. Le principe est le même que l'utilisation des peptides de signal de surface mais cette fois en partie C-terminale. La fusion de la protéine Nef mutante avec des antigènes de pathogènes (Ebola, influenza, West Nile virus ou encore hépatite C) résulte dans la fusion et l'expression stable de ces protéines dans les exosomes. Ils pourraient alors servir de plateformes vaccinales (Anticoli *et al.*, 2018).

Une méthode originale nommée *EXosomes for Protein Loading via Optically Reversible protein-protein interaction* (EXPLOR) utilise comme son nom l'indique une liaison réversible par stimulus lumineux. Cette méthode repose sur l'interaction sous lumière bleue du cryptochrome CRY2 et de la protéine *CRY-interacting basic-helix-loop helix 1* (CIBN). On associe d'une part à CRY2 une protéine d'intérêt tandis que CIBN peut se fixer à CD9. Sous l'influence d'une lumière bleue, on obtient la formation d'un complexe Protéine-CRY2-CIBN-CD9. Une fois le stimulus retiré, la liaison disparaît permettant ainsi de libérer dans la lumière exosomale la protéine d'intérêt liée à CRY2 (Yim *et al.*, 2016).

Figure 26 : Modèle d'ingénierie génomique pour le chargement de protéines (d'après Jafari et al., 2020)



Cre/mCherry/EGFP sont trois gènes rapporteurs

Ndfip1 : Nedd4 family interacting protein 1 ; *CIBN* : CRY-interacting basic-helix-loop helix 1 ; *CRY2* : Cryptochrome 2

- Chargement d'acides nucléiques

On retrouve également des méthodes d'ingénierie génomique dédiées au chargement de molécules d'ARN, ces méthodes reposent sur l'utilisation de modules de liaisons à l'ARN (**Figure 27**).

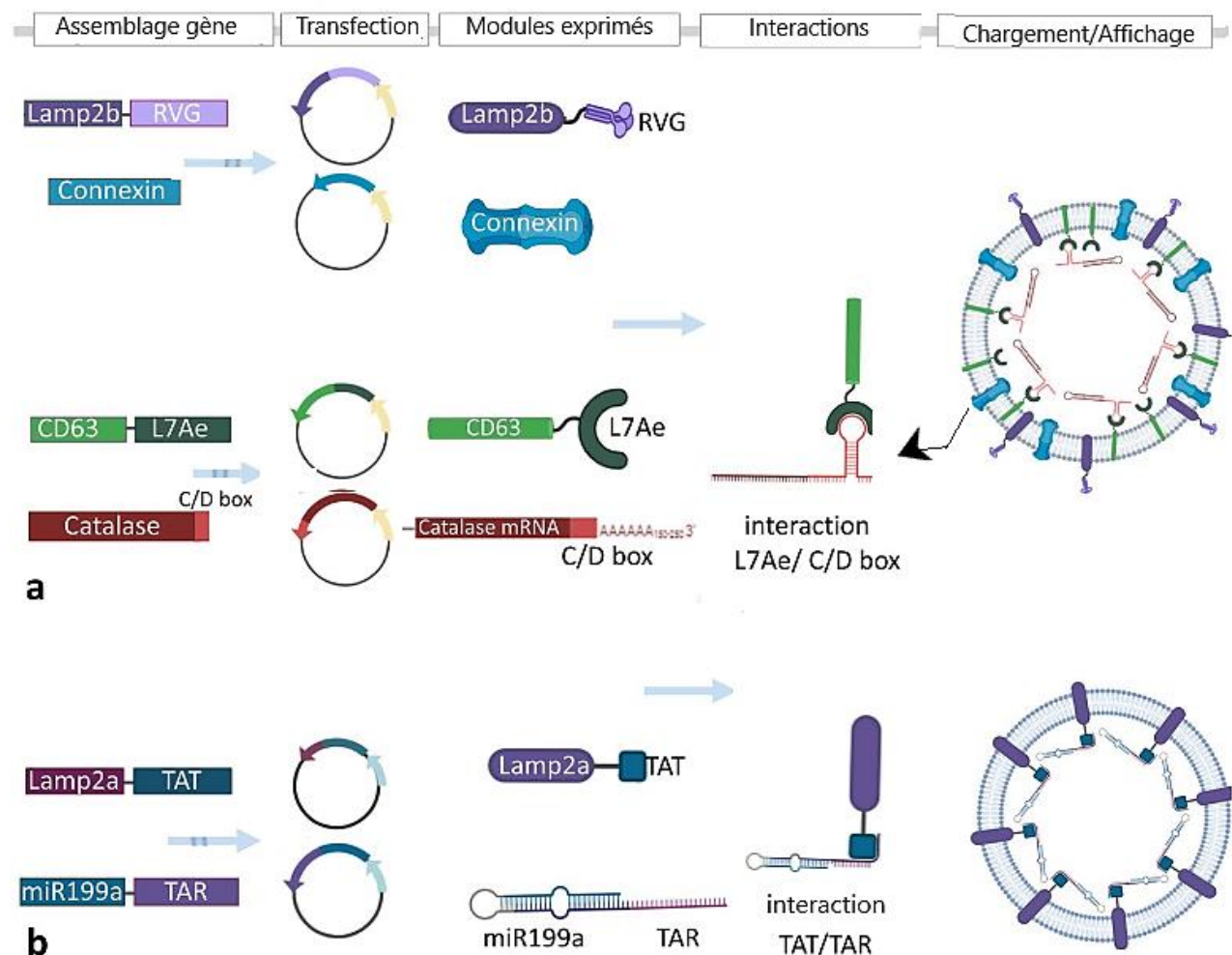
Par exemple, le système EXOtic utilise la fusion d'une protéine ribosomale L7Ae avec la tétraspanine CD63. Cette protéine peut se lier aux régions 3'UTR d'une structure ARN sur un domaine spécifique, et permettre son incorporation avec CD63. Cette technique a été utilisée pour charger un ARNm de la catalase et cibler des cellules neuronales. On a ainsi observé une réduction de l'inflammation neuronale et de la neurotoxicité chez des souris modèles de la maladie de Parkinson (Kojima et al., 2018).

Un autre système repose sur l'interaction entre la séquence Arn d'activation d'expression (TAR) et la protéine activatrice de la transcription (TAT) du HIV1. Ces deux éléments interviennent dans le mécanisme de transcription virale. Brièvement, le pre-miR-199a a été modifié pour contenir la boucle TAR, tandis que LAMP2a a été modifiée pour afficher le peptide de liaison à l'ARN TAT sur sa partie C terminale. Ainsi par liaison entre les séquences TAR et TAT, le miR-199a est chargé dans les exosomes (Sutaria et al., 2017). Cette technique pourrait être transposée à d'autres ARN.

Une méthode comparable utilise l'association entre CD9 et un module de liaison à l'ARN, l'antigène humain R (HuR). Cette association CD9-HuR permet la fixation et l'incorporation de miR-155 à l'intérieur des exosomes. Par ailleurs l'intérêt de cette méthode est qu'il est possible d'utiliser l'association CD9-HuR pour la délivrance du système CRISPR/Cas9, ce qui ouvre d'importantes possibilités en termes d'édition génique. Cette usage est

particulièrement intéressant car la délivrance et le chargement de CRISPR/Cas9 par d'autres méthodes est difficile du fait de la grande taille du complexe (Li *et al.*, 2019).

Figure 27 : Principe d'ingénierie cellulaire pour le chargement d'ARN (d'après Jafari *et al.*, 2020)



La protéine ribosomale L7Ae peut fixer l'ARNm de la catalase sur un domaine C/D box, ce qui forme un motif en épingle. L'ensemble du complexe est ensuite chargé avec l'aide de la connexine. LAMP2b-RVG sert pour l'affichage membranaire et la spécificité de ciblage.

TAR-TAT : trans-activation response ARN sequence / trans-activator of transcription protein ;

Les méthodes de manipulation génomique sont très nombreuses et reposent sur la modification d'une très large gamme de protéines membranaires pour aboutir à la formation d'un complexe récepteur membranaire/molécule de ciblage. Ce complexe permettra *in fine* d'accroître le potentiel de ciblage de l'exosome ou encore d'y incorporer des agents moléculaires spécifiques. Cette approche vise plutôt à un enrichissement contrôlé de molécules mais il est aussi tout à fait possible de réaliser une transfection de gènes d'intérêt sans utiliser de mécanisme de fusion spécifique. L'expression quantitativement importante d'une molécule dans la cellule parentale entrainerait un enrichissement statistiquement plus important dans les exosomes, ce résultat entraine toutefois un plus fort risque de cytotoxicité (Collino *et al.*, 2017).

b. Approche post-isolément ou directe

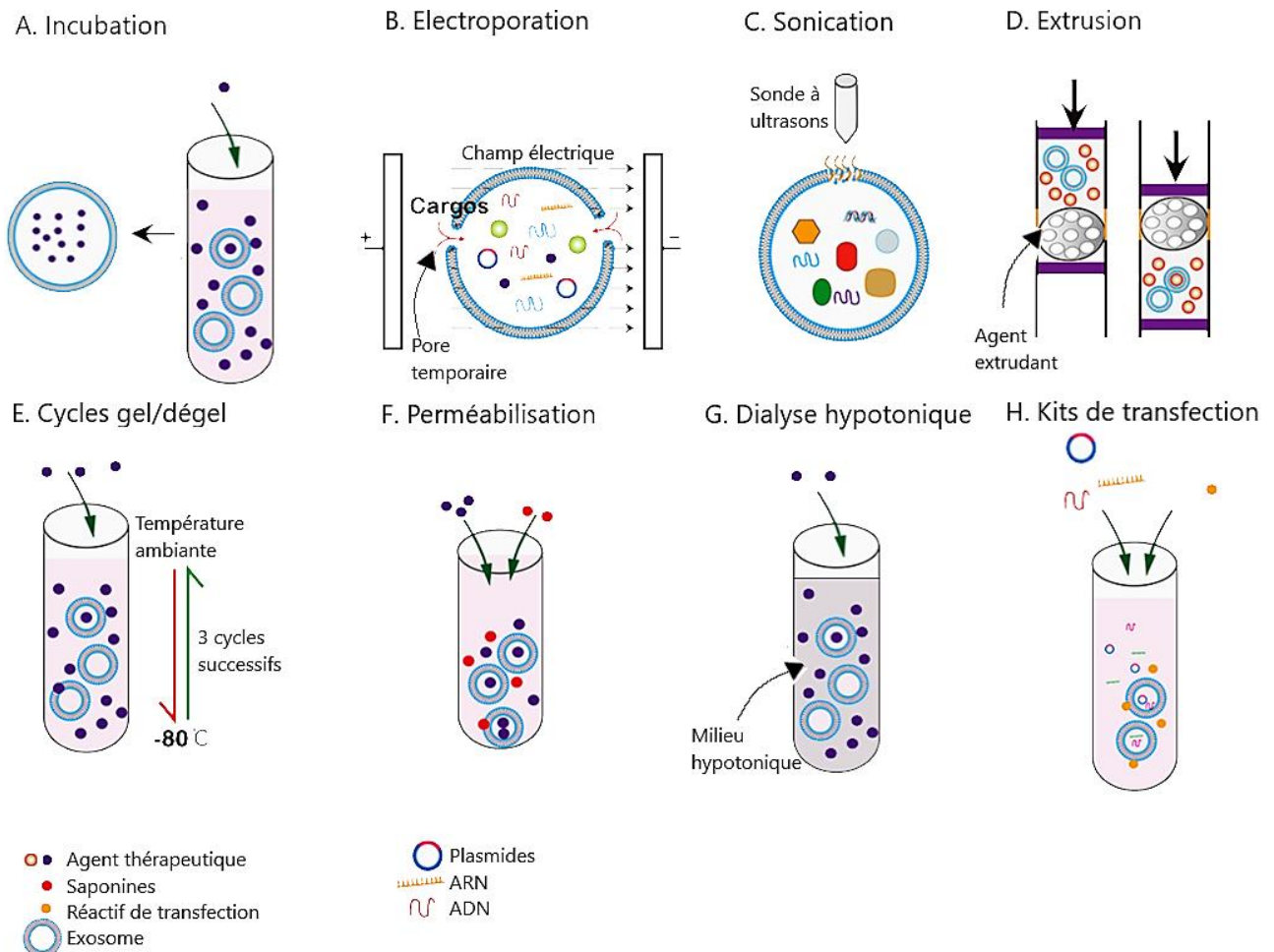
L'approche post-isolément intervient sur la modification directe des exosomes. Cette approche est généralement techniquement moins complexe que l'approche pré-isolément (Zhang *et al.*, 2020). Les modifications chimiques permettent d'avoir une large gamme de ligands, naturels ou synthétiques. Les réactions de conjugaison peuvent fixer de manière covalente et stable des protéines de surface, mais la complexité de la matrice exosomale peut réduire l'efficacité de la réaction dans certains cas, réaction qui peut altérer la membrane exosomale (Liang *et al.*, 2021)

Etant donné que ces méthodes ne fournissent pas de source continue d'exosomes modifiés, il est nécessaire d'obtenir des protocoles reproductibles cliniquement (Jafari *et al.*, 2020).

- Chargement de molécules

On incorpore un agent thérapeutique, de manière passive, ou active : on rapporte différentes techniques dont l'électroporation, l'extrusion, la sonication, la méthode par gel-dégel, la perméabilisation ou encore la dialyse hypotonique (**Figure 28**).

Figure 28 : Représentation des méthodes physico-chimiques de chargement de molécules (modifié de Wu *et al.*, 2021)



Concernant ces méthodes, certaines recherches comparent leur efficacité, mais il faut surtout s'adapter aux conditions de l'étude dans sa globalité, et il n'existe pas à l'heure actuelle de *gold standard* (Haney *et al.*, 2015; M. S. Kim *et al.*, 2016).

Ces techniques visent à altérer de manière temporaire la perméabilité membranaire. Elles sont donc toutes sujettes à des risques d'altération et de détérioration de la membrane exosomale et de perte de fonctionnalité biologique (Wu *et al.*, 2021).

La co-incubation passive est utilisée dans de nombreuses études pour enrichir les exosomes. Elle a été utilisée par exemple pour charger du curcumin dans des exosomes de cellules lymphocytaires afin de limiter l'inflammation liée à un modèle de choc septique chez la souris (Sun *et al.*, 2010)(**Figure 28A**).

L'électroporation est la méthode physique la plus couramment utilisée actuellement. Son principe repose sur l'application d'un courant électrique qui génère une perméabilité transitoire de la membrane des exosomes entre les phospholipides membranaires. On a réussi à charger de cette manière des molécules antitumorales, comme le paclitaxel ou la doxorubicine (M. S. Kim *et al.*, 2016; Tian *et al.*, 2014), ou encore des ARNsi (Alvarez-Erviti *et al.*, 2011)(**Figure 28B**).

La sonication est la seconde méthode la plus utilisée et repose sur l'augmentation de la perméabilité membranaire par application d'un champ d'ultrasons qui lui aussi entraîne une discontinuité membranaire. L'étude de l'équipe de Kim (2016) a révélé que cette méthode était la plus efficace pour charger du paclitaxel par rapport à l'électroporation ou une incubation simple. On a montré qu'il était aussi possible de charger et délivrer efficacement par cette méthode de la catalase dans les cellules neuronales, afin de lutter contre l'inflammation observée dans la maladie de Parkinson (Haney *et al.*, 2015)(**Figure 28C**).

L'extrusion impose au mélange exosomes/agent thérapeutique de passer à travers un extrudant qui sert de maillage pour le mélange. L'idée est d'entraîner mécaniquement une rupture membranaire, ce qui permet l'incorporation de l'agent. Une étude s'appuie sur le chargement de porphyrines dans les exosomes par cette méthode. Elle a montré que la délivrance de porphyrine dans les cellules cibles était 60% plus importante par rapport à une forme libre ou par le biais de liposomes (Fuhrmann *et al.*, 2015)(**Figure 28D**).

Le principe des cycles gel-dégel est de profiter d'une congélation à -80°C dans de l'azote liquide, et de sa décongélation à température ambiante. Cette variation va entraîner une fragilité membranaire qui permet d'incorporer les agents thérapeutiques présents dans le mélange. On a montré qu'il était possible d'entraîner la fusion d'exosomes et d'éléments plus importants comme des liposomes par cette méthode, et de former des hybrides ciblant notamment la cible tumorale HER2 (Sato *et al.*, 2016). Cette méthode est également rapportée pour le chargement de la catalase (Haney *et al.*, 2015)(**Figure 28E**).

La méthode par perméabilisation utilise une réaction de saponification sur le cholestérol membranaire, ce qui va être à l'origine de zones poreuses. Les saponines sont des glycosides naturels qui présentent toutefois le risque d'être cytotoxiques. Cette méthode est donc à utiliser avec précaution et nécessite un rinçage du milieu de mélange (Fuhrmann *et al.*, 2015; Y.-F. Zhang *et al.*, 2019)(**Figure 28F**).

Le chargement par dialyse hypotonique utilise comme son nom l'indique un milieu hypotonique pour obliger l'ouverture des canaux membranaires exosomaux par pression

osmotique, ce qui permet l'entrée de petites molécules. Cette méthode a également été utilisée pour le chargement de porphyrines (Fuhrmann *et al.*, 2015)(**Figure 28G**).

Enfin on décrit également des kits commerciaux d'agents de transfection, qui sont généralement des lipides visant à réduire le rejet des acides nucléiques par la membrane, les deux étant chargés négativement. Ces kits sont répandus : dans le cadre de modèles de cancer du sein ils ont été utilisés pour charger un ARNmi antitumoral (Ohno *et al.*, 2013) ; dans un modèle d'atteinte rénale chronique ils ont été utilisés pour charger un ARNmi antifibrosant (H. Wang *et al.*, 2019)(**Figure 28H**).

- Modification de surface

On met en évidence deux types de modifications chimiques de surface : modifications par liaisons covalentes et modifications par liaisons non covalentes (**Figure 29**)

Concernant les liaisons covalentes, on retrouve des réactions de bio-conjugaison, c'est-à-dire des liaisons faisant intervenir des molécules liées sur le plan biologique.

Par exemple, le peptide CP05 se fixe spécifiquement à la seconde boucle extracellulaire de CD63 (Gao *et al.*, 2018). On a montré qu'il est possible de modifier ce peptide CP05 pour qu'il affiche une molécule de ciblage ou un agent thérapeutique. De cette manière, on a montré sur un modèle murin de la maladie de Duchenne que des exosomes modifiés avec CP05 permettent d'accroître l'expression de la dystrophine, protéine dont l'absence est impliquée dans l'expression de cette maladie. Le peptide CP05 peut être combiné d'une part à un peptide de signal musculaire et d'autre part à un modificateur d'expression génique.

On utilise aussi la chimie dite « chimie click ». Ces réactions reposent globalement sur un couplage entre un groupement alkyle (liaison triple entre deux carbones), et un azoture (élément en $-N_3$) qui sera porté par la molécule d'intérêt (Liang *et al.*, 2021; Tian *et al.*, 2018). Afin de générer un groupement alkyl sur les exosomes, on utilise souvent le dibenzocyclooctyne (DBCO).

On retrouve plusieurs exemples de ce type : des exosomes portant le peptide RGE en surface, ajouté par chimie click, ciblent les cellules de gliomes ; des exosomes portant le peptide cyclique RGDyK permettent de cibler les cellules neuronales et réduire les conséquences de l'ischémie cérébrale (Smyth *et al.*, 2014; Tian *et al.*, 2018).

Une utilisation intéressante de ce principe utilise le mécanisme d'échappement à la réponse immunitaire. En effet de nombreuses cellules tumorales arborent la glycoprotéine CD47 qui en interagissant avec la protéine *signal regulatory protein α* (SIRP α) macrophagique permet d'inhiber la phagocytose. Une équipe a donc utilisé une réaction de chimie click pour fixer sur des exosomes des anticorps anti-SIRP α . Ce modèle est similaire au modèle génétique précédemment cité anti-CD3, anti-EGFR. Les exosomes porteurs des anticorps anti-CD47 libèrent ces derniers sous l'influence du pH de l'environnement tumoral et vont améliorer la phagocytose des cellules tumorales par les cellules immunitaires (Nie *et al.*, 2020).

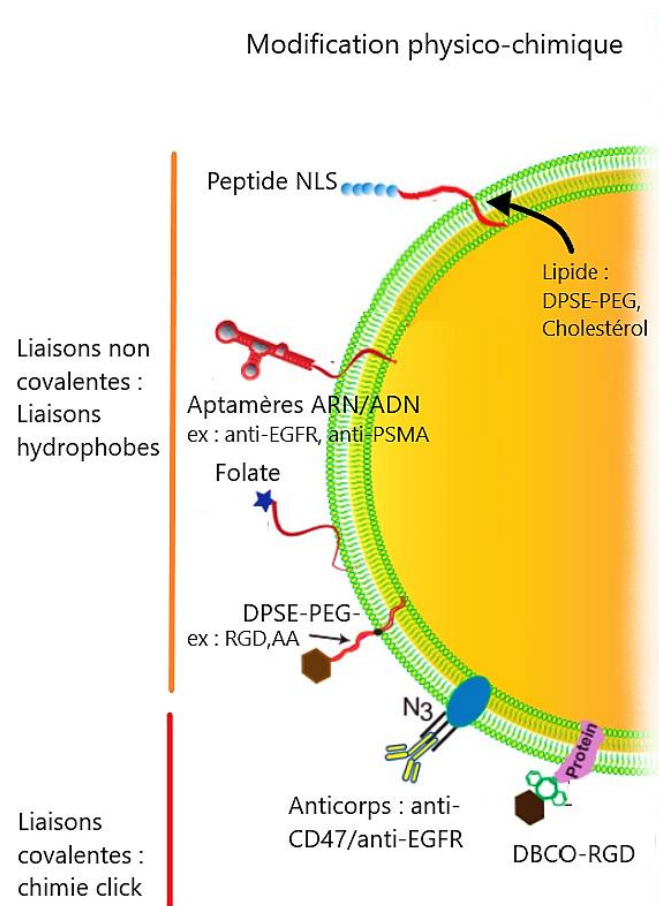
Parmi les liaisons non covalentes, on retrouve des interactions hydrophobes et électrostatiques.

On rapporte l'utilisation de lipides aux propriétés amphiphiles. La partie lipophile de la molécule peut s'insérer de manière autonome dans la membrane exosomale, tandis que sa partie hydrophile reste extra membranaire et peut fixer des molécules.

Le 1, 2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-polyéthylène glycol (DSPE-PEG) est l'un des lipides amphiphiles les plus utilisés, mais on retrouve aussi des études qui utilisent un cholestérol modifié. Les interactions hydrophobes ont été utilisées pour fixer des ligands tumoraux comme le peptide RGD, le folate, EGF, l'antigène spécifique prostatique membranaire ou encore des anisamides (Kim *et al.*, 2018; Liang *et al.*, 2021).

On a même montré que l'ajout par interactions hydrophobes d'un peptide de signalisation nucléaire permet d'améliorer la précision de la photothérapie dynamique dans un modèle de carcinome mammaire murin. Cette thérapie repose sur le déclenchement de réactions de nécrose cellulaire sous l'influence d'un influx lumineux localisé, par administration d'un agent photo-sensibilisant. Un peptide chimérique synthétique (signal nucléaire + agent photo-sensibilisant + chaîne hydrophobe) permet de former des exosomes spécialisés, et d'améliorer de manière significative la délivrance de l'agent photo-sensibilisant dans les cellules tumorales, et même dans le noyau cellulaire, entraînant en conséquence la nécrose des cellules tumorales (Cheng *et al.*, 2019).

Figure 29 : Bioingénierie de surface exosomale par modification physico-chimique (modifié de Liang *et al.*, 2021)



AA : Anisamides ; DBCO : Dibenzocyclooctyne ; DPSE-PEG : 1, 2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-polyéthylène glycol ; EGFR : Epidermal growth factor receptor ; NLS : Nuclear localization signal ; PSMA : Prostate specific membrane antigen ; RGD : Arginylglycylaspartic acid

Enfin les interactions électrostatiques ont été utilisées pour améliorer l'absorption des exosomes par leurs cellules cibles, et reposent sur le même principe que les kits de

transfection commerciaux. La membrane exosomale étant chargée négativement, tout comme la membrane des cellules, il est possible de réduire la répulsion par les cellules en mixant les exosomes avec des éléments cationiques. La réduction du potentiel de membrane permet *in vivo* d'améliorer significativement l'absorption exosomale (Nakase et Futaki, 2015). Ce principe a été utilisé dans un modèle murin d'inflammation hépatique pour la délivrance d'exosomes issus de MSC. On a montré qu'il était possible de fixer un polysaccharide cationique, le pullulan, qui est spécifiquement absorbé par les cellules hépatiques. L'accumulation en surface de pullulan accroît l'absorption cellulaire, et donc les effets régénératifs des exosomes issus de MSC (Tamura *et al.*, 2017).

- Hybridation exosomes/liposomes

L'hybridation entre exosomes et liposomes est une méthode qui permet d'apporter plusieurs modifications de manière concomitante. Elle peut être effectuée soit en amont sur la cellule parentale (Lee *et al.*, 2016) ou directement avec les exosomes (Rayamajhi *et al.*, 2019). Cette méthode permet de charger sur un même exosome des molécules aux propriétés opposées, par exemple hydrophobe et hydrophile. Le liposome fusionnant avec l'exosome, les contenus du lumen et de la bicouche lipidique restent dans leurs compartiments respectifs dans l'exosome, à savoir la membrane et la lumière vésiculaire. On peut donc réaliser de l'ingénierie moléculaire en surface tout en chargeant un agent thérapeutique.

B. Applications thérapeutiques vétérinaires

a. Délivrance thérapeutique ciblée

La délivrance médicamenteuse vectorisée par les exosomes est notamment décrite pour les agents thérapeutiques antitumoraux. Certaines molécules naturelles comme les anthocyanidines représentent des agents antioxydants très intéressants pour lutter contre les atteintes tumorales, mais leur utilisation reste limitée du fait de leur faible biodisponibilité. La formulation exosomale de ces agents permet d'augmenter leur distribution : on a montré que la réponse thérapeutique est grandement améliorée dans des modèles de tumeurs pulmonaires chez la souris (Munagala *et al.*, 2017).

On retrouve par ailleurs l'implication des exosomes dans le traitement des atteintes du système nerveux central. Comme rapporté précédemment, les exosomes peuvent passer la barrière hémato-encéphalique et représentent donc un système de délivrance efficace pour le système nerveux central. On a montré sur des modèles *in vivo* de poisson-zèbre et de souris que les exosomes issus de neutrophiles étaient capables de délivrer la doxorubicine dans les cellules tumorales de gliomes, permettant ainsi de réduire la croissance tumorale. Ces exosomes sont sensibles au chimiotactisme comme leurs cellules parentales (J. Wang *et al.*, 2021).

Les exosomes tiennent par ailleurs une place importante dans la potentialisation de molécules antibactériennes, notamment pour la lutte contre certains pathogènes résistants. Ainsi on a montré qu'il était possible d'atteindre les souches résistantes de *Staphylococcus aureus* en délivrant un antibactérien dans les cellules. En effet les staphylocoques sont des pathogènes extracellulaires mais peuvent aussi être retrouvés dans les macrophages, ce qui favorise leur résistance médicamenteuse. Chez la souris, on a isolé des exosomes macrophagiques chargés avec un antibactérien, le linézolide. Ces derniers s'accumulent dans les macrophages et induisent un effet antibactérien significatif. L'infection par des

souches résistantes est significativement inhibée chez les souris traitées avec des exosomes par rapport à la formulation libre de l'antibactérien. La délivrance cellulaire de molécules antibactériennes constitue une avancée intéressante pour la lutte contre la résistance bactérienne intracellulaire tant chez l'homme que chez les animaux (X. Yang *et al.*, 2018).

b. Médecine régénérative

La médecine régénérative est un domaine qui repose sur la réparation, le remplacement ou la régénération des cellules dont la fonction est altérée. Elle s'appuie notamment sur la culture de cellules souches. Or on a déjà vu au I.1.c ci-dessus que l'effet régénératif des MSC dépendait notamment de leur sécrétome et donc des exosomes. L'utilisation d'injections d'exosomes sans leurs cellules parentales s'inscrit dans le principe de *cell-free therapy*.

On retrouve quelques exemples de cette application en médecine vétérinaire, notamment pour les atteintes articulaires. On a montré que les exosomes dérivant de cellules de la moelle osseuse peuvent servir de support thérapeutique pour réduire l'inflammation dans les atteintes chondrocytaires chez le cheval. Ces exosomes sont capables d'induire une croissance des cartilages lésés et de favoriser la régénération des chondrocytes. Les thérapies à base d'exosomes de cellules souches peuvent donc servir dans la gestion des maladies articulaires du cheval (Kim *et al.*, 2020).

Une autre équipe s'est également intéressée à l'application des thérapies *cell-free* dans le contexte de synovite chez le porc. L'injection d'exosomes issus des cellules souches permet de diminuer l'afflux de lymphocytes et l'expression de TNF- α . L'inflammation articulaire est réduite chez les porcs traités avec des solutions d'exosomes (Casado *et al.*, 2017).

Chez le rat et la souris, on a montré que les exosomes issus de MSC étaient à l'origine d'un effet protecteur et régénératif dans le cadre de modèles d'atteintes pré-rénales et rénales (Thongboonkerd, 2019). Des chercheurs se sont intéressés à l'étude de la récupération rénale suite à l'induction d'insuffisance rénale aigüe post-rénale chez le chat. L'injection intraveineuse d'exosomes dérivant des MSC du parenchyme adipeux a montré un effet bénéfique sur la récupération rénale. Par rapport au groupe contrôle, les taux biochimiques de créatinine, d'urée et de phosphore des chats traités avec les exosomes reviennent plus rapidement à la normale (Li *et al.*, 2022).

On retrouve une application de thérapie exosomale pour la récupération des fonctions neuronales dans le cadre du traumatisme crânien. Les rats traités par injections d'exosomes de MSC récupèrent plus rapidement leurs fonctions sensitives et motrices. Par ailleurs à l'échelle cellulaire on observe un plus grand nombre de cellules endothéliales néoformées, ainsi qu'une réduction de l'inflammation neuronale (Y. Zhang *et al.*, 2015). De manière comparable, on a montré que l'injection d'exosomes chargée avec miR-494 favorise la régénération des neurofilaments et la récupération comportementale chez le rat atteint de traumatisme de la moelle épinière (Huang *et al.*, 2021).

Dans ce contexte, une méta-analyse portant sur les modèles animaux de traumatismes de la moelle épinière a montré que les exosomes issus de cellules souches peuvent améliorer de manière significative la fonction motrice chez les individus atteints. Les niveaux d'expression des protéines anti-inflammatoires sont grandement augmentés ainsi que les protéines anti-apoptotiques, *a contrario* des protéines pro-inflammatoires. La limite de

l'ensemble de ces études étant qu'elles reposent sur des modèles de recherches, dont la transposition à la clinique demande encore à être effectuée (Zhang *et al.*, 2022).

Enfin on retrouve dans la littérature une étude à portée uniquement vétérinaire appliquant une thérapie à base d'exosomes de MSC pour le traitement de plaies cutanées. On a mis en évidence que l'administration de ces exosomes permet d'améliorer de manière significative la régénération de la peau, avec notamment un accroissement de la synthèse de collagène et de la néovascularisation (El-Tookhy *et al.*, 2017).

c. Vaccination et immunothérapie

L'utilisation des exosomes pour la création de vaccins repose en grande partie sur leur potentiel immunogène dû à leur ligands surfaciques (Montaner-Tarbes *et al.*, 2021).

Des études préliminaires s'intéressent notamment au virus de la chorioméningite lymphocytaire, au syndrome respiratoire et reproducteur porcin ainsi qu'à la maladie de Marek.

Le principe de vaccination exosomale a été appliqué aux infections parasitaires. On a mis en évidence qu'il était possible d'améliorer la protection d'animaux exposés à une infection par *Eimeria tenella* (coccidies) chez la poule. L'injection d'exosomes de DC préalablement exposées aux antigènes du parasite entraîne plusieurs effets bénéfiques en comparaison à une vaccination avec l'antigène seul, à savoir : une augmentation du nombre de cellules spléniques et de cellules de l'amygdale caecale exprimant des immunoglobulines contre le parasite ; une augmentation de la production de molécules de l'inflammation (IL-2 ; IL-16 et IFN- γ) ; une augmentation de la production de cellules de l'immunité. Par ailleurs, les poulets vaccinés avec les exosomes présentent moins de lésions intestinales, une moins grande charge parasitaire ainsi qu'une plus faible mortalité (del Cacho *et al.*, 2011).

Un autre cas de vaccination exosomale contre les parasites a été décrit concernant la toxoplasmose chez la souris. On a montré qu'il était possible d'améliorer la réponse immunitaire après exposition à *Toxoplasma gondii*. Des exosomes issus de cellules dendritiques exposées au parasite ont été injecté par voie intranasale et oculaire chez des souris. Les souris vaccinées présentaient de bien plus hauts taux d'immunoglobulines dirigées contre *Toxoplasma gondii*. Par ailleurs l'expression du gène *B1* associé au parasite est diminuée chez les souris vaccinées avec les exosomes (Jung *et al.*, 2020).

L'application de la vaccination exosomale pour les virus apporte quelques résultats mais ils ne sont pas toujours concluants. Une étude portant sur le virus de la chorioméningite lymphocytaire de la souris a mis en évidence que la vaccination à partir de VE dérivant de cellules de la moelle osseuse ne permet pas d'activer une réponse antivirale par les lymphocytes T (Coppieters *et al.*, 2009). Au contraire une autre étude portant sur le syndrome respiratoire et reproducteur porcin a permis d'obtenir des résultats plus probants. Un ARNm a été synthétisé afin de cibler la sialoadhésine ou CD163, deux récepteurs impliqués dans l'attachement du virus. L'exposition des cellules à des exosomes porteurs de cet ARNm a permis la suppression du récepteur d'attachement viral, avec une diminution notable du titre viral sur le long terme, ainsi qu'une protection efficace contre plusieurs souches virales (Zhu *et al.*, 2014).

Enfin, on retrouve dans la littérature quelques études portant sur la vaccination antitumorale ou l'immunothérapie chez les animaux domestiques.

Dans le cadre de l'étude des tumeurs vénériennes transmissibles, on a montré qu'il était possible d'utiliser les TDE pour stimuler la réponse immunitaire vis-à-vis de la tumeur. Les exosomes porteurs d'antigènes tumoraux sont plus efficaces pour stimuler la réponse immunitaire que les antigènes libres. L'injection de DC ayant été exposés aux exosomes issus de cellules tumorales a permis d'éliminer complètement la tumeur. Les tentatives de vaccination à l'aide de TDE seuls n'ont pas permis toutefois d'obtenir une réponse satisfaisante. L'utilisation d'exosomes modifiés par ingénierie moléculaire semble être nécessaire pour que ces derniers puissent induire une réponse immunitaire suffisante (Ramos-Zayas *et al.*, 2019).

On décrit par ailleurs l'utilisation d'exosomes dérivant de cellules NK dans le cadre des tumeurs mammaires canines. On a en effet montré que l'administration d'exosomes issus de cellules NK est à l'origine d'une diminution de nombreux marqueurs tumoraux, une diminution de la taille de la tumeur et une réduction de la progression tumorale sur un modèle murin. Ces exosomes naturels pourraient servir d'outil thérapeutique dans la prise en charge de ces tumeurs solides, dont le carcinome mammaire canin (J. Lee *et al.*, 2021).

Enfin une dernière étude s'appuie sur la transposition des propriétés de *Toxoplasma gondii*. Il est possible d'utiliser des exosomes issus de cellules dendritiques exposées au parasite afin de réduire l'activité tumorale. On a observé sur un modèle de cancer colorectal chez la souris que ces exosomes entraînaient une diminution significative de la croissance tumorale (Lu *et al.*, 2022).

Les données disponibles sur l'application clinique et thérapeutique des exosomes à la médecine vétérinaire ne sont pas nombreuses à l'heure actuelle. Elles concernent en majeure partie des maladies qui atteignent l'homme et dont la transposition sur des modèles animaux permet d'en étudier les effets. Les quelques études spécifiquement vétérinaires concernent notamment la vaccination et la médecine régénérative, mais elles ne permettent pas encore de mettre en place des moyens thérapeutiques reconnus et utilisés à grande échelle chez les animaux domestiques comme les animaux de rente.

Conclusion

Nous avons pu voir à travers cette thèse que les exosomes font partie d'une famille plus large de vésicules extracellulaires, et possèdent des caractéristiques spécifiques qui dépendent à la fois de leur cellule parentale et de leur biogenèse. Cette biogenèse est un processus très complexe qui doit encore être exploré. Elle fait intervenir principalement le complexe protéique ESCRT, en association avec des mécanismes accessoires, complémentaires ou indépendants. Les exosomes sont au milieu d'un carrefour métabolique, entre recyclage et sécrétion, sécrétion assurée par le complexe de protéines RAB/SNARE.

Cette thèse a permis de mettre en avant les nombreuses possibilités d'isolement et de caractérisation exosomale, physique, chimique et d'affinité biologique. Le développement de techniques performantes représente un enjeu majeur, mais c'est avant tout la standardisation des protocoles qui permettra d'aboutir à des données transposables en clinique.

Les applications fonctionnelles des exosomes se retrouvent à l'échelle de l'organisme tout entier, dans les processus immunitaires et de développement, ce qui participe à l'homéostasie des organes. La dérégulation de la production exosomale peut être le moteur ou le support d'atteintes néoplasiques, métaboliques, inflammatoires ou encore infectieuses. La compréhension fine des mécanismes sous régulation exosomale est le second enjeu capital de l'étude des exosomes. La détermination des modifications de profils exosomaux en situation pathologique permettra de développer des méthodes nouvelles de biomarqueage, applicables pour le diagnostic et le pronostic de différentes maladies humaines et vétérinaires.

Les exosomes, fort d'un potentiel de transporteurs biologiques naturels, peuvent être dérivés pour des applications thérapeutiques variées. La bioingénierie génomique et les modifications physico-chimiques en font des vecteurs de choix pour la délivrance d'agents thérapeutiques, en médecine régénérative ou pour la vaccination.

Cependant, bien que les études concernant ces vésicules soient de plus en plus nombreuses, le pool de données concernant le domaine vétérinaire reste à agrandir. La poursuite des recherches comparatives, ainsi que la conduite d'études spécifiques aux animaux de rente et animaux domestiques seront nécessaires pour profiter pleinement du potentiel des exosomes en médecine vétérinaire.

Liste des références bibliographiques

- AARONSON, S., BEHRENS, U., ORNER, R., *et al.* (1971) Ultrastructure of intracellular and extracellular vesicles, membranes, and myelin figures produced by *Ochromonas danica*. *Journal of Ultrastructure Research* vol. 35, n° 5, p. 418-430. [[https://doi.org/10.1016/s0022-5320\(71\)80003-5](https://doi.org/10.1016/s0022-5320(71)80003-5)]
- ABDOUH, M., FLORIS, M., GAO, Z.-H., *et al.* (2019) Colorectal cancer-derived extracellular vesicles induce transformation of fibroblasts into colon carcinoma cells. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR* vol. 38, n° 1, p. 257. [<https://doi.org/10.1186/s13046-019-1248-2>]
- ABSALON, S., KOCHANNEK, D.M., RAGHAVAN, V., *et al.* (2013) MiR-26b, upregulated in Alzheimer's disease, activates cell cycle entry, tau-phosphorylation, and apoptosis in postmitotic neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* vol. 33, n° 37, p. 14645-14659. [<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1327-13.2013>]
- AGLIARDI, C., MELONI, M., GUERINI, F.R., *et al.* (2021) Oligomeric α -Syn and SNARE complex proteins in peripheral extracellular vesicles of neural origin are biomarkers for Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease* vol. 148, p. 105185. [<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105185>]
- AGUDIEZ, M., MARTINEZ, P.J., MARTIN-LORENZO, M., *et al.* (2020) Analysis of urinary exosomal metabolites identifies cardiovascular risk signatures with added value to urine analysis. *BMC biology* vol. 18, n° 1, p. 192. [<https://doi.org/10.1186/s12915-020-00924-y>]
- AIROLA, M.V., HANNUN, Y.A. (2013) Sphingolipid metabolism and neutral sphingomyelinases. *Handbook of Experimental Pharmacology* n° 215, p. 57-76. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1368-4_3]
- ALEČKOVIĆ, M., MCALLISTER, S.S., POLYAK, K. (2019) Metastasis as a systemic disease: molecular insights and clinical implications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* vol. 1872, n° 1, p. 89-102. [<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.06.002>]
- ALMUGHLLIQ, F.B., KOH, Y.Q., PEIRIS, H.N., *et al.* (2019) Circulating exosomes may identify biomarkers for cows at risk for metabolic dysfunction. *Scientific Reports* vol. 9, n° 1, p. 13879. [<https://doi.org/10.1038/s41598-019-50244-7>]
- ALMUGHLLIQ, F.B., KOH, Y.Q., PEIRIS, H.N., *et al.* (2018) Proteomic content of circulating exosomes in dairy cows with or without uterine infection. *Theriogenology* vol. 114, p. 173-179. [<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.03.024>]
- ALMUGHLLIQ, F.B., KOH, Y.Q., PEIRIS, H.N., *et al.* (2017) Effect of exosomes from plasma of dairy cows with or without an infected uterus on prostaglandin production by endometrial cell lines. *Journal of Dairy Science* vol. 100, n° 11, p. 9143-9152. [<https://doi.org/10.3168/jds.2017-13261>]
- ALVAREZ-ERVITI, L., RODRIGUEZ-OROZ, M.C., COOPER, J.M., *et al.* (2010) Chaperone-mediated autophagy markers in Parkinson disease brains. *Archives of Neurology* vol. 67, n° 12, p. 1464-1472. [<https://doi.org/10.1001/archneurol.2010.198>]
- ALVAREZ-ERVITI, L., SEOW, Y., YIN, H., *et al.* (2011) Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature Biotechnology* vol. 29, n° 4, p. 341-345. [<https://doi.org/10.1038/nbt.1807>]
- ANTICOLI, S., MANFREDI, F., CHIOZZINI, C., *et al.* (2018) An Exosome-Based Vaccine Platform Imparts Cytotoxic T Lymphocyte Immunity Against Viral Antigens. *Biotechnology Journal* vol. 13, n° 4, p. e1700443. [<https://doi.org/10.1002/biot.201700443>]

- ASADA, H., TOMIYASU, H., UCHIKAI, T., *et al.* (2019) Comprehensive analysis of miRNA and protein profiles within exosomes derived from canine lymphoid tumour cell lines. *PloS One* vol. 14, n° 4, p. e0208567. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208567>]
- ASAKURA, K., KADOTA, T., MATSUZAKI, J., *et al.* (2020a) A miRNA-based diagnostic model predicts resectable lung cancer in humans with high accuracy. *Communications Biology* vol. 3, n° 1, p. 134. [<https://doi.org/10.1038/s42003-020-0863-y>]
- ASAKURA, K., KADOTA, T., MATSUZAKI, J., *et al.* (2020b) A miRNA-based diagnostic model predicts resectable lung cancer in humans with high accuracy. *Communications Biology* vol. 3, n° 1, p. 134. [<https://doi.org/10.1038/s42003-020-0863-y>]
- ATAY, S., GERCEL-TAYLOR, C., SUTTLES, J., *et al.* (2011) Trophoblast-derived exosomes mediate monocyte recruitment and differentiation. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)* vol. 65, n° 1, p. 65-77. [<https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00880.x>]
- BAIETTI, M.F., ZHANG, Z., MORTIER, E., *et al.* (2012) Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nature Cell Biology* vol. 14, n° 7, p. 677-685. [<https://doi.org/10.1038/ncb2502>]
- BAKHTI, M., WINTER, C., SIMONS, M. (2011) Inhibition of myelin membrane sheath formation by oligodendrocyte-derived exosome-like vesicles. *The Journal of Biological Chemistry* vol. 286, n° 1, p. 787-796. [<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.190009>]
- BARBAGALLO, C., MOSTILE, G., BAGLIERI, G., *et al.* (2020) Specific Signatures of Serum miRNAs as Potential Biomarkers to Discriminate Clinically Similar Neurodegenerative and Vascular-Related Diseases. *Cellular and Molecular Neurobiology* vol. 40, n° 4, p. 531-546. [<https://doi.org/10.1007/s10571-019-00751-y>]
- BATAGOV, A.O., KUROCHKIN, I.V. (2013) Exosomes secreted by human cells transport largely mRNA fragments that are enriched in the 3'-untranslated regions. *Biology Direct* vol. 8, p. 12. [<https://doi.org/10.1186/1745-6150-8-12>]
- BATOOL, A., HILL, T.D.M., NGUYEN, N.T., *et al.* (2019) Altered Biogenesis and MicroRNA Content of Hippocampal Exosomes Following Experimental Status Epilepticus. *Frontiers in Neuroscience* vol. 13, p. 1404. [<https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01404>]
- BAZZAN, E., TINÈ, M., CASARA, A., *et al.* (2021) Critical Review of the Evolution of Extracellular Vesicles' Knowledge: From 1946 to Today. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 22, n° 12, p. 6417. [<https://doi.org/10.3390/ijms22126417>]
- BEAUMIER, A., ROBINSON, S.R., ROBINSON, N., *et al.* (2020) Extracellular vesicular microRNAs as potential biomarker for early detection of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Journal of Veterinary Internal Medicine* vol. 34, n° 3, p. 1260-1271. [<https://doi.org/10.1111/jvim.15762>]
- BEAUVILLAIN, C., RUIZ, S., GUITON, R., *et al.* (2007) A vaccine based on exosomes secreted by a dendritic cell line confers protection against *T. gondii* infection in syngeneic and allogeneic mice. *Microbes and Infection* vol. 9, n° 14-15, p. 1614-1622. [<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.07.002>]
- BEBELMAN, M.P., SMIT, M.J., PEGTEL, D.M., *et al.* (2018) Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. *Pharmacology & Therapeutics* vol. 188, p. 1-11. [<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.02.013>]
- BELTRAMI, C., BESNIER, M., SHANTIKUMAR, S., *et al.* (2017) Human Pericardial Fluid Contains Exosomes Enriched with Cardiovascular-Expressed MicroRNAs and Promotes Therapeutic Angiogenesis. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* vol. 25, n° 3, p. 679-693. [<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2016.12.022>]
- BERGSMEDH, A., SZELES, A., HENRIKSSON, M., *et al.* (2001) Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 98, n° 11, p. 6407-6411. [<https://doi.org/10.1073/pnas.101129998>]

- BINENBAUM, Y., FRIDMAN, E., YAARI, Z., *et al.* (2018) Transfer of miRNA in Macrophage-Derived Exosomes Induces Drug Resistance in Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancer Research* vol. 78, n° 18, p. 5287-5299. [<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0124>]
- BOLIGNANO, D., MATTACE-RASO, F., SIJBRANDS, E.J.G., *et al.* (2014) The aging kidney revisited: a systematic review. *Ageing Research Reviews* vol. 14, p. 65-80. [<https://doi.org/10.1016/j.arr.2014.02.003>]
- BONIFACINO, J.S., GLICK, B.S. (2004) The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* vol. 116, n° 2, p. 153-166. [[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)01079-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)01079-1)]
- BOOTH, A.M., FANG, Y., FALLON, J.K., *et al.* (2006) Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. *The Journal of Cell Biology* vol. 172, n° 6, p. 923-935. [<https://doi.org/10.1083/jcb.200508014>]
- BORIACHEK, K., ISLAM, M.N., MÖLLER, A., *et al.* (2018) Biological Functions and Current Advances in Isolation and Detection Strategies for Exosome Nanovesicles. *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)* vol. 14, n° 6. [<https://doi.org/10.1002/sml.201702153>]
- BRADY, J.V., TROYER, R.M., RAMSEY, S.A., *et al.* (2018) A Preliminary Proteomic Investigation of Circulating Exosomes and Discovery of Biomarkers Associated with the Progression of Osteosarcoma in a Clinical Model of Spontaneous Disease. *Translational Oncology* vol. 11, n° 5, p. 1137-1146. [<https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.07.004>]
- BURGER, D., THIBODEAU, J.-F., HOLTERMAN, C.E., *et al.* (2014) Urinary podocyte microparticles identify prealbuminuric diabetic glomerular injury. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* vol. 25, n° 7, p. 1401-1407. [<https://doi.org/10.1681/ASN.2013070763>]
- BUSCHOW, S.I., NOLTE-T HOEN, E.N.M., VAN NIEL, G., *et al.* (2009) MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* vol. 10, n° 10, p. 1528-1542. [<https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00963.x>]
- BUTIN-ISRAELI, V., BUI, T.M., WIESOLEK, H.L., *et al.* (2019) Neutrophil-induced genomic instability impedes resolution of inflammation and wound healing. *The Journal of Clinical Investigation* vol. 129, n° 2, p. 712-726. [<https://doi.org/10.1172/JCI122085>]
- CAI, H., REINISCH, K., FERRO-NOVICK, S. (2007) Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Developmental Cell* vol. 12, n° 5, p. 671-682. [<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.04.005>]
- CAO, Z., WU, Y., LIU, G., *et al.* (2019) α -Synuclein in salivary extracellular vesicles as a potential biomarker of Parkinson's disease. *Neuroscience Letters* vol. 696, p. 114-120. [<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.12.030>]
- CAOBI, A., NAIR, M., RAYMOND, A.D. (2020) Extracellular Vesicles in the Pathogenesis of Viral Infections in Humans. *Viruses* vol. 12, n° 10, p. E1200. [<https://doi.org/10.3390/v12101200>]
- CAROSSINO, M., DINI, P., KALBFLEISCH, T.S., *et al.* (2018) Downregulation of MicroRNA ecamir-128 in Seminal Exosomes and Enhanced Expression of CXCL16 in the Stallion Reproductive Tract Are Associated with Long-Term Persistence of Equine Arteritis Virus. *Journal of Virology* vol. 92, n° 9, p. e00015-18. [<https://doi.org/10.1128/JVI.00015-18>]
- CASADO, J.G., BLÁZQUEZ, R., VELA, F.J., *et al.* (2017) Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes: Immunomodulatory Evaluation in an Antigen-Induced Synovitis Porcine Model. *Frontiers in Veterinary Science* vol. 4, p. 39. [<https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00039>]
- CASTAÑO, C., NOVIALS, A., PÁRRIZAS, M. (2019) Exosomes and diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* vol. 35, n° 3, p. e3107. [<https://doi.org/10.1002/dmrr.3107>]
- CASTRO, B.M., PRIETO, M., SILVA, L.C. (2014) Ceramide: a simple sphingolipid with unique biophysical properties. *Progress in Lipid Research* vol. 54, p. 53-67. [<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2014.01.004>]

- CHAIROUNGDU, A., SMITH, D.L., POCHARD, P., *et al.* (2010) Exosome release of β -catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *The Journal of Cell Biology* vol. 190, n° 6, p. 1079-1091. [<https://doi.org/10.1083/jcb.201002049>]
- CHAN, B.D., WONG, W.-Y., LEE, M.M.-L., *et al.* (2019) Exosomes in Inflammation and Inflammatory Disease. *Proteomics* vol. 19, n° 8, p. e1800149. [<https://doi.org/10.1002/pmic.201800149>]
- CHARRIN, S., JOUANNET, S., BOUCHEIX, C., *et al.* (2014) Tetraspanins at a glance. *Journal of Cell Science* vol. 127, n° Pt 17, p. 3641-3648. [<https://doi.org/10.1242/jcs.154906>]
- CHEN, G., HUANG, A.C., ZHANG, W., *et al.* (2018) Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature* vol. 560, n° 7718, p. 382-386. [<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0392-8>]
- CHEN, T., XIE, M.-Y., SUN, J.-J., *et al.* (2016) Porcine milk-derived exosomes promote proliferation of intestinal epithelial cells. *Scientific Reports* vol. 6, p. 33862. [<https://doi.org/10.1038/srep33862>]
- CHEN, Y., WANG, X., YU, Y., *et al.* (2018) Serum exosomes of chronic gastritis patients infected with *Helicobacter pylori* mediate IL-1 α expression via IL-6 trans-signalling in gastric epithelial cells. *Clinical and Experimental Immunology* vol. 194, n° 3, p. 339-349. [<https://doi.org/10.1111/cei.13200>]
- CHENG, H., FAN, J.-H., ZHAO, L.-P., *et al.* (2019) Chimeric peptide engineered exosomes for dual-stage light guided plasma membrane and nucleus targeted photodynamic therapy. *Biomaterials* vol. 211, p. 14-24. [<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.05.004>]
- CHENG, Q., SHI, X., HAN, M., *et al.* (2018) Reprogramming Exosomes as Nanoscale Controllers of Cellular Immunity. *Journal of the American Chemical Society* vol. 140, n° 48, p. 16413-16417. [<https://doi.org/10.1021/jacs.8b10047>]
- CHENG, Y., SCHOREY, J.S. (2016) Targeting soluble proteins to exosomes using a ubiquitin tag. *Biotechnology and Bioengineering* vol. 113, n° 6, p. 1315-1324. [<https://doi.org/10.1002/bit.25884>]
- CHENG, Y., WANG, X., YANG, J., *et al.* (2012) A translational study of urine miRNAs in acute myocardial infarction. *Journal of molecular and cellular cardiology* vol. 53, n° 5, p. 668-676. [<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.08.010>]
- CHIABOTTO, G., BRUNO, S., COLLINO, F., *et al.* (2016) Mesenchymal Stromal Cells Epithelial Transition Induced by Renal Tubular Cells-Derived Extracellular Vesicles. *PloS One* vol. 11, n° 7, p. e0159163. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159163>]
- CHOI, H., CHOI, Y., YIM, H.Y., *et al.* (2021) Biodistribution of Exosomes and Engineering Strategies for Targeted Delivery of Therapeutic Exosomes. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* vol. 18, n° 4, p. 499-511. [<https://doi.org/10.1007/s13770-021-00361-0>]
- CINTIO, M., POLACCHINI, G., SCARSELLA, E., *et al.* (2020) MicroRNA Milk Exosomes: From Cellular Regulator to Genomic Marker. *Animals: an open access journal from MDPI* vol. 10, n° 7, p. E1126. [<https://doi.org/10.3390/ani10071126>]
- COLLINO, F., POMATTO, M., BRUNO, S., *et al.* (2017) Exosome and Microvesicle-Enriched Fractions Isolated from Mesenchymal Stem Cells by Gradient Separation Showed Different Molecular Signatures and Functions on Renal Tubular Epithelial Cells. *Stem Cell Reviews and Reports* vol. 13, n° 2, p. 226-243. [<https://doi.org/10.1007/s12015-016-9713-1>]
- COLOMBO, M., MOITA, C., VAN NIEL, G., *et al.* (2013) Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of Cell Science* vol. 126, n° 24, p. 5553-5565. [<https://doi.org/10.1242/jcs.128868>]
- COLOMBO, M., RAPOSO, G., THÉRY, C. (2014) Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annual Review of Cell and*

- Developmental Biology* vol. 30, n° 1, p. 255-289. [<https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>]
- COPPIETERS, K., BARRAL, A.M., JUEDES, A., *et al.* (2009) No significant CTL cross-priming by dendritic cell-derived exosomes during murine lymphocytic choriomeningitis virus infection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* vol. 182, n° 4, p. 2213-2220. [<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802578>]
- CORRADO, C., RAIMONDO, S., CHIESI, A., *et al.* (2013) Exosomes as intercellular signaling organelles involved in health and disease: basic science and clinical applications. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 14, n° 3, p. 5338-5366. [<https://doi.org/10.3390/ijms14035338>]
- CRESSATTI, M., JUWARA, L., GALINDEZ, J.M., *et al.* (2020) Salivary microR-153 and microR-223 Levels as Potential Diagnostic Biomarkers of Idiopathic Parkinson's Disease. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* vol. 35, n° 3, p. 468-477. [<https://doi.org/10.1002/mds.27935>]
- CRUSZ, S.M., BALKWILL, F.R. (2015) Inflammation and cancer: advances and new agents. *Nature Reviews. Clinical Oncology* vol. 12, n° 10, p. 584-596. [<https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2015.105>]
- CVJETKOVIC, A., LÖTVALL, J., LÄSSER, C. (2014) The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles* vol. 3. [<https://doi.org/10.3402/jev.v3.23111>]
- CZERNEK, L., DÜCHLER, M. (2020) Exosomes as Messengers between Mother and Fetus in Pregnancy. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 21, n° 12, p. 4264. [<https://doi.org/10.3390/ijms21124264>]
- DAGOGO-JACK, I., SHAW, A.T. (2018) Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nature Reviews. Clinical Oncology* vol. 15, n° 2, p. 81-94. [<https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.166>]
- DAI, X., CHEN, C., YANG, Q., *et al.* (2018) Exosomal circRNA_100284 from arsenite-transformed cells, via microRNA-217 regulation of EZH2, is involved in the malignant transformation of human hepatic cells by accelerating the cell cycle and promoting cell proliferation. *Cell Death & Disease* vol. 9, n° 5, p. 454. [<https://doi.org/10.1038/s41419-018-0485-1>]
- DEATHERAGE, B.L., COOKSON, B.T. (2012) Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infection and Immunity* vol. 80, n° 6, p. 1948-1957. [<https://doi.org/10.1128/IAI.06014-11>]
- DEL CACHO, E., GALLEGO, M., LEE, S.H., *et al.* (2011) Induction of protective immunity against *Eimeria tenella* infection using antigen-loaded dendritic cells (DC) and DC-derived exosomes. *Vaccine* vol. 29, n° 21, p. 3818-3825. [<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.03.022>]
- DING, C., YI, X., WU, X., *et al.* (2020) Exosome-mediated transfer of circRNA CircNFIX enhances temozolomide resistance in glioma. *Cancer Letters* vol. 479, p. 1-12. [<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.03.002>]
- DOMINGUES, H.S., FALCÃO, A.M., MENDES-PINTO, I., *et al.* (2020) Exosome Circuitry During (De)(Re)Myelination of the Central Nervous System. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* vol. 8, p. 483. [<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00483>]
- DORAYAPPAN, K.D.P., WANNER, R., WALLBILLICH, J.J., *et al.* (2018) Hypoxia-induced exosomes contribute to a more aggressive and chemoresistant ovarian cancer phenotype: a novel mechanism linking STAT3/Rab proteins. *Oncogene* vol. 37, n° 28, p. 3806-3821. [<https://doi.org/10.1038/s41388-018-0189-0>]
- DOYLE, L.M., WANG, M.Z. (2019) Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells* vol. 8, n° 7, p. E727. [<https://doi.org/10.3390/cells8070727>]

- DRAGOVIC, R.A., GARDINER, C., BROOKS, A.S., *et al.* (2011) Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* vol. 7, n° 6, p. 780-788. [<https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.04.003>]
- DZIAŁO, E., RUDNIK, M., KONING, R.I., *et al.* (2019) WNT3a and WNT5a Transported by Exosomes Activate WNT Signaling Pathways in Human Cardiac Fibroblasts. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 20, n° 6, p. E1436. [<https://doi.org/10.3390/ijms20061436>]
- EITAN, E., SUIRE, C., ZHANG, S., *et al.* (2016) Impact of lysosome status on extracellular vesicle content and release. *Ageing Research Reviews* vol. 32, p. 65-74. [<https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.05.001>]
- EL-TOOKHY, O.S., SHAMAA, A.A., SHEHAB, G.G., *et al.* (2017) Histological Evaluation of Experimentally Induced Critical Size Defect Skin Wounds Using Exosomal Solution of Mesenchymal Stem Cells Derived Microvesicles. *International Journal of Stem Cells* vol. 10, n° 2, p. 144-153. [<https://doi.org/10.15283/ijsc17043>]
- EMANUELI, C., SHEARN, A.I.U., LAFTAH, A., *et al.* (2016) Coronary Artery-Bypass-Graft Surgery Increases the Plasma Concentration of Exosomes Carrying a Cargo of Cardiac MicroRNAs: An Example of Exosome Trafficking Out of the Human Heart with Potential for Cardiac Biomarker Discovery. *PloS One* vol. 11, n° 4, p. e0154274. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154274>]
- FADER, C.M., SÁNCHEZ, D.G., MESTRE, M.B., *et al.* (2009) TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochimica Et Biophysica Acta* vol. 1793, n° 12, p. 1901-1916. [<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.09.011>]
- FAGHIHI, M.A., MODARRESI, F., KHALIL, A.M., *et al.* (2008) Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of β -secretase expression. *Nature medicine* vol. 14, n° 7, p. 723-730. [<https://doi.org/10.1038/nm1784>]
- FANG, T., LV, H., LV, G., *et al.* (2018) Tumor-derived exosomal miR-1247-3p induces cancer-associated fibroblast activation to foster lung metastasis of liver cancer. *Nature Communications* vol. 9, n° 1, p. 191. [<https://doi.org/10.1038/s41467-017-02583-0>]
- FERRAZ, M. de A.M.M., CAROTHERS, A., DAHAL, R., *et al.* (2019) Oviductal extracellular vesicles interact with the spermatozoon's head and mid-piece and improves its motility and fertilizing ability in the domestic cat. *Scientific Reports* vol. 9, n° 1, p. 9484. [<https://doi.org/10.1038/s41598-019-45857-x>]
- FILIPE, V., HAWE, A., JISKOOT, W. (2010) Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharmaceutical Research* vol. 27, n° 5, p. 796-810. [<https://doi.org/10.1007/s11095-010-0073-2>]
- FISH, E.J., IRIZARRY, K.J., DEINNOCENTES, P., *et al.* (2018) Malignant canine mammary epithelial cells shed exosomes containing differentially expressed microRNA that regulate oncogenic networks. *BMC cancer* vol. 18, n° 1, p. 832. [<https://doi.org/10.1186/s12885-018-4750-6>]
- FOJ, L., FERRER, F., SERRA, M., *et al.* (2017) Exosomal and Non-Exosomal Urinary miRNAs in Prostate Cancer Detection and Prognosis. *The Prostate* vol. 77, n° 6, p. 573-583. [<https://doi.org/10.1002/pros.23295>]
- FRAGKOULI, A., DOXAKIS, E. (2014) miR-7 and miR-153 protect neurons against MPP(+)-induced cell death via upregulation of mTOR pathway. *Frontiers in Cellular Neuroscience* vol. 8, p. 182. [<https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00182>]
- FRÖHLICH, D., KUO, W.P., FRÜHBEIS, C., *et al.* (2014) Multifaceted effects of oligodendroglial exosomes on neurons: impact on neuronal firing rate, signal transduction and gene regulation.

- Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* vol. 369, n° 1652, p. 20130510. [<https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0510>]
- FRÜHBEIS, C., FRÖHLICH, D., KUO, W.P., *et al.* (2013) Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication. *PLoS biology* vol. 11, n° 7, p. e1001604. [<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001604>]
- FUHLER, G.M. (2020) The immune system and microbiome in pregnancy. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology* vol. 44-45, p. 101671. [<https://doi.org/10.1016/j.bpg.2020.101671>]
- FUHRMANN, G., SERIO, A., MAZO, M., *et al.* (2015) Active loading into extracellular vesicles significantly improves the cellular uptake and photodynamic effect of porphyrins. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* vol. 205, p. 35-44. [<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.11.029>]
- GALLAGHER, S., WINSTON, S.E., FULLER, S.A., *et al.* (2008) Immunoblotting and immunodetection. *Current Protocols in Molecular Biology* vol. Chapter 10, p. Unit 10.8. [<https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1008s83>]
- GÁMEZ-VALERO, A., MONGUIÓ-TORTAJADA, M., CARRERAS-PLANELLA, L., *et al.* (2016) Size-Exclusion Chromatography-based isolation minimally alters Extracellular Vesicles' characteristics compared to precipitating agents. *Scientific Reports* vol. 6, p. 33641. [<https://doi.org/10.1038/srep33641>]
- GAO, X., RAN, N., DONG, X., *et al.* (2018) Anchor peptide captures, targets, and loads exosomes of diverse origins for diagnostics and therapy. *Science Translational Medicine* vol. 10, n° 444, p. eaat0195. [<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat0195>]
- GARCÍA, C., DUAN, R.D., BRÉVAUT-MALATY, V., *et al.* (2013) Bioactive compounds in human milk and intestinal health and maturity in preterm newborn: an overview. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)* vol. 59, n° 1, p. 108-131.
- GARCÍA, N.A., MONCAYO-ARLANDI, J., SEPULVEDA, P., *et al.* (2016) Cardiomyocyte exosomes regulate glycolytic flux in endothelium by direct transfer of GLUT transporters and glycolytic enzymes. *Cardiovascular Research* vol. 109, n° 3, p. 397-408. [<https://doi.org/10.1093/cvr/cvv260>]
- GAUTHIER, S.A., PÉREZ-GONZÁLEZ, R., SHARMA, A., *et al.* (2017) Enhanced exosome secretion in Down syndrome brain - a protective mechanism to alleviate neuronal endosomal abnormalities. *Acta Neuropathologica Communications* vol. 5, n° 1, p. 65. [<https://doi.org/10.1186/s40478-017-0466-0>]
- GHOSH, J., BOSE, M., ROY, S., *et al.* (2013) Leishmania donovani targets Dicer1 to downregulate miR-122, lower serum cholesterol, and facilitate murine liver infection. *Cell Host & Microbe* vol. 13, n° 3, p. 277-288. [<https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.02.005>]
- GHOSSOUB, R., LEMBO, F., RUBIO, A., *et al.* (2014) Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2. *Nature Communications* vol. 5, n° 1, p. 3477. [<https://doi.org/10.1038/ncomms4477>]
- GIRI, P.K., SCHOREY, J.S. (2008) Exosomes derived from M. Bovis BCG infected macrophages activate antigen-specific CD4+ and CD8+ T cells in vitro and in vivo. *PloS One* vol. 3, n° 6, p. e2461. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002461>]
- GITAÍ, D.L.G., DOS SANTOS, Y.D.R., UPADHYA, R., *et al.* (2020) Extracellular Vesicles in the Forebrain Display Reduced miR-346 and miR-331-3p in a Rat Model of Chronic Temporal Lobe Epilepsy. *Molecular Neurobiology* vol. 57, n° 3, p. 1674-1687. [<https://doi.org/10.1007/s12035-019-01797-1>]
- GOETZL, E.J., BOXER, A., SCHWARTZ, J.B., *et al.* (2015) Altered lysosomal proteins in neural-derived plasma exosomes in preclinical Alzheimer disease. *Neurology* vol. 85, n° 1, p. 40-47. [<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001702>]

- GOLOVIZNINA, N.A., VERGHESE, S.C., YOON, Y.M., *et al.* (2016) Mesenchymal Stromal Cell-derived Extracellular Vesicles Promote Myeloid-biased Multipotent Hematopoietic Progenitor Expansion via Toll-Like Receptor Engagement. *The Journal of Biological Chemistry* vol. 291, n° 47, p. 24607-24617. [<https://doi.org/10.1074/jbc.M116.745653>]
- GÓMEZ-MOLINA, C., SANDOVAL, M., HENZI, R., *et al.* (2019) Small Extracellular Vesicles in Rat Serum Contain Astrocyte-Derived Protein Biomarkers of Repetitive Stress. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* vol. 22, n° 3, p. 232-246. [<https://doi.org/10.1093/ijnp/pyy098>]
- GOÑI, F.M., ALONSO, A. (2009) Effects of ceramide and other simple sphingolipids on membrane lateral structure. *Biochimica Et Biophysica Acta* vol. 1788, n° 1, p. 169-177. [<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.09.002>]
- GOULET, C.R., CHAMPAGNE, A., BERNARD, G., *et al.* (2019) Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of bladder cancer cells through paracrine IL-6 signalling. *BMC cancer* vol. 19, n° 1, p. 137. [<https://doi.org/10.1186/s12885-019-5353-6>]
- GREENING, D.W., NGUYEN, H.P.T., ELGASS, K., *et al.* (2016) Human Endometrial Exosomes Contain Hormone-Specific Cargo Modulating Trophoblast Adhesive Capacity: Insights into Endometrial-Embryo Interactions. *Biology of Reproduction* vol. 94, n° 2, p. 38. [<https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.134890>]
- GRIVENNIKOV, S.I., GRETEN, F.R., KARIN, M. (2010) Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* vol. 140, n° 6, p. 883-899. [<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>]
- GROSS, J.C., CHAUDHARY, V., BARTSCHERER, K., *et al.* (2012) Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nature Cell Biology* vol. 14, n° 10, p. 1036-1045. [<https://doi.org/10.1038/ncb2574>]
- GUESCINI, M., GENEDANI, S., STOCCHI, V., *et al.* (2010) Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)* vol. 117, n° 1, p. 1-4. [<https://doi.org/10.1007/s00702-009-0288-8>]
- GUIX, F.X., CORBETT, G.T., CHA, D.J., *et al.* (2018) Detection of Aggregation-Competent Tau in Neuron-Derived Extracellular Vesicles. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 19, n° 3, p. E663. [<https://doi.org/10.3390/ijms19030663>]
- GUIX, F.X., SANNERUD, R., BERDITCHEVSKI, F., *et al.* (2017) Tetraspanin 6: a pivotal protein of the multiple vesicular body determining exosome release and lysosomal degradation of amyloid precursor protein fragments. *Molecular Neurodegeneration* vol. 12, n° 1, p. 25. [<https://doi.org/10.1186/s13024-017-0165-0>]
- GUO, D., XU, Y., DING, J., *et al.* (2020) Roles and Clinical Applications of Exosomes in Cardiovascular Disease. *BioMed Research International* vol. 2020, p. e5424281. [<https://doi.org/10.1155/2020/5424281>]
- GUO, H., CHITIPROLU, M., RONCEVIC, L., *et al.* (2017) Atg5 Disassociates the V1V0-ATPase to Promote Exosome Production and Tumor Metastasis Independent of Canonical Macroautophagy. *Developmental Cell* vol. 43, n° 6, p. 716- 730.e7. [<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.11.018>]
- GYÖRGY, B., SZABÓ, T.G., PÁSZTÓI, M., *et al.* (2011) Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* vol. 68, n° 16, p. 2667-2688. [<https://doi.org/10.1007/s00018-011-0689-3>]
- HANEY, M.J., KLYACHKO, N.L., ZHAO, Y., *et al.* (2015) Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* vol. 207, p. 18-30. [<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.03.033>]
- HANSON, P.I., CASHIKAR, A. (2012) Multivesicular body morphogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* vol. 28, p. 337-362. [<https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154152>]

- HARDING, C., HEUSER, J., STAHL, P. (1983) Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *The Journal of Cell Biology* vol. 97, n° 2, p. 329-339. [<https://doi.org/10.1083/jcb.97.2.329>]
- HE, M., CROW, J., ROTH, M., *et al.* (2014) Integrated immunoisolation and protein analysis of circulating exosomes using microfluidic technology. *Lab on a Chip* vol. 14, n° 19, p. 3773-3780. [<https://doi.org/10.1039/c4lc00662c>]
- HÉBERT, S.S., HORRÉ, K., NICOLAÏ, L., *et al.* (2009) MicroRNA regulation of Alzheimer's Amyloid precursor protein expression. *Neurobiology of Disease* vol. 33, n° 3, p. 422-428. [<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.11.009>]
- HEINEMANN, M.L., ILMER, M., SILVA, L.P., *et al.* (2014) Benchtop isolation and characterization of functional exosomes by sequential filtration. *Journal of Chromatography. A* vol. 1371, p. 125-135. [<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.10.026>]
- HEISHIMA, K., ICHIKAWA, Y., YOSHIDA, K., *et al.* (2017) Circulating microRNA-214 and -126 as potential biomarkers for canine neoplastic disease. *Scientific Reports* vol. 7, n° 1, p. 2301. [<https://doi.org/10.1038/s41598-017-02607-1>]
- HENNE, W.M., BUCHKOVICH, N.J., EMR, S.D. (2011) The ESCRT Pathway. *Developmental Cell* vol. 21, n° 1, p. 77-91. [<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.05.015>]
- HENNING, R.J. (2021) Cardiovascular Exosomes and MicroRNAs in Cardiovascular Physiology and Pathophysiology. *Journal of Cardiovascular Translational Research* vol. 14, n° 2, p. 195-212. [<https://doi.org/10.1007/s12265-020-10040-5>]
- HESSVIK, N.P., LLORENTE, A. (2018) Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular and Molecular Life Sciences* vol. 75, n° 2, p. 193-208. [<https://doi.org/10.1007/s00018-017-2595-9>]
- HIEMSTRA, T.F., CHARLES, P.D., GRACIA, T., *et al.* (2014) Human urinary exosomes as innate immune effectors. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* vol. 25, n° 9, p. 2017-2027. [<https://doi.org/10.1681/ASN.2013101066>]
- HOGAN, M.C., MANGANELLI, L., WOOLLARD, J.R., *et al.* (2009) Characterization of PKD protein-positive exosome-like vesicles. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* vol. 20, n° 2, p. 278-288. [<https://doi.org/10.1681/ASN.2008060564>]
- HOLMGREN, L., SZELES, A., RAJNAVÖLGYI, E., *et al.* (1999) Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Blood* vol. 93, n° 11, p. 3956-3963.
- HOSHINO, A., COSTA-SILVA, B., SHEN, T.-L., *et al.* (2015) Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* vol. 527, n° 7578, p. 329-335. [<https://doi.org/10.1038/nature15756>]
- HOSSEINI, H.M., FOOLADI, A.A.I., NOURANI, M.R., *et al.* (2013) The role of exosomes in infectious diseases. *Inflammation & Allergy Drug Targets* vol. 12, n° 1, p. 29-37. [<https://doi.org/10.2174/1871528111312010005>]
- HSU, C., MOROHASHI, Y., YOSHIMURA, S.-I., *et al.* (2010) Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *The Journal of Cell Biology* vol. 189, n° 2, p. 223-232. [<https://doi.org/10.1083/jcb.200911018>]
- HSU, D.-H., PAZ, P., VILLAFLORES, G., *et al.* (2003) Exosomes as a tumor vaccine: enhancing potency through direct loading of antigenic peptides. *Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)* vol. 26, n° 5, p. 440-450. [<https://doi.org/10.1097/00002371-200309000-00007>]
- HUANG, W., LIN, M., YANG, C., *et al.* (2021) Rat Bone Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Loaded with miR-494 Promoting Neurofilament Regeneration and Behavioral Function Recovery after Spinal Cord Injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* vol. 2021, p. 1634917. [<https://doi.org/10.1155/2021/1634917>]

- HUANG, X., YUAN, T., TSCHANNEN, M., *et al.* (2013) Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC genomics* vol. 14, p. 319. [https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-319]
- HUEBNER, A.R., CHENG, L., SOMPARN, P., *et al.* (2016) Deubiquitylation of Protein Cargo Is Not an Essential Step in Exosome Formation. *Molecular & cellular proteomics: MCP* vol. 15, n° 5, p. 1556-1571. [https://doi.org/10.1074/mcp.M115.054965]
- HURLEY, J.H. (2015) ESCRTs are everywhere. *The EMBO journal* vol. 34, n° 19, p. 2398-2407. [https://doi.org/10.15252/embj.201592484]
- HURLEY, J.H. (2008) ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Current Opinion in Cell Biology* vol. 20, n° 1, p. 4-11. [https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.12.002]
- HUSNA, A.A., RAHMAN, M.M., LAI, Y.-C., *et al.* (2021) Identification of melanoma-specific exosomal miRNAs as the potential biomarker for canine oral melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research* vol. 34, n° 6, p. 1062-1073. [https://doi.org/10.1111/pcmr.13000]
- HYENNE, V., APAYDIN, A., RODRIGUEZ, D., *et al.* (2015) RAL-1 controls multivesicular body biogenesis and exosome secretion. *The Journal of Cell Biology* vol. 211, n° 1, p. 27-37. [https://doi.org/10.1083/jcb.201504136]
- IBRAHIM, A., MARBÁN, E. (2016) Exosomes: Fundamental Biology and Roles in Cardiovascular Physiology. *Annual Review of Physiology* vol. 78, p. 67-83. [https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-104929]
- ICHI, O., OHTA, H., HORINO, T., *et al.* (2018) Urinary Exosome-Derived microRNAs Reflecting the Changes in Renal Function in Cats. *Frontiers in Veterinary Science* vol. 5, p. 289. [https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00289]
- ICHI, O., OHTA, H., HORINO, T., *et al.* (2017) Urinary exosome-derived microRNAs reflecting the changes of renal function and histopathology in dogs. *Scientific Reports* vol. 7, p. 40340. [https://doi.org/10.1038/srep40340]
- ICHI, O., OTSUKA, S., OHTA, H., *et al.* (2014) MicroRNA expression profiling of cat and dog kidneys. *Research in Veterinary Science* vol. 96, n° 2, p. 299-303. [https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.01.003]
- IKEDA, F., DIKIC, I. (2008) Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. « Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects » review series. *EMBO reports* vol. 9, n° 6, p. 536-542. [https://doi.org/10.1038/embor.2008.93]
- JADLI, A.S., BALLASY, N., EDALAT, P., *et al.* (2020) Inside(sight) of tiny communicator: exosome biogenesis, secretion, and uptake. *Molecular and Cellular Biochemistry* vol. 467, n° 1-2, p. 77-94. [https://doi.org/10.1007/s11010-020-03703-z]
- JADLI, A.S., PARASOR, A., GOMES, K.P., *et al.* (2021) Exosomes in Cardiovascular Diseases: Pathological Potential of Nano-Messenger. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* vol. 8, p. 767488. [https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.767488]
- JAFARI, D., SHAJARI, S., JAFARI, R., *et al.* (2020) Designer Exosomes: A New Platform for Biotechnology Therapeutics. *BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy* vol. 34, n° 5, p. 567-586. [https://doi.org/10.1007/s40259-020-00434-x]
- JAHN, R., SCHELLER, R.H. (2006) SNAREs--engines for membrane fusion. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* vol. 7, n° 9, p. 631-643. [https://doi.org/10.1038/nrm2002]
- JANAS, Teresa, JANAS, M.M., SAPÓN, K., *et al.* (2015) Mechanisms of RNA loading into exosomes. *FEBS letters* vol. 589, n° 13, p. 1391-1398. [https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.04.036]
- JAVALET, C. (2016) Rôle des exosomes comme nouvelle voie de communication entre les neurones. These de doctorat. Université Grenoble Alpes (ComUE).
- JAYADEV, S., CASE, A., ALAJAJIAN, B., *et al.* (2013) Presenilin 2 influences miR146 level and activity in microglia. *Journal of Neurochemistry* vol. 127, n° 5, p. 592-599. [https://doi.org/10.1111/jnc.12400]

- JELLA, K.K., YU, L., YUE, Q., *et al.* (2016) Exosomal GAPDH from Proximal Tubule Cells Regulate ENaC Activity. *PloS One* vol. 11, n° 11, p. e0165763. [https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165763]
- JEON, J.S., KIM, E., BAE, Y.-U., *et al.* (2020) microRNA in Extracellular Vesicles Released by Damaged Podocytes Promote Apoptosis of Renal Tubular Epithelial Cells. *Cells* vol. 9, n° 6, p. E1409. [https://doi.org/10.3390/cells9061409]
- JEPPESEN, D.K., FENIX, A.M., FRANKLIN, J.L., *et al.* (2019) Reassessment of Exosome Composition. *Cell* vol. 177, n° 2, p. 428- 445.e18. [https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.029]
- JIA, L., QIU, Q., ZHANG, H., *et al.* (2019) Concordance between the assessment of A β 42, T-tau, and P-T181-tau in peripheral blood neuronal-derived exosomes and cerebrospinal fluid. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* vol. 15, n° 8, p. 1071-1080. [https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.05.002]
- JIA, L., ZHU, M., KONG, C., *et al.* (2021) Blood neuro-exosomal synaptic proteins predict Alzheimer's disease at the asymptomatic stage. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* vol. 17, n° 1, p. 49-60. [https://doi.org/10.1002/alz.12166]
- JIANG, C., HOPFNER, F., BERG, D., *et al.* (2021) Validation of α -Synuclein in L1CAM-Immunocaptured Exosomes as a Biomarker for the Stratification of Parkinsonian Syndromes. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* vol. 36, n° 11, p. 2663-2669. [https://doi.org/10.1002/mds.28591]
- JIANG, W., TAN, Y., CAI, M., *et al.* (2018) Human Umbilical Cord MSC-Derived Exosomes Suppress the Development of CCl₄-Induced Liver Injury through Antioxidant Effect. *Stem Cells International* vol. 2018, p. 6079642. [https://doi.org/10.1155/2018/6079642]
- JIMENEZ-PUERTA, G.J., MARCHAL, J.A., LÓPEZ-RUIZ, E., *et al.* (2020) Role of Mesenchymal Stromal Cells as Therapeutic Agents: Potential Mechanisms of Action and Implications in Their Clinical Use. *Journal of Clinical Medicine* vol. 9, n° 2, p. E445. [https://doi.org/10.3390/jcm9020445]
- JOHNSTONE, R.M. (2005) Revisiting the road to the discovery of exosomes. *Blood Cells, Molecules & Diseases* vol. 34, n° 3, p. 214-219. [https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2005.03.002]
- JOHNSTONE, R.M. (1992) The Jeanne Manery-Fisher Memorial Lecture 1991. Maturation of reticulocytes: formation of exosomes as a mechanism for shedding membrane proteins. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire* vol. 70, n° 3-4, p. 179-190. [https://doi.org/10.1139/o92-028]
- JOHNSTONE, R.M., ADAM, M., HAMMOND, J.R., *et al.* (1987) Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *The Journal of Biological Chemistry* vol. 262, n° 19, p. 9412-9420.
- JUNG, B.-K., KIM, E.-D., SONG, H., *et al.* (2020) Immunogenicity of Exosomes from Dendritic Cells Stimulated with *Toxoplasma gondii* Lysates in Ocularly Immunized Mice. *The Korean Journal of Parasitology* vol. 58, n° 2, p. 185-189. [https://doi.org/10.3347/kjp.2020.58.2.185]
- KAJIMOTO, T., OKADA, T., MIYA, S., *et al.* (2013) Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes. *Nature Communications* vol. 4, p. 2712. [https://doi.org/10.1038/ncomms3712]
- KALRA, H., DRUMMEN, G.P.C., MATHIVANAN, S. (2016) Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 17, n° 2, p. 170. [https://doi.org/10.3390/ijms17020170]
- KAMINSKI, V. de L., ELLWANGER, J.H., CHIES, J.A.B. (2019) Extracellular vesicles in host-pathogen interactions and immune regulation - exosomes as emerging actors in the immunological theater of pregnancy. *Heliyon* vol. 5, n° 8, p. e02355. [https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02355]
- KANG, D., OH, S., AHN, S.-M., *et al.* (2008) Proteomic analysis of exosomes from human neural stem cells by flow field-flow fractionation and nanoflow liquid chromatography-tandem mass

- spectrometry. *Journal of Proteome Research* vol. 7, n° 8, p. 3475-3480. [https://doi.org/10.1021/pr800225z]
- KANMERT, D., CANTLON, A., MURATORE, C.R., *et al.* (2015) C-Terminally Truncated Forms of Tau, But Not Full-Length Tau or Its C-Terminal Fragments, Are Released from Neurons Independently of Cell Death. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* vol. 35, n° 30, p. 10851-10865. [https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0387-15.2015]
- KANUMA, T., YAMAMOTO, T., KOBIYAMA, K., *et al.* (2017) CD63-Mediated Antigen Delivery into Extracellular Vesicles via DNA Vaccination Results in Robust CD8+ T Cell Responses. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* vol. 198, n° 12, p. 4707-4715. [https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600731]
- KEERTHIKUMAR, S., CHISANGA, D., ARIYARATNE, D., *et al.* (2016) ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *Journal of Molecular Biology, Computation Resources for Molecular Biology* vol. 428, n° 4, p. 688-692. [https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.09.019]
- KHAN, A.Q., AKHTAR, S., PRABHU, K.S., *et al.* (2020) Exosomes: Emerging Diagnostic and Therapeutic Targets in Cutaneous Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 21, n° 23, p. E9264. [https://doi.org/10.3390/ijms21239264]
- KIM, D.-K., KANG, B., KIM, O.Y., *et al.* (2013) EVpedia: an integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles* vol. 2, p. 10.3402/jev.v2i0.20384. [https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.20384]
- KIM, K.H., PARK, T.S., CHO, B.-W., *et al.* (2020) Nanoparticles from Equine Fetal Bone Marrow-Derived Cells Enhance the Survival of Injured Chondrocytes. *Animals: an open access journal from MDPI* vol. 10, n° 10, p. E1723. [https://doi.org/10.3390/ani10101723]
- KIM, M.S., HANEY, M.J., ZHAO, Y., *et al.* (2018) Engineering macrophage-derived exosomes for targeted paclitaxel delivery to pulmonary metastases: in vitro and in vivo evaluations. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* vol. 14, n° 1, p. 195-204. [https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.09.011]
- KIM, M.S., HANEY, M.J., ZHAO, Y., *et al.* (2016) Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* vol. 12, n° 3, p. 655-664. [https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.10.012]
- KIM, M.Y., SHIN, H., MOON, H.W., *et al.* (2021) Urinary exosomal microRNA profiling in intermediate-risk prostate cancer. *Scientific Reports* vol. 11, n° 1, p. 7355. [https://doi.org/10.1038/s41598-021-86785-z]
- KIM, W., NOH, H., LEE, Y., *et al.* (2016) MiR-126 Regulates Growth Factor Activities and Vulnerability to Toxic Insult in Neurons. *Molecular Neurobiology* vol. 53, n° 1, p. 95-108. [https://doi.org/10.1007/s12035-014-8989-x]
- KLUMPERMAN, J., RAPOSO, G. (2014) The complex ultrastructure of the endolysosomal system. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* vol. 6, n° 10, p. a016857. [https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016857]
- KNOX, K.W., VESK, M., WORK, E. (1966) Relation between excreted lipopolysaccharide complexes and surface structures of a lysine-limited culture of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* vol. 92, n° 4, p. 1206-1217. [https://doi.org/10.1128/jb.92.4.1206-1217.1966]
- KOJIMA, R., BOJAR, D., RIZZI, G., *et al.* (2018) Designer exosomes produced by implanted cells intracerebrally deliver therapeutic cargo for Parkinson's disease treatment. *Nature Communications* vol. 9, n° 1, p. 1305. [https://doi.org/10.1038/s41467-018-03733-8]
- KOOIJMANS, S.A.A., ALEZA, C.G., ROFFLER, S.R., *et al.* (2016) Display of GPI-anchored anti-EGFR nanobodies on extracellular vesicles promotes tumour cell targeting. *Journal of Extracellular Vesicles* vol. 5, p. 31053. [https://doi.org/10.3402/jev.v5.31053]

- KOWAL, J., TKACH, M., THÉRY, C. (2014) Biogenesis and secretion of exosomes. *Current Opinion in Cell Biology*, Cell organelles vol. 29, p. 116-125. [https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.05.004]
- KRAVTSOVA-IVANTSIV, Y., CIECHANOVER, A. (2012) Non-canonical ubiquitin-based signals for proteasomal degradation. *Journal of Cell Science* vol. 125, n° Pt 3, p. 539-548. [https://doi.org/10.1242/jcs.093567]
- KUMAR, S., KIM, C.W., SIMMONS, R.D., *et al.* (2014) Role of flow-sensitive microRNAs in endothelial dysfunction and atherosclerosis: mechanosensitive athero-miRs. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* vol. 34, n° 10, p. 2206-2216. [https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303425]
- KWON, S.H. (2019) Extracellular vesicles in renal physiology and clinical applications for renal disease. *The Korean Journal of Internal Medicine* vol. 34, n° 3, p. 470-479. [https://doi.org/10.3904/kjim.2019.108]
- LAI, C.P., KIM, E.Y., BADR, C.E., *et al.* (2015) Visualization and tracking of tumour extracellular vesicle delivery and RNA translation using multiplexed reporters. *Nature Communications* vol. 6, p. 7029. [https://doi.org/10.1038/ncomms8029]
- LAI, R.C., ARSLAN, F., LEE, M.M., *et al.* (2010) Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Research* vol. 4, n° 3, p. 214-222. [https://doi.org/10.1016/j.scr.2009.12.003]
- LAI, R.C., YEO, R.W.Y., LIM, S.K. (2015) Mesenchymal stem cell exosomes. *Seminars in Cell & Developmental Biology* vol. 40, p. 82-88. [https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.03.001]
- LAI, Y.-C., FUJIKAWA, T., MAEMURA, T., *et al.* (2017) Inflammation-related microRNA expression level in the bovine milk is affected by mastitis. *PloS One* vol. 12, n° 5, p. e0177182. [https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177182]
- LAI, Y.-C., HABIBY, G.H., JASING PATHIRANAGE, C.C., *et al.* (2021) Bovine serum miR-21 expression affected by mastitis. *Research in Veterinary Science* vol. 135, p. 290-292. [https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.10.001]
- LAULAGNIER, K., MOTTA, C., HAMDI, S., *et al.* (2004) Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *The Biochemical Journal* vol. 380, n° Pt 1, p. 161-171. [https://doi.org/10.1042/BJ20031594]
- LEE, J., LEE, S.-A., GU, N.-Y., *et al.* (2021) Canine Natural Killer Cell-Derived Exosomes Exhibit Antitumor Activity in a Mouse Model of Canine Mammary Tumor. *BioMed Research International* vol. 2021, p. 6690704. [https://doi.org/10.1155/2021/6690704]
- LEE, Junsung, LEE, H., GOH, U., *et al.* (2016) Cellular Engineering with Membrane Fusogenic Liposomes to Produce Functionalized Extracellular Vesicles. *ACS applied materials & interfaces* vol. 8, n° 11, p. 6790-6795. [https://doi.org/10.1021/acsami.6b01315]
- LEE, K., SHAO, H., WEISSLEDER, R., *et al.* (2015) Acoustic Purification of Extracellular Microvesicles. *ACS nano* vol. 9, n° 3, p. 2321-2327. [https://doi.org/10.1021/nn506538f]
- LEE, S.A., CHOI, C., YOO, T.-H. (2021) Extracellular vesicles in kidneys and their clinical potential in renal diseases. *Kidney Research and Clinical Practice* vol. 40, n° 2, p. 194-207. [https://doi.org/10.23876/j.krcp.20.209]
- LEE, S.H., SAADELDIN, I.M. (2020) Exosomes as a Potential Tool for Supporting Canine Oocyte Development. *Animals: an open access journal from MDPI* vol. 10, n° 11, p. E1971. [https://doi.org/10.3390/ani10111971]
- LI, C., ZHANG, J., ZU, Y.-J., *et al.* (2015) Biocompatible and biodegradable nanoparticles for enhancement of anti-cancer activities of phytochemicals. *Chinese Journal of Natural Medicines* vol. 13, n° 9, p. 641-652. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364(15)30061-3]
- LI, P., KASLAN, M., LEE, S.H., *et al.* (2017) Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics* vol. 7, n° 3, p. 789-804. [https://doi.org/10.7150/thno.18133]

- LI, W., DONG, Y., WANG, K.J., *et al.* (2020) Plasma exosomal miR-125a-5p and miR-141-5p as non-invasive biomarkers for prostate cancer. *Neoplasma* vol. 67, n° 6, p. 1314-1318. [https://doi.org/10.4149/neo_2020_191130N1234]
- LI, X., LIU, R., HUANG, Z., *et al.* (2018) Cholangiocyte-derived exosomal long noncoding RNA H19 promotes cholestatic liver injury in mouse and humans. *Hepatology (Baltimore, Md.)* vol. 68, n° 2, p. 599-615. [https://doi.org/10.1002/hep.29838]
- LI, Y.-Y., TAO, Y.-W., GAO, S., *et al.* (2018) Cancer-associated fibroblasts contribute to oral cancer cells proliferation and metastasis via exosome-mediated paracrine miR-34a-5p. *EBioMedicine* vol. 36, p. 209-220. [https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.09.006]
- LI, Z., LI, L.-X., DIAO, Y.-J., *et al.* (2021) Identification of Urinary Exosomal miRNAs for the Non-Invasive Diagnosis of Prostate Cancer. *Cancer Management and Research* vol. 13, p. 25-35. [https://doi.org/10.2147/CMAR.S272140]
- LI, Z., ZHOU, X., WEI, M., *et al.* (2019) In Vitro and in Vivo RNA Inhibition by CD9-HuR Functionalized Exosomes Encapsulated with miRNA or CRISPR/dCas9. *Nano Letters* vol. 19, n° 1, p. 19-28. [https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.8b02689]
- LIANG, G., KAN, S., ZHU, Y., *et al.* (2018) Engineered exosome-mediated delivery of functionally active miR-26a and its enhanced suppression effect in HepG2 cells. *International Journal of Nanomedicine* vol. 13, p. 585-599. [https://doi.org/10.2147/IJN.S154458]
- LIANG, Y., DUAN, L., LU, J., *et al.* (2021) Engineering exosomes for targeted drug delivery. *Theranostics* vol. 11, n° 7, p. 3183-3195. [https://doi.org/10.7150/thno.52570]
- LIANG, Y., XU, X., LI, X., *et al.* (2020) Chondrocyte-Targeted MicroRNA Delivery by Engineered Exosomes toward a Cell-Free Osteoarthritis Therapy. *ACS applied materials & interfaces* vol. 12, n° 33, p. 36938-36947. [https://doi.org/10.1021/acsami.0c10458]
- LIAO, Y., DU, X., LI, J., *et al.* (2017) Human milk exosomes and their microRNAs survive digestion in vitro and are taken up by human intestinal cells. *Molecular Nutrition & Food Research* vol. 61, n° 11. [https://doi.org/10.1002/mnfr.201700082]
- LIGA, A., VLIEGENTHART, A.D.B., OOSTHUYZEN, W., *et al.* (2015) Exosome isolation: a microfluidic road-map. *Lab on a Chip* vol. 15, n° 11, p. 2388-2394. [https://doi.org/10.1039/c5lc00240k]
- LIU, C., SU, C. (2019) Design strategies and application progress of therapeutic exosomes. *Theranostics* vol. 9, n° 4, p. 1015-1028. [https://doi.org/10.7150/thno.30853]
- LIU, C., ZHAO, J., TIAN, F., *et al.* (2019) Low-cost thermophoretic profiling of extracellular-vesicle surface proteins for the early detection and classification of cancers. *Nature Biomedical Engineering* vol. 3, n° 3, p. 183-193. [https://doi.org/10.1038/s41551-018-0343-6]
- LIU, F., MAO, Haifei, CHAI, S., *et al.* (2021) Meta-analysis of the diagnostic value of exosomal miR-21 as a biomarker for the prediction of cancer. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* vol. 35, n° 10, p. e23956. [https://doi.org/10.1002/jcla.23956]
- LIU, F., VERMESH, O., MANI, V., *et al.* (2017) The Exosome Total Isolation Chip. *ACS nano* vol. 11, n° 11, p. 10712-10723. [https://doi.org/10.1021/acsnano.7b04878]
- LIU, J., JIANG, F., JIANG, Y., *et al.* (2020) Roles of Exosomes in Ocular Diseases. *International Journal of Nanomedicine* vol. 15, p. 10519-10538. [https://doi.org/10.2147/IJN.S277190]
- LIU, L., JIN, X., HU, C.-F., *et al.* (2017) Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells Rescue Myocardial Ischaemia/Reperfusion Injury by Inducing Cardiomyocyte Autophagy Via AMPK and Akt Pathways. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* vol. 43, n° 1, p. 52-68. [https://doi.org/10.1159/000480317]
- LIU, Q., PIAO, H., WANG, Y., *et al.* (2021) Circulating exosomes in cardiovascular disease: Novel carriers of biological information. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* vol. 135, p. 111148. [https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111148]

- LIVSHITS, M.A., LIVSHITS, M.A., KHOMYAKOVA, E., *et al.* (2015) Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Scientific Reports* vol. 5, p. 17319. [<https://doi.org/10.1038/srep17319>]
- LU, J., WEI, N., ZHU, S., *et al.* (2022) Exosomes Derived From Dendritic Cells Infected With *Toxoplasma gondii* Show Antitumoral Activity in a Mouse Model of Colorectal Cancer. *Frontiers in Oncology* vol. 12, p. 899737. [<https://doi.org/10.3389/fonc.2022.899737>]
- LUDWIG, A.-K., GIEBEL, B. (2012) Exosomes: small vesicles participating in intercellular communication. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* vol. 44, n° 1, p. 11-15. [<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.10.005>]
- LUHTALA, N., ASLANIAN, A., YATES, J.R., *et al.* (2017) Secreted Glioblastoma Nanovesicles Contain Intracellular Signaling Proteins and Active Ras Incorporated in a Farnesylation-dependent Manner. *The Journal of Biological Chemistry* vol. 292, n° 2, p. 611-628. [<https://doi.org/10.1074/jbc.M116.747618>]
- LV, L.-L., FENG, Y., WU, M., *et al.* (2020) Exosomal miRNA-19b-3p of tubular epithelial cells promotes M1 macrophage activation in kidney injury. *Cell Death and Differentiation* vol. 27, n° 1, p. 210-226. [<https://doi.org/10.1038/s41418-019-0349-y>]
- LYNCH, S.F., LUDLAM, C.A. (2007) Plasma microparticles and vascular disorders. *British Journal of Haematology* vol. 137, n° 1, p. 36-48. [<https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2007.06514.x>]
- LYU, L., WANG, H., LI, B., *et al.* (2015) A critical role of cardiac fibroblast-derived exosomes in activating renin angiotensin system in cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* vol. 89, n° Pt B, p. 268-279. [<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.10.022>]
- MA, J., GAO, J., WANG, J., *et al.* (2019) Prion-Like Mechanisms in Parkinson's Disease. *Frontiers in Neuroscience* vol. 13, p. 552. [<https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00552>]
- MA, S., TONG, C., IBEAGHA-AWEMU, E.M., *et al.* (2019) Identification and characterization of differentially expressed exosomal microRNAs in bovine milk infected with *Staphylococcus aureus*. *BMC genomics* vol. 20, n° 1, p. 934. [<https://doi.org/10.1186/s12864-019-6338-1>]
- MAAS, S.L.N., DE VRIJ, J., BROEKMAN, M.L.D. (2014) Quantification and size-profiling of extracellular vesicles using tunable resistive pulse sensing. *Journal of Visualized Experiments: JoVE* n° 92, p. e51623. [<https://doi.org/10.3791/51623>]
- MAIA, J., CAJA, S., STRANO MORAES, M.C., *et al.* (2018) Exosome-Based Cell-Cell Communication in the Tumor Microenvironment. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* vol. 6, p. 18. [<https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00018>]
- MALLOCI, M. (2017) Rôle des exosomes dans la dysfonction endothéliale associée au syndrome métabolique. These de doctorat. Angers.
- MAQSOOD, M., KANG, M., WU, X., *et al.* (2020) Adult mesenchymal stem cells and their exosomes: Sources, characteristics, and application in regenerative medicine. *Life Sciences* vol. 256, p. 118002. [<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118002>]
- MATHIEU, M., MARTIN-JAULAR, L., LAVIEU, G., *et al.* (2019) Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nature Cell Biology* vol. 21, n° 1, p. 9-17. [<https://doi.org/10.1038/s41556-018-0250-9>]
- MATHIVANAN, S., FAHNER, C.J., REID, G.E., *et al.* (2012) ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic Acids Research* vol. 40, n° Database issue, p. D1241-1244. [<https://doi.org/10.1093/nar/gkr828>]
- MATHIVANAN, S., LIM, J.W.E., TAURO, B.J., *et al.* (2010) Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature. *Molecular & cellular proteomics: MCP* vol. 9, n° 2, p. 197-208. [<https://doi.org/10.1074/mcp.M900152-MCP200>]
- MATSUMOTO, J., STEWART, T., SHENG, L., *et al.* (2017) Transmission of α -synuclein-containing erythrocyte-derived extracellular vesicles across the blood-brain barrier via adsorptive mediated transcytosis: another mechanism for initiation and progression of

- Parkinson's disease? *Acta Neuropathologica Communications* vol. 5, n° 1, p. 71. [https://doi.org/10.1186/s40478-017-0470-4]
- MAUSE, S.F., WEBER, C. (2010) Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circulation Research* vol. 107, n° 9, p. 1047-1057. [https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.226456]
- MCCULLOUGH, J., ROW, P.E., LORENZO, O., *et al.* (2006) Activation of the endosome-associated ubiquitin isopeptidase AMSH by STAM, a component of the multivesicular body-sorting machinery. *Current biology: CB* vol. 16, n° 2, p. 160-165. [https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.11.073]
- MCKENZIE, A.J., HOSHINO, D., HONG, N.H., *et al.* (2016) KRAS-MEK Signaling Controls Ago2 Sorting into Exosomes. *Cell Reports* vol. 15, n° 5, p. 978-987. [https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.085]
- MENG, W., HAO, Y., HE, C., *et al.* (2019) Exosome-orchestrated hypoxic tumor microenvironment. *Molecular Cancer* vol. 18, n° 1, p. 57. [https://doi.org/10.1186/s12943-019-0982-6]
- MEYER, C., LOSACCO, J., STICKNEY, Z., *et al.* (2017) Pseudotyping exosomes for enhanced protein delivery in mammalian cells. *International Journal of Nanomedicine* vol. 12, p. 3153-3170. [https://doi.org/10.2147/IJN.S133430]
- MINCIACCHI, V.R., FREEMAN, M.R., DI VIZIO, D. (2015) Extracellular Vesicles in Cancer: Exosomes, Microvesicles and the Emerging Role of Large Oncosomes. *Seminars in Cell & Developmental Biology, Extracellular vesicles: a paradigm shift in how we think about cell-cell communication & Molecular neuroprotection* vol. 40, p. 41-51. [https://doi.org/10.1016/j.semcd.2015.02.010]
- MITTELBRUNN, M., GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ, C., VILLARROYA-BELTRI, C., *et al.* (2011) Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nature Communications* vol. 2, p. 282. [https://doi.org/10.1038/ncomms1285]
- MITTELBRUNN, M., VICENTE MANZANARES, M., SÁNCHEZ-MADRID, F. (2015) Organizing polarized delivery of exosomes at synapses. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* vol. 16, n° 4, p. 327-337. [https://doi.org/10.1111/tra.12258]
- MONTANER-TARBES, S., FRAILE, L., MONTOYA, M., *et al.* (2021) Exosome-Based Vaccines: Pros and Cons in the World of Animal Health. *Viruses* vol. 13, n° 8, p. 1499. [https://doi.org/10.3390/v13081499]
- MORENO-GONZALO, O., FERNANDEZ-DELGADO, I., SANCHEZ-MADRID, F. (2018) Post-translational add-ons mark the path in exosomal protein sorting. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* vol. 75, n° 1, p. 1-19. [https://doi.org/10.1007/s00018-017-2690-y]
- MOSQUERA-HEREDIA, M.I., MORALES, L.C., VIDAL, O.M., *et al.* (2021) Exosomes: Potential Disease Biomarkers and New Therapeutic Targets. *Biomedicines* vol. 9, n° 8, p. 1061. [https://doi.org/10.3390/biomedicines9081061]
- MUNAGALA, R., AQIL, F., JEYABALAN, J., *et al.* (2017) Exosomal formulation of anthocyanidins against multiple cancer types. *Cancer Letters* vol. 393, p. 94-102. [https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.02.004]
- MUNKONDA, M.N., AKBARI, S., LANDRY, C., *et al.* (2018) Podocyte-derived microparticles promote proximal tubule fibrotic signaling via p38 MAPK and CD36. *Journal of Extracellular Vesicles* vol. 7, n° 1, p. 1432206. [https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1432206]
- MUSANTE, L., TATARUCH, D., GU, D., *et al.* (2014) A simplified method to recover urinary vesicles for clinical applications, and sample banking. *Scientific Reports* vol. 4, p. 7532. [https://doi.org/10.1038/srep07532]
- NAKASE, I., FUTAKI, S. (2015) Combined treatment with a pH-sensitive fusogenic peptide and cationic lipids achieves enhanced cytosolic delivery of exosomes. *Scientific Reports* vol. 5, p. 10112. [https://doi.org/10.1038/srep10112]

- NIE, W., WU, G., ZHANG, J., *et al.* (2020) Responsive Exosome Nano-bioconjugates for Synergistic Cancer Therapy. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* vol. 59, n° 5, p. 2018-2022. [<https://doi.org/10.1002/anie.201912524>]
- NIU, M., XU, R., WANG, J., *et al.* (2016) MiR-133b ameliorates axon degeneration induced by MPP(+) via targeting RhoA. *Neuroscience* vol. 325, p. 39-49. [<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.03.042>]
- NOLTE-'T HOEN, E.N.M., BUERMANS, H.P.J., WAASDORP, M., *et al.* (2012) Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Research* vol. 40, n° 18, p. 9272-9285. [<https://doi.org/10.1093/nar/gks658>]
- NOLTE-'T HOEN, E.N.M., BUSCHOW, S.I., ANDERTON, S.M., *et al.* (2009) Activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1. *Blood* vol. 113, n° 9, p. 1977-1981. [<https://doi.org/10.1182/blood-2008-08-174094>]
- OGATA-KAWATA, H., IZUMIYA, M., KURIOKA, D., *et al.* (2014) Circulating exosomal microRNAs as biomarkers of colon cancer. *PloS One* vol. 9, n° 4, p. e92921. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092921>]
- OHNO, S., TAKANASHI, M., SUDO, K., *et al.* (2013) Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* vol. 21, n° 1, p. 185-191. [<https://doi.org/10.1038/mt.2012.180>]
- ORLANDO, K.A., STONE, N.L., PITTMAN, R.N. (2006) Rho kinase regulates fragmentation and phagocytosis of apoptotic cells. *Experimental Cell Research* vol. 312, n° 1, p. 5-15. [<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.09.012>]
- OSTROWSKI, M., CARMO, N.B., KRUMEICH, S., *et al.* (2010) Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nature Cell Biology* vol. 12, n° 1, p. 19-30; sup pp 1- 13. [<https://doi.org/10.1038/ncb2000>]
- PAISÁN-RUIZ, C., LEWIS, P.A., SINGLETON, A.B. (2013) LRRK2: cause, risk, and mechanism. *Journal of Parkinson's Disease* vol. 3, n° 2, p. 85-103. [<https://doi.org/10.3233/JPD-130192>]
- PALACIOS, A., SAMPEDRO, L., SEVILLA, I.A., *et al.* (2019) Mycobacterium tuberculosis extracellular vesicle-associated lipoprotein LpqH as a potential biomarker to distinguish paratuberculosis infection or vaccination from tuberculosis infection. *BMC veterinary research* vol. 15, n° 1, p. 188. [<https://doi.org/10.1186/s12917-019-1941-6>]
- PALMIERI, V., LUCCHETTI, D., GATTO, I., *et al.* (2014) Dynamic light scattering for the characterization and counting of extracellular vesicles: a powerful noninvasive tool. *Journal of Nanoparticle Research* vol. 16, n° 9, p. 2583. [<https://doi.org/10.1007/s11051-014-2583-z>]
- PAN, B.T., TENG, K., WU, C., *et al.* (1985) Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *The Journal of Cell Biology* vol. 101, n° 3, p. 942-948. [<https://doi.org/10.1083/jcb.101.3.942>]
- PEINADO, H., ALEČKOVIĆ, M., LAVOTSHKIN, S., *et al.* (2012) Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature Medicine* vol. 18, n° 6, p. 883-891. [<https://doi.org/10.1038/nm.2753>]
- PEREZ-HERNANDEZ, D., GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ, C., JORGE, I., *et al.* (2013) The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes. *The Journal of Biological Chemistry* vol. 288, n° 17, p. 11649-11661. [<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.445304>]
- PESSOLANO, E., BELVEDERE, R., BIZZARRO, V., *et al.* (2018) Annexin A1 May Induce Pancreatic Cancer Progression as a Key Player of Extracellular Vesicles Effects as Evidenced in the In Vitro MIA PaCa-2 Model System. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 19, n° 12, p. E3878. [<https://doi.org/10.3390/ijms19123878>]

- PFEFFER, S.R. (2007) Unsolved mysteries in membrane traffic. *Annual Review of Biochemistry* vol. 76, p. 629-645. [<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.061705.130002>]
- PFEIFFER, P., COATES, J., KENNEDY, A., *et al.* (2021) Exosome TDP-43 profile in canine model of ALS: A preliminary study in developing surrogate biomarker. [<https://doi.org/10.1101/2021.06.17.448876>]
- PIOTROWSKI, I., KULCENTY, K., SUCHORSKA, W. (2020) Interplay between inflammation and cancer. *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy: Journal of Great Poland Cancer Center in Poznan and Polish Society of Radiation Oncology* vol. 25, n° 3, p. 422-427. [<https://doi.org/10.1016/j.rpor.2020.04.004>]
- PIRONTI, G., STRACHAN, R.T., ABRAHAM, D., *et al.* (2015) Circulating Exosomes Induced by Cardiac Pressure Overload Contain Functional Angiotensin II Type 1 Receptors. *Circulation* vol. 131, n° 24, p. 2120-2130. [<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.015687>]
- POLAKOVICOVA, I., JEREZ, S., WICHMANN, I.A., *et al.* (2018) Role of microRNAs and Exosomes in Helicobacter pylori and Epstein-Barr Virus Associated Gastric Cancers. *Frontiers in Microbiology* vol. 9, p. 636. [<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00636>]
- QAMAR, A.Y., FANG, X., KIM, M.J., *et al.* (2019) Improved Post-Thaw Quality of Canine Semen after Treatment with Exosomes from Conditioned Medium of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Animals: an open access journal from MDPI* vol. 9, n° 11, p. E865. [<https://doi.org/10.3390/ani9110865>]
- QAZI, K.R., GEHRMANN, U., DOMANGE JORDÖ, E., *et al.* (2009) Antigen-loaded exosomes alone induce Th1-type memory through a B-cell-dependent mechanism. *Blood* vol. 113, n° 12, p. 2673-2683. [<https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-153536>]
- QIAO, Z., ZHANG, Y., GE, M., *et al.* (2019) Cancer Cell Derived Small Extracellular Vesicles Contribute to Recipient Cell Metastasis Through Promoting HGF/c-Met Pathway. *Molecular & cellular proteomics: MCP* vol. 18, n° 8, p. 1619-1629. [<https://doi.org/10.1074/mcp.RA119.001502>]
- RABINOWITS, G., GERÇEL-TAYLOR, C., DAY, J.M., *et al.* (2009) Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer. *Clinical Lung Cancer* vol. 10, n° 1, p. 42-46. [<https://doi.org/10.3816/CLC.2009.n.006>]
- RAMAKRISHNAIAH, V., THUMANN, C., FOFANA, I., *et al.* (2013) Exosome-mediated transmission of hepatitis C virus between human hepatoma Huh7.5 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 110, n° 32, p. 13109-13113. [<https://doi.org/10.1073/pnas.1221899110>]
- RAMOS-ZAYAS, Y., FRANCO-MOLINA, M.A., HERNÁNDEZ-GRANADOS, A.J., *et al.* (2019) Immunotherapy for the treatment of canine transmissible venereal tumor based in dendritic cells pulsed with tumoral exosomes. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* vol. 41, n° 1, p. 48-54. [<https://doi.org/10.1080/08923973.2018.1533969>]
- RANI, K., RASTOGI, S., VISHWAKARMA, P., *et al.* (2021) A novel approach to correlate the salivary exosomes and their protein cargo in the progression of cognitive impairment into Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience Methods* vol. 347, p. 108980. [<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2020.108980>]
- RAO, S.K., HUYNH, C., PROUX-GILLARDEAUX, V., *et al.* (2004) Identification of SNAREs involved in synaptotagmin VII-regulated lysosomal exocytosis. *The Journal of Biological Chemistry* vol. 279, n° 19, p. 20471-20479. [<https://doi.org/10.1074/jbc.M400798200>]
- RAPOSO, G., NIJMAN, H.W., STOORVOGEL, W., *et al.* (1996) B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *The Journal of Experimental Medicine* vol. 183, n° 3, p. 1161-1172. [<https://doi.org/10.1084/jem.183.3.1161>]
- RAPOSO, G., STOORVOGEL, W. (2013) Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of Cell Biology* vol. 200, n° 4, p. 373-383. [<https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>]

- RAPOSO, G., TENZA, D., MECHERI, S., *et al.* (1997) Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. *Molecular Biology of the Cell* vol. 8, n° 12, p. 2631-2645. [https://doi.org/10.1091/mbc.8.12.2631]
- RASTOGI, S., SHARMA, V., BHARTI, P.S., *et al.* (2021) The Evolving Landscape of Exosomes in Neurodegenerative Diseases: Exosomes Characteristics and a Promising Role in Early Diagnosis. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 22, n° 1, p. E440. [https://doi.org/10.3390/ijms22010440]
- RAYAMAJHI, S., NGUYEN, T.D.T., MARASINI, R., *et al.* (2019) Macrophage-derived exosome-mimetic hybrid vesicles for tumor targeted drug delivery. *Acta Biomaterialia* vol. 94, p. 482-494. [https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.05.054]
- RECORD, M., CARAYON, K., POIROT, M., *et al.* (2014) Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiologicals. *Biochimica Et Biophysica Acta* vol. 1841, n° 1, p. 108-120. [https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2013.10.004]
- REN, X., HURLEY, J.H. (2010) VHS domains of ESCRT-0 cooperate in high-avidity binding to polyubiquitinated cargo. *The EMBO Journal* vol. 29, n° 6, p. 1045-1054. [https://doi.org/10.1038/emboj.2010.6]
- REVENFELD, A.L.S., BÆK, R., NIELSEN, M.H., *et al.* (2014) Diagnostic and prognostic potential of extracellular vesicles in peripheral blood. *Clinical Therapeutics* vol. 36, n° 6, p. 830-846. [https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2014.05.008]
- RICKLEFS, F.L., ALAYO, Q., KRENZLIN, H., *et al.* (2018) Immune evasion mediated by PD-L1 on glioblastoma-derived extracellular vesicles. *Science Advances* vol. 4, n° 3, p. eaar2766. [https://doi.org/10.1126/sciadv.aar2766]
- RINGUETTE GOULET, C., BERNARD, G., TREMBLAY, S., *et al.* (2018) Exosomes Induce Fibroblast Differentiation into Cancer-Associated Fibroblasts through TGFβ Signaling. *Molecular cancer research: MCR* vol. 16, n° 7, p. 1196-1204. [https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-17-0784]
- ROBBINS, P.D., DORRONSORO, A., BOOKER, C.N. (2016) Regulation of chronic inflammatory and immune processes by extracellular vesicles. *The Journal of Clinical Investigation* vol. 126, n° 4, p. 1173-1180. [https://doi.org/10.1172/JCI81131]
- ROBBINS, P.D., MORELLI, A.E. (2014) Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nature Reviews. Immunology* vol. 14, n° 3, p. 195-208. [https://doi.org/10.1038/nri3622]
- ROCHA, N., KUIJL, C., VAN DER KANT, R., *et al.* (2009) Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7-RILP-p150 Glued and late endosome positioning. *The Journal of Cell Biology* vol. 185, n° 7, p. 1209-1225. [https://doi.org/10.1083/jcb.200811005]
- ROUNTREE, R.B., MANDL, S.J., NACHTWEY, J.M., *et al.* (2011) Exosome targeting of tumor antigens expressed by cancer vaccines can improve antigen immunogenicity and therapeutic efficacy. *Cancer Research* vol. 71, n° 15, p. 5235-5244. [https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4076]
- ROW, P.E., PRIOR, I.A., MCCULLOUGH, J., *et al.* (2006) The ubiquitin isopeptidase UBPY regulates endosomal ubiquitin dynamics and is essential for receptor down-regulation. *The Journal of Biological Chemistry* vol. 281, n° 18, p. 12618-12624. [https://doi.org/10.1074/jbc.M512615200]
- RUTTER, B.D., INNES, R.W. (2018) Extracellular vesicles as key mediators of plant-microbe interactions. *Current Opinion in Plant Biology* vol. 44, p. 16-22. [https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.01.008]
- SALVIOLI, S., OLIVIERI, F., MARCHEGANI, F., *et al.* (2006) Genes, ageing and longevity in humans: problems, advantages and perspectives. *Free Radical Research* vol. 40, n° 12, p. 1303-1323. [https://doi.org/10.1080/10715760600917136]

- SANTANGELO, L., GIURATO, G., CICCHINI, C., *et al.* (2016) The RNA-Binding Protein SYNCRIP Is a Component of the Hepatocyte Exosomal Machinery Controlling MicroRNA Sorting. *Cell Reports* vol. 17, n° 3, p. 799-808. [<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.031>]
- SANTORO, D., ARCHER, L., CHONG, E. (2022) Evaluation of cutaneous and circulating (serum and exosomes) levels of chemokines (CCL17, CCL22, CCL27 and CCL28) in atopic dogs and their correlation with severity of the disease. *Veterinary Dermatology* vol. 33, n° 3, p. 195-e56. [<https://doi.org/10.1111/vde.13061>]
- SARDAR SINHA, M., ANSELL-SCHULTZ, A., CIVITELLI, L., *et al.* (2018) Alzheimer's disease pathology propagation by exosomes containing toxic amyloid-beta oligomers. *Acta Neuropathologica* vol. 136, n° 1, p. 41-56. [<https://doi.org/10.1007/s00401-018-1868-1>]
- SATO, Y.T., UMEZAKI, K., SAWADA, S., *et al.* (2016) Engineering hybrid exosomes by membrane fusion with liposomes. *Scientific Reports* vol. 6, p. 21933. [<https://doi.org/10.1038/srep21933>]
- SAVILL, J., DRANSFIELD, I., GREGORY, C., *et al.* (2002) A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nature Reviews. Immunology* vol. 2, n° 12, p. 965-975. [<https://doi.org/10.1038/nri957>]
- SAVINA, A., FADER, C.M., DAMIANI, M.T., *et al.* (2005) Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* vol. 6, n° 2, p. 131-143. [<https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2004.00257.x>]
- SCHEY, K.L., LUTHER, J.M., ROSE, K.L. (2015) Proteomics characterization of exosome cargo. *Methods (San Diego, Calif.)* vol. 87, p. 75-82. [<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.03.018>]
- SCHOREY, J.S., HARDING, C.V. (2016) Extracellular vesicles and infectious diseases: new complexity to an old story. *The Journal of Clinical Investigation* vol. 126, n° 4, p. 1181-1189. [<https://doi.org/10.1172/JCI81132>]
- SCOTT, C.C., GRUENBERG, J. (2011) Ion flux and the function of endosomes and lysosomes: pH is just the start: the flux of ions across endosomal membranes influences endosome function not only through regulation of the luminal pH. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* vol. 33, n° 2, p. 103-110. [<https://doi.org/10.1002/bies.201000108>]
- SEDGWICK, A.E., D'SOUZA-SCHOREY, C. (2018) The biology of extracellular microvesicles. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* vol. 19, n° 5, p. 319-327. [<https://doi.org/10.1111/tra.12558>]
- SEGURA, E., GUÉRIN, C., HOGG, N., *et al.* (2007) CD8+ dendritic cells use LFA-1 to capture MHC-peptide complexes from exosomes in vivo. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* vol. 179, n° 3, p. 1489-1496. [<https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.3.1489>]
- SERVAGE, K.A., STEFANIUS, K., GRAY, H.F., *et al.* (2020) Proteomic Profiling of Small Extracellular Vesicles Secreted by Human Pancreatic Cancer Cells Implicated in Cellular Transformation. *Scientific Reports* vol. 10, n° 1, p. 7713. [<https://doi.org/10.1038/s41598-020-64718-6>]
- SHAH, R., PATEL, T., FREEDMAN, J.E. (2018) Circulating Extracellular Vesicles in Human Disease. *The New England Journal of Medicine* vol. 379, n° 10, p. 958-966. [<https://doi.org/10.1056/NEJMra1704286>]
- SHEN, S., SONG, Y., ZHAO, B., *et al.* (2021) Cancer-derived exosomal miR-7641 promotes breast cancer progression and metastasis. *Cell communication and signaling: CCS* vol. 19, n° 1, p. 20. [<https://doi.org/10.1186/s12964-020-00700-z>]
- SHEPPARD, O., COLEMAN, M. (2020) Alzheimer's Disease: Etiology, Neuropathology and Pathogenesis. In Huang, X. (Éd.), *Alzheimer's Disease: Drug Discovery*. Brisbane (AU), Exon Publications.
- SHURTLEFF, M.J., TEMOCHE-DIAZ, M.M., KARFILIS, K.V., *et al.* (2016) Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction. *eLife* vol. 5, p. e19276. [<https://doi.org/10.7554/eLife.19276>]

- SIMONS, M., RAPOSO, G. (2009) Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Current Opinion in Cell Biology* vol. 21, n° 4, p. 575-581. [https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.03.007]
- SINGHTO, N., KANLAYA, R., NILNUMKHUM, A., *et al.* (2018) Roles of Macrophage Exosomes in Immune Response to Calcium Oxalate Monohydrate Crystals. *Frontiers in Immunology* vol. 9, p. 316. [https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00316]
- SINGHTO, N., THONGBOONKERD, V. (2018) Exosomes derived from calcium oxalate-exposed macrophages enhance IL-8 production from renal cells, neutrophil migration and crystal invasion through extracellular matrix. *Journal of Proteomics* vol. 185, p. 64-76. [https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.06.015]
- SINHA, S., HOSHINO, D., HONG, N.H., *et al.* (2016) Cortactin promotes exosome secretion by controlling branched actin dynamics. *The Journal of Cell Biology* vol. 214, n° 2, p. 197-213. [https://doi.org/10.1083/jcb.201601025]
- SKOG, J., WURDINGER, T., VAN RIJN, S., *et al.* (2008) Glioblastoma microvesicles transport RNA and protein that promote tumor growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature cell biology* vol. 10, n° 12, p. 1470-1476. [https://doi.org/10.1038/ncb1800]
- SMEETS, B., BOOR, P., DIJKMAN, H., *et al.* (2013) Proximal tubular cells contain a phenotypically distinct, scattered cell population involved in tubular regeneration. *The Journal of Pathology* vol. 229, n° 5, p. 645-659. [https://doi.org/10.1002/path.4125]
- SMYTH, T., PETROVA, K., PAYTON, N.M., *et al.* (2014) Surface functionalization of exosomes using click chemistry. *Bioconjugate Chemistry* vol. 25, n° 10, p. 1777-1784. [https://doi.org/10.1021/bc500291r]
- SONG, P., TRAJKOVIC, K., TSUNEMI, T., *et al.* (2016) Parkin Modulates Endosomal Organization and Function of the Endo-Lysosomal Pathway. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* vol. 36, n° 8, p. 2425-2437. [https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2569-15.2016]
- SONG, Y., KIM, Y., HA, S., *et al.* (2021) The emerging role of exosomes as novel therapeutics: Biology, technologies, clinical applications, and the next. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)* vol. 85, n° 2, p. e13329. [https://doi.org/10.1111/aji.13329]
- SÖNNICHSEN, B., DE RENZIS, S., NIELSEN, E., *et al.* (2000) Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *The Journal of Cell Biology* vol. 149, n° 4, p. 901-914. [https://doi.org/10.1083/jcb.149.4.901]
- SPADA, S., RUDQVIST, N.-P., WENNERBERG, E. (2020) Isolation of DNA from exosomes. *Methods in Enzymology* vol. 636, p. 173-183. [https://doi.org/10.1016/bs.mie.2020.01.012]
- STEENBEEK, S.C., PHAM, T.V., DE LIGT, J., *et al.* (2018) Cancer cells copy migratory behavior and exchange signaling networks via extracellular vesicles. *The EMBO journal* vol. 37, n° 15, p. e98357. [https://doi.org/10.15252/embj.201798357]
- STEFANIUS, K., SERVAGE, K., DE SOUZA SANTOS, M., *et al.* (2019) Human pancreatic cancer cell exosomes, but not human normal cell exosomes, act as an initiator in cell transformation. *eLife* vol. 8, p. e40226. [https://doi.org/10.7554/eLife.40226]
- STEFANIUS, K., SERVAGE, K., ORTH, K. (2021) Exosomes in cancer development. *Current Opinion in Genetics & Development* vol. 66, p. 83-92. [https://doi.org/10.1016/j.gde.2020.12.018]
- STERZENBACH, U., PUTZ, U., LOW, L.-H., *et al.* (2017) Engineered Exosomes as Vehicles for Biologically Active Proteins. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* vol. 25, n° 6, p. 1269-1278. [https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.03.030]

- STREET, J.M., BIRKHOFF, W., MENZIES, R.I., *et al.* (2011) Exosomal transmission of functional aquaporin 2 in kidney cortical collecting duct cells. *The Journal of Physiology* vol. 589, n° Pt 24, p. 6119-6127. [<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.220277>]
- STUFFERS, S., WEGNER, C.S., STENMARK, H., *et al.* (2009) Multivesicular Endosome Biogenesis in the Absence of ESCRTs. *Traffic* vol. 10, n° 7, p. 925-937. [<https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00920.x>]
- SUBRA, C., GRAND, D., LAULAGNIER, K., *et al.* (2010) Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *Journal of Lipid Research* vol. 51, n° 8, p. 2105-2120. [<https://doi.org/10.1194/jlr.M003657>]
- SUN, D., ZHUANG, X., XIANG, X., *et al.* (2010) A Novel Nanoparticle Drug Delivery System: The Anti-inflammatory Activity of Curcumin Is Enhanced When Encapsulated in Exosomes. *Molecular Therapy* vol. 18, n° 9, p. 1606-1614. [<https://doi.org/10.1038/mt.2010.105>]
- SUN, J., ASWATH, K., SCHROEDER, S.G., *et al.* (2015) MicroRNA expression profiles of bovine milk exosomes in response to *Staphylococcus aureus* infection. *BMC genomics* vol. 16, p. 806. [<https://doi.org/10.1186/s12864-015-2044-9>]
- SUTARIA, D.S., JIANG, J., ELGAMAL, O.A., *et al.* (2017) Low active loading of cargo into engineered extracellular vesicles results in inefficient miRNA mimic delivery. *Journal of Extracellular Vesicles* vol. 6, n° 1, p. 1333882. [<https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1333882>]
- SZATANEK, R., BAJ-KRZYWORZEKA, M., ZIMOCZ, J., *et al.* (2017) The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 18, n° 6, p. E1153. [<https://doi.org/10.3390/ijms18061153>]
- TAMAI, K., TANAKA, N., NAKANO, T., *et al.* (2010) Exosome secretion of dendritic cells is regulated by Hrs, an ESCRT-0 protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* vol. 399, n° 3, p. 384-390. [<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.083>]
- TAMURA, R., UEMOTO, S., TABATA, Y. (2017) Augmented liver targeting of exosomes by surface modification with cationized pullulan. *Acta Biomaterialia* vol. 57, p. 274-284. [<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.05.013>]
- TAN, C.Y., LAI, R.C., WONG, W., *et al.* (2014) Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote hepatic regeneration in drug-induced liver injury models. *Stem Cell Research & Therapy* vol. 5, n° 3, p. 76. [<https://doi.org/10.1186/scrt465>]
- TANAKA, Y., KAMOHARA, H., KINOSHITA, K., *et al.* (2013) Clinical impact of serum exosomal microRNA-21 as a clinical biomarker in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* vol. 119, n° 6, p. 1159-1167. [<https://doi.org/10.1002/cncr.27895>]
- TANG, Y., ZHOU, Y., LI, H.-J. (2021) Advances in mesenchymal stem cell exosomes: a review. *Stem Cell Research & Therapy* vol. 12, n° 1, p. 71. [<https://doi.org/10.1186/s13287-021-02138-7>]
- TAURO, B.J., GREENING, D.W., MATHIAS, R.A., *et al.* (2012) Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes. *Methods (San Diego, Calif.)* vol. 56, n° 2, p. 293-304. [<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.01.002>]
- TAYLOR, D.D., GERCEL-TAYLOR, C. (2008) MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* vol. 110, n° 1, p. 13-21. [<https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2008.04.033>]
- TAYLOR, G.M., HANSON, P.I., KIELIAN, M. (2007) Ubiquitin depletion and dominant-negative VPS4 inhibit rhabdovirus budding without affecting alphavirus budding. *Journal of Virology* vol. 81, n° 24, p. 13631-13639. [<https://doi.org/10.1128/JVI.01688-07>]
- TENG, Y., REN, Y., HU, X., *et al.* (2017) MVP-mediated exosomal sorting of miR-193a promotes colon cancer progression. *Nature Communications* vol. 8, p. 14448. [<https://doi.org/10.1038/ncomms14448>]

- THEOS, A.C., TRUSCHEL, S.T., TENZA, D., *et al.* (2006) A novel pathway for sorting to intraluminal vesicles of multivesicular endosomes involved in organelle morphogenesis. *Developmental cell* vol. 10, n° 3, p. 343-354. [https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.01.012]
- THÉRY, C., WITWER, K.W., AIKAWA, E., *et al.* (2018) Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles* vol. 7, n° 1, p. 1535750. [https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750]
- THÉRY, C., ZITVOGEL, L., AMIGORENA, S. (2002) Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature Reviews. Immunology* vol. 2, n° 8, p. 569-579. [https://doi.org/10.1038/nri855]
- THONGBOONKERD, V. (2019) Roles for Exosome in Various Kidney Diseases and Disorders. *Frontiers in Pharmacology* vol. 10, p. 1655. [https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01655]
- TIAN, T., ZHANG, H.-X., HE, C.-P., *et al.* (2018) Surface functionalized exosomes as targeted drug delivery vehicles for cerebral ischemia therapy. *Biomaterials* vol. 150, p. 137-149. [https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.10.012]
- TIAN, Y., LI, S., SONG, J., *et al.* (2014) A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. *Biomaterials* vol. 35, n° 7, p. 2383-2390. [https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.11.083]
- TRAJKOVIC, K., HSU, C., CHIANTIA, S., *et al.* (2008) Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science (New York, N.Y.)* vol. 319, n° 5867, p. 1244-1247. [https://doi.org/10.1126/science.1153124]
- TROYER, R.M., RUBY, C.E., GOODALL, C.P., *et al.* (2017) Exosomes from Osteosarcoma and normal osteoblast differ in proteomic cargo and immunomodulatory effects on T cells. *Experimental Cell Research* vol. 358, n° 2, p. 369-376. [https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.07.011]
- TURNER, N., ABEYSINGHE, P., SADOWSKI, P., *et al.* (2021) Exosomal Cargo May Hold the Key to Improving Reproductive Outcomes in Dairy Cows. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 22, n° 4, p. 2024. [https://doi.org/10.3390/ijms22042024]
- URABE, F., KOSAKA, N., ITO, K., *et al.* (2020) Extracellular vesicles as biomarkers and therapeutic targets for cancer. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* vol. 318, n° 1, p. C29-C39. [https://doi.org/10.1152/ajpcell.00280.2019]
- URBANELLI, L., BURATTA, S., TANCINI, B., *et al.* (2019) The Role of Extracellular Vesicles in Viral Infection and Transmission. *Vaccines* vol. 7, n° 3, p. E102. [https://doi.org/10.3390/vaccines7030102]
- VALADI, H., EKSTRÖM, K., BOSSIOS, A., *et al.* (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology* vol. 9, n° 6, p. 654-659. [https://doi.org/10.1038/ncb1596]
- VAN DER MEEL, R., FENS, M.H.A.M., VADER, P., *et al.* (2014) Extracellular vesicles as drug delivery systems: lessons from the liposome field. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* vol. 195, p. 72-85. [https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.07.049]
- VAN BALKOM, B.W.M., PISITKUN, T., VERHAAR, M.C., *et al.* (2011) Exosomes and the kidney: prospects for diagnosis and therapy of renal diseases. *Kidney International* vol. 80, n° 11, p. 1138-1145. [https://doi.org/10.1038/ki.2011.292]
- VAN HERWIJNEN, M.J.C., DRIEDONKS, T.A.P., SNOEK, B.L., *et al.* (2018) Abundantly Present miRNAs in Milk-Derived Extracellular Vesicles Are Conserved Between Mammals. *Frontiers in Nutrition* vol. 5, p. 81. [https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00081]
- VAN KOPPEN, A., JOLES, J.A., VAN BALKOM, B.W.M., *et al.* (2012) Human embryonic mesenchymal stem cell-derived conditioned medium rescues kidney function in rats with

- established chronic kidney disease. *PLoS One* vol. 7, n° 6, p. e38746. [https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038746]
- VAN NIEL, G., CHARRIN, S., SIMOES, S., *et al.* (2011) The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Developmental Cell* vol. 21, n° 4, p. 708-721. [https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.08.019]
- VAN NIEL, G., D'ANGELO, G., RAPOSO, G. (2018) Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* vol. 19, n° 4, p. 213-228. [https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125]
- VAN NIEL, G., WUBBOLTS, R., TEN BROEKE, T., *et al.* (2006) Dendritic cells regulate exposure of MHC class II at their plasma membrane by oligoubiquitination. *Immunity* vol. 25, n° 6, p. 885-894. [https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.11.001]
- VIDAL, M., MANGEAT, P., HOEKSTRA, D. (1997) Aggregation reroutes molecules from a recycling to a vesicle-mediated secretion pathway during reticulocyte maturation. *Journal of Cell Science* vol. 110 (Pt 16), p. 1867-1877.
- VILELLA, F., MORENO-MOYA, J.M., BALAGUER, N., *et al.* (2015) Hsa-miR-30d, secreted by the human endometrium, is taken up by the pre-implantation embryo and might modify its transcriptome. *Development (Cambridge, England)* vol. 142, n° 18, p. 3210-3221. [https://doi.org/10.1242/dev.124289]
- VILLARROYA-BELTRI, C., BAIXAULI, F., GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ, C., *et al.* (2014) Sorting it out: regulation of exosome loading. *Seminars in Cancer Biology* vol. 28, p. 3-13. [https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.04.009]
- VILLARROYA-BELTRI, C., BAIXAULI, F., MITTELBRUNN, M., *et al.* (2016) ISGylation controls exosome secretion by promoting lysosomal degradation of MVB proteins. *Nature Communications* vol. 7, p. 13588. [https://doi.org/10.1038/ncomms13588]
- VILLARROYA-BELTRI, C., GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ, C., SÁNCHEZ-CABO, F., *et al.* (2013) Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nature Communications* vol. 4, p. 2980. [https://doi.org/10.1038/ncomms3980]
- VILLATORO, A.J., MARTÍN-ASTORGA, M.D.C., ALCOHOLADO, C., *et al.* (2021) Altered Proteomic Profile of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cell Exosomes from Cats with Severe Chronic Gingivostomatitis. *Animals: an open access journal from MDPI* vol. 11, n° 8, p. 2466. [https://doi.org/10.3390/ani11082466]
- VILLATORO, A.J., MARTÍN-ASTORGA, M.D.C., ALCOHOLADO, C., *et al.* (2020) Canine colostrum exosomes: characterization and influence on the canine mesenchymal stem cell secretory profile and fibroblast anti-oxidative capacity. *BMC veterinary research* vol. 16, n° 1, p. 417. [https://doi.org/10.1186/s12917-020-02623-w]
- VLASSOV, A.V., MAGDALENO, S., SETTERQUIST, R., *et al.* (2012) Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochimica Et Biophysica Acta* vol. 1820, n° 7, p. 940-948. [https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.03.017]
- VOGEL, R., COUMANS, F.A.W., MALTESEN, R.G., *et al.* (2016) A standardized method to determine the concentration of extracellular vesicles using tunable resistive pulse sensing. *Journal of Extracellular Vesicles* vol. 5, p. 31242. [https://doi.org/10.3402/jev.v5.31242]
- WAGNER, K.T., RADISIC, M. (2021) A New Role for Extracellular Vesicles in Cardiac Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Advanced Nanobiomed Research* vol. 1, n° 11, p. 2100047. [https://doi.org/10.1002/anbr.202100047]
- WALDENSTRÖM, A., GENNEBÄCK, N., HELLMAN, U., *et al.* (2012) Cardiomyocyte microvesicles contain DNA/RNA and convey biological messages to target cells. *PLoS One* vol. 7, n° 4, p. e34653. [https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034653]

- WANG, H., HOU, L., LI, A., *et al.* (2014) Expression of serum exosomal microRNA-21 in human hepatocellular carcinoma. *BioMed Research International* vol. 2014, p. 864894. [https://doi.org/10.1155/2014/864894]
- WANG, H., WANG, B., ZHANG, A., *et al.* (2019) Exosome-Mediated miR-29 Transfer Reduces Muscle Atrophy and Kidney Fibrosis in Mice. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* vol. 27, n° 3, p. 571-583. [https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.01.008]
- WANG, H., WEI, H., WANG, J., *et al.* (2020) MicroRNA-181d-5p-Containing Exosomes Derived from CAFs Promote EMT by Regulating CDX2/HOXA5 in Breast Cancer. *Molecular Therapy. Nucleic Acids* vol. 19, p. 654-667. [https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.11.024]
- WANG, J., TANG, W., YANG, M., *et al.* (2021) Inflammatory tumor microenvironment responsive neutrophil exosomes-based drug delivery system for targeted glioma therapy. *Biomaterials* vol. 273, p. 120784. [https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.120784]
- WANG, J., WU, F., LIU, C., *et al.* (2019) Exosomes Released from Rabies Virus-Infected Cells May be Involved in the Infection Process. *Virologica Sinica* vol. 34, n° 1, p. 59-65. [https://doi.org/10.1007/s12250-019-00087-3]
- WANG, Y., ZHANG, K., HUANG, X., *et al.* (2021) Mass Spectrometry Imaging of Mass Tag Immunoassay Enables the Quantitative Profiling of Biomarkers from Dozens of Exosomes. *Analytical Chemistry* vol. 93, n° 2, p. 709-714. [https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03904]
- WEBER, J.A., BAXTER, D.H., ZHANG, S., *et al.* (2010) The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clinical Chemistry* vol. 56, n° 11, p. 1733-1741. [https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.147405]
- WEI, H., CHEN, Q., LIN, L., *et al.* (2021) Regulation of exosome production and cargo sorting. *International Journal of Biological Sciences* vol. 17, n° 1, p. 163-177. [https://doi.org/10.7150/ijbs.53671]
- WEI, J., LV, L., WAN, Y., *et al.* (2015) Vps4A functions as a tumor suppressor by regulating the secretion and uptake of exosomal microRNAs in human hepatoma cells. *Hepatology (Baltimore, Md.)* vol. 61, n° 4, p. 1284-1294. [https://doi.org/10.1002/hep.27660]
- WICKMAN, G.R., JULIAN, L., MARDILOVICH, K., *et al.* (2013) Blebs produced by actin-myosin contraction during apoptosis release damage-associated molecular pattern proteins before secondary necrosis occurs. *Cell Death and Differentiation* vol. 20, n° 10, p. 1293-1305. [https://doi.org/10.1038/cdd.2013.69]
- WOLF, P. (1967) The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. *British Journal of Haematology* vol. 13, n° 3, p. 269-288. [https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x]
- WU, C.-H., SILVERS, C.R., MESSING, E.M., *et al.* (2019) Bladder cancer extracellular vesicles drive tumorigenesis by inducing the unfolded protein response in endoplasmic reticulum of nonmalignant cells. *The Journal of Biological Chemistry* vol. 294, n° 9, p. 3207-3218. [https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006682]
- WU, P., ZHANG, B., OCANSEY, D.K.W., *et al.* (2021) Extracellular vesicles: A bright star of nanomedicine. *Biomaterials* vol. 269, p. 120467. [https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120467]
- WU, X., GAO, Y., XU, L., *et al.* (2017) Exosomes from high glucose-treated glomerular endothelial cells trigger the epithelial-mesenchymal transition and dysfunction of podocytes. *Scientific Reports* vol. 7, n° 1, p. 9371. [https://doi.org/10.1038/s41598-017-09907-6]
- WU, Y., DENG, W., KLINKE, D.J. (2015) Exosomes: improved methods to characterize their morphology, RNA content, and surface protein biomarkers. *The Analyst* vol. 140, n° 19, p. 6631-6642. [https://doi.org/10.1039/c5an00688k]

- XIANG, F.-L., FANG, M., YUTZEY, K.E. (2017) Loss of β -catenin in resident cardiac fibroblasts attenuates fibrosis induced by pressure overload in mice. *Nature Communications* vol. 8, n° 1, p. 712. [https://doi.org/10.1038/s41467-017-00840-w]
- XIAO, L., HAREENDRAN, S., LOH, Y.P. (2021) Function of exosomes in neurological disorders and brain tumors. *Extracellular vesicles and circulating nucleic acids* vol. 2, p. 55-79. [https://doi.org/10.20517/evcna.2021.04]
- XU, X., LIANG, Y., LI, X., *et al.* (2021) Exosome-mediated delivery of kartogenin for chondrogenesis of synovial fluid-derived mesenchymal stem cells and cartilage regeneration. *Biomaterials* vol. 269, p. 120539. [https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120539]
- YAMADA, T., SHIGEMURA, H., ISHIGURO, N., *et al.* (2013) Cell Infectivity in relation to bovine leukemia virus gp51 and p24 in bovine milk exosomes. *PLoS One* vol. 8, n° 10, p. e77359. [https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077359]
- YÁÑEZ-MÓ, M., SILJANDER, P.R.-M., ANDREU, Z., *et al.* (2015) Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles* vol. 4, n° 1, p. 27066. [https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066]
- YANG, H., ZHANG, H., GE, S., *et al.* (2018) Exosome-Derived miR-130a Activates Angiogenesis in Gastric Cancer by Targeting C-MYB in Vascular Endothelial Cells. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* vol. 26, n° 10, p. 2466-2475. [https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.07.023]
- YANG, V.K., LOUGHRAN, K.A., MEOLA, D.M., *et al.* (2017) Circulating exosome microRNA associated with heart failure secondary to myxomatous mitral valve disease in a naturally occurring canine model. *Journal of Extracellular Vesicles* vol. 6, n° 1, p. 1350088. [https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1350088]
- YANG, X., LI, Y., ZOU, L., *et al.* (2019) Role of Exosomes in Crosstalk Between Cancer-Associated Fibroblasts and Cancer Cells. *Frontiers in Oncology* vol. 9, p. 356. [https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00356]
- YANG, X., SHI, G., GUO, J., *et al.* (2018) Exosome-encapsulated antibiotic against intracellular infections of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Nanomedicine* vol. 13, p. 8095-8104. [https://doi.org/10.2147/IJN.S179380]
- YANG, Y., HONG, Y., NAM, G.-H., *et al.* (2017) Virus-Mimetic Fusogenic Exosomes for Direct Delivery of Integral Membrane Proteins to Target Cell Membranes. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)* vol. 29, n° 13. [https://doi.org/10.1002/adma.201605604]
- YANG, Y., LI, C.-W., CHAN, L.-C., *et al.* (2018) Exosomal PD-L1 harbors active defense function to suppress T cell killing of breast cancer cells and promote tumor growth. *Cell Research* vol. 28, n° 8, p. 862-864. [https://doi.org/10.1038/s41422-018-0060-4]
- YIM, N., RYU, S.-W., CHOI, K., *et al.* (2016) Exosome engineering for efficient intracellular delivery of soluble proteins using optically reversible protein-protein interaction module. *Nature Communications* vol. 7, p. 12277. [https://doi.org/10.1038/ncomms12277]
- YOU, J., LI, M., CAO, L.M., *et al.* (2019) Snail1-dependent cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells via exosomes. *QJM: monthly journal of the Association of Physicians* vol. 112, n° 8, p. 581-590. [https://doi.org/10.1093/qjmed/hcz093]
- YU, H., QIN, L., PENG, Y., *et al.* (2020) Exosomes Derived From Hypertrophic Cardiomyocytes Induce Inflammation in Macrophages via miR-155 Mediated MAPK Pathway. *Frontiers in Immunology* vol. 11, p. 606045. [https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.606045]
- YU, H., WANG, Z. (2019) Cardiomyocyte-Derived Exosomes: Biological Functions and Potential Therapeutic Implications. *Frontiers in Physiology* vol. 10, p. 1049. [https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01049]

- YU, T., XU, Y., AHMAD, M.A., *et al.* (2021) Exosomes as a promising therapeutic strategy for peripheral nerve injury. *Current Neuropharmacology*. [https://doi.org/10.2174/1570159X19666210203161559]
- YUYAMA, K., IGARASHI, Y. (2016) Physiological and pathological roles of exosomes in the nervous system. *Biomolecular Concepts* vol. 7, n° 1, p. 53-68. [https://doi.org/10.1515/bmc-2015-0033]
- ZABOROWSKI, M.P., BALAJ, L., BREAKEFIELD, X.O., *et al.* (2015) Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *Bioscience* vol. 65, n° 8, p. 783-797. [https://doi.org/10.1093/biosci/biv084]
- ZARÀ, M., AMADIO, P., CAMPODONICO, J., *et al.* (2020) Exosomes in Cardiovascular Diseases. *Diagnostics* vol. 10, n° 11, p. 943. [https://doi.org/10.3390/diagnostics10110943]
- ZAROVNI, N., CORRADO, A., GUAZZI, P., *et al.* (2015) Integrated isolation and quantitative analysis of exosome shuttled proteins and nucleic acids using immunocapture approaches. *Methods (San Diego, Calif.)* vol. 87, p. 46-58. [https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.05.028]
- ZERINGER, E., BARTA, T., LI, M., *et al.* (2015) Strategies for isolation of exosomes. *Cold Spring Harbor Protocols* vol. 2015, n° 4, p. 319-323. [https://doi.org/10.1101/pdb.top074476]
- ZHANG, B., WANG, M., GONG, A., *et al.* (2015) HucMSC-Exosome Mediated-Wnt4 Signaling Is Required for Cutaneous Wound Healing. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* vol. 33, n° 7, p. 2158-2168. [https://doi.org/10.1002/stem.1771]
- ZHANG, C., DENG, R., ZHANG, G., *et al.* (2022) Therapeutic Effect of Exosomes Derived From Stem Cells in Spinal Cord Injury: A Systematic Review Based on Animal Studies. *Frontiers in Neurology* vol. 13, p. 847444. [https://doi.org/10.3389/fneur.2022.847444]
- ZHANG, G., YANG, P. (2018) A novel cell-cell communication mechanism in the nervous system: exosomes. *Journal of Neuroscience Research* vol. 96, n° 1, p. 45-52. [https://doi.org/10.1002/jnr.24113]
- ZHANG, J., LI, S., LI, L., *et al.* (2015) Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* vol. 13, n° 1, p. 17-24. [https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.02.001]
- ZHANG, M., JIN, K., GAO, L., *et al.* (2018) Methods and Technologies for Exosome Isolation and Characterization. *Small Methods* vol. 2, n° 9, p. 1800021. [https://doi.org/10.1002/smt.201800021]
- ZHANG, Y., BI, J., HUANG, J., *et al.* (2020) Exosome: A Review of Its Classification, Isolation Techniques, Storage, Diagnostic and Targeted Therapy Applications. *International Journal of Nanomedicine* vol. 15, p. 6917-6934. [https://doi.org/10.2147/IJN.S264498]
- ZHANG, Y., CHOPP, M., MENG, Y., *et al.* (2015) Effect of exosomes derived from multipotent mesenchymal stromal cells on functional recovery and neurovascular plasticity in rats after traumatic brain injury. *Journal of neurosurgery* vol. 122, n° 4, p. 856-867. [https://doi.org/10.3171/2014.11.JNS14770]
- ZHANG, Y., LIU, Y., LIU, H., *et al.* (2019) Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell & Bioscience* vol. 9. [https://doi.org/10.1186/s13578-019-0282-2]
- ZHANG, Y.-F., SHI, J.-B., LI, C. (2019) Small extracellular vesicle loading systems in cancer therapy: Current status and the way forward. *Cytotherapy* vol. 21, n° 11, p. 1122-1136. [https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2019.10.002]
- ZHANG, Z., CHENG, Y. (2014) miR-16-1 promotes the aberrant α -synuclein accumulation in parkinson disease via targeting heat shock protein 70. *TheScientificWorldJournal* vol. 2014, p. 938348. [https://doi.org/10.1155/2014/938348]
- ZHAO, J., SCHLÖSSER, H.A., WANG, Z., *et al.* (2019) Tumor-Derived Extracellular Vesicles Inhibit Natural Killer Cell Function in Pancreatic Cancer. *Cancers* vol. 11, n° 6, p. E874. [https://doi.org/10.3390/cancers11060874]

- ZHAO, Z., YANG, Y., ZENG, Y., *et al.* (2016) A microfluidic ExoSearch chip for multiplexed exosome detection towards blood-based ovarian cancer diagnosis. *Lab on a Chip* vol. 16, n° 3, p. 489-496. [<https://doi.org/10.1039/c5lc01117e>]
- ZHENG, Q., DING, H., WANG, L., *et al.* (2021) Circulating Exosomal miR-96 as a Novel Biomarker for Radioresistant Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Oncology* vol. 2021, p. 5893981. [<https://doi.org/10.1155/2021/5893981>]
- ZHOU, L., SHEN, M., FAN, X., *et al.* (2022) Pathogenic and Potential Therapeutic Roles of Exosomes Derived From Immune Cells in Liver Diseases. *Frontiers in Immunology* vol. 13, p. 810300. [<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.810300>]
- ZHOU, W., WOODSON, M., SHERMAN, M.B., *et al.* (2019) Exosomes mediate Zika virus transmission through SMPD3 neutral Sphingomyelinase in cortical neurons. *Emerging Microbes & Infections* vol. 8, n° 1, p. 307-326. [<https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1578188>]
- ZHOU, Y., YU, Z., WANG, X., *et al.* (2021) Exosomal circRNAs contribute to intestinal development via the VEGF signalling pathway in human term and preterm colostrum. *Aging (Albany NY)* vol. 13, n° 8, p. 11218-11233. [<https://doi.org/10.18632/aging.202806>]
- ZHU, H., GUARIGLIA, S., YU, R.Y.L., *et al.* (2013) Mutation of SIMPLE in Charcot-Marie-Tooth 1C alters production of exosomes. *Molecular Biology of the Cell* vol. 24, n° 11, p. 1619-1637, S1-3. [<https://doi.org/10.1091/mbc.E12-07-0544>]
- ZHU, L., SONG, H., ZHANG, X., *et al.* (2014) Inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection by recombinant adenovirus- and/or exosome-delivered the artificial microRNAs targeting sialoadhesin and CD163 receptors. *Virology Journal* vol. 11, p. 225. [<https://doi.org/10.1186/s12985-014-0225-9>]
- ZHUANG, X., XIANG, X., GRIZZLE, W., *et al.* (2011) Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* vol. 19, n° 10, p. 1769-1779. [<https://doi.org/10.1038/mt.2011.164>]
- ZIMMERMANN, P., ZHANG, Z., DEGEEST, G., *et al.* (2005) Syndecan recycling [corrected] is controlled by syntenin-PIP2 interaction and Arf6. *Developmental Cell* vol. 9, n° 3, p. 377-388. [<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.07.011>]
- ZITVOGEL, L., REGNAULT, A., LOZIER, A., *et al.* (1998) Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nature Medicine* vol. 4, n° 5, p. 594-600. [<https://doi.org/10.1038/nm0598-594>]
- ZONNEVELD, M.I., VAN HERWIJNEN, M.J.C., FERNANDEZ-GUTIERREZ, M.M., *et al.* (2021) Human milk extracellular vesicles target nodes in interconnected signalling pathways that enhance oral epithelial barrier function and dampen immune responses. *Journal of Extracellular Vesicles* vol. 10, n° 5, p. e12071. [<https://doi.org/10.1002/jev2.12071>]
- ZOU, X., KWON, S.H., JIANG, K., *et al.* (2018) Renal scattered tubular-like cells confer protective effects in the stenotic murine kidney mediated by release of extracellular vesicles. *Scientific Reports* vol. 8, n° 1, p. 1263. [<https://doi.org/10.1038/s41598-018-19750-y>]

LES EXOSOMES : MÉTHODES D'ÉTUDES, COMPOSITION, FONCTIONS, INTÉRÊT EN MÉDECINE HUMAINE ET VÉTÉRINAIRE

AUTEUR : Nicolas Wurtz

RÉSUMÉ :

Les exosomes sont des vésicules extracellulaires découvertes il y a une cinquantaine d'années, mais ne sont étudiés plus largement que depuis le début du millénaire. Ces vésicules nanométriques de composition très complexe, représentent des vecteurs moléculaires à travers tout l'organisme. L'objectif de cette thèse est de constituer un recueil des données scientifiques relatives à la biogenèse des exosomes, ainsi qu'aux processus biologiques physiologiques et pathogéniques auxquels ils participent. La biogenèse dépend du complexe protéique ESCRT mais aussi d'autres mécanismes accessoires, et se déroule au carrefour des voies du métabolisme, entre endosomes, lysosomes et appareil de Golgi. Les exosomes sont impliqués dans les processus physiologiques tels que l'immunité, la reproduction, le développement. Leur étude dans le cadre des mécanismes pathologiques, notamment néoplasiques, permet de soulever de nouveaux candidats biologiques pour le diagnostic et le pronostic en médecine humaine et vétérinaire. Des chercheurs ont d'ores et déjà transposé leur utilisation à la thérapie à travers des essais cliniques. Cependant il reste un important travail de fond à faire face à l'amalgame qui entoure la définition des vésicules étudiées et au manque tangible de standardisation des protocoles. La transposition clinique des exosomes reste encore lointaine, au moins en médecine vétérinaire. Le portage de la biochimie exosomale à la médecine vétérinaire n'en est qu'à ses débuts mais l'application du concept de biopsie liquide et la bioingénierie ont permis quelques découvertes innovantes quant au diagnostic des néoplasies et maladies infectieuses notamment, mais aussi pour la thérapie régénérative, l'immunothérapie ou encore la vaccination.

MOTS CLÉS :

EXOSOME – VÉSICULE EXTRACELLULAIRE – BIOMARQUEUR – CANCER - THÉRAPIE
CELL-FREE

JURY :

Président : Pr Sophie LE PODER

Directeur de thèse : Pr Sylvain BELLIER

Examinatrice : Pr Fanny PILOT-STORCK

EXOSOMES: METHODS OF STUDY, COMPOSITION, FUNCTIONS, INTEREST FOR HUMAN AND VETERINARY MEDECINE

AUTHOR: Nicolas WURTZ

SUMMARY:

Exosomes are extracellular vesicles discovered fifty years ago but which have been studied more precisely from the beginning of the millennium. These nanometric vesicles have a complex composition which gives them potential as vectors for the whole organism. The purpose of this thesis was to collect scientific data about the biogenesis of exosomes, as well as physiological and pathological processes in which they are involved. Biogenesis depends on the ESCRT protein complex but also on other accessory mechanisms. It happens at the crossroads of metabolic pathways, between endosomes, lysosomes and the Golgi apparatus. Exosomes get involved in physiological process, like immunity, reproduction and development of organs. Their study in pathological processes, especially neoplasms, highlights new biological candidates for diagnosis and prognosis in human and veterinary medicine. Some researchers have already transposed their use in therapies through clinical trials. Though there is still much background work to achieve; given the amalgam that surrounds the definition of the vesicles studies and the lack of standardized protocols. Adaptation to the clinics remains a distant goal, at least in the veterinary field. Bringing exosomal biochemistry to veterinary medicine is still in its infancy but the application of the concept of liquid biopsy and bioengineering has led to some innovating discoveries in the diagnosis of neoplasia and infectious diseases, but also in regenerative therapy, immunotherapy or vaccination.

KEYWORDS:

EXOSOME – EXTRACELLULAR VESICLE – BIOMARKER – CANCER – CELL-FREE THERAPY

JURY:

Chairperson: Pr Sophie LE PODER

Thesis director: Pr Sylvain BELLIER

Reviewer: Pr Fanny PILOT-STORCK